

UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu

Amanda Montezano Cintra

**Papel da matriz peritrófica meconial na determinação da diversidade
microbiana intestinal durante a transição entre larvas e adultos de
*Aedes aegypti***

Botucatu

2021

UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu

Amanda Montezano Cintra

**Papel da matriz peritrófica meconial na determinação da diversidade
microbiana intestinal durante a transição entre larvas e adultos de
*Aedes aegypti***

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu como requisito
parcial para a conclusão do curso de
graduação em Biologia (Bacharel).

**Orientador: Jayme Augusto de Souza
Neto**

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cintra, Amanda Montezano.

Papel da matriz peritrófica meconial na determinação da diversidade microbiana intestinal durante a transição entre larvas e adultos de *Aedes aegypti* / Amanda Montezano Cintra.
- Botucatu, 2021

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Jayme Augusto de Souza Neto
Capes: 21202010

1. *Aedes aegypti*. 2. Dengue. 3. Microbiota. 4. Microbioma gastrointestinal. 5. Intestinos - Microbiologia. 6. Saúde pública.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Matriz peritrófica; Matriz peritrófica meconial; Microbiota.

UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu

Amanda Montezano Cintra

**Papel da matriz peritrófica meconial na determinação da diversidade
microbiana intestinal durante a transição entre larvas e adultos de
*Aedes aegypti***

Orientador: Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto

Assinatura do orientador:



Assinatura do Aluno (a):

Amanda Montezano Cintra

Botucatu

Agosto de 2021

UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências de Botucatu

Amanda Montezano Cintra

**Papel da matriz peritrófica meconial na determinação da diversidade
microbiana intestinal durante a transição entre larvas e adultos de
*Aedes aegypti***

APROVADO (A) (X)

REPROVADO (A) ()

Botucatu
Agosto de 2021

Dedico este trabalho a minha família, amigos e colegas de trabalho e graduação que me deram suporte e carinho;

Agradeço ao meu pai Ivan Marchetti Cintra, meu ponto de apoio e minha grande inspiração profissional e pessoal, que me acolhe em tempos difíceis e em todas as comemorações. Obrigada por cuidar sempre de mim e me fortalecer;

A minha mãe Patrícia Christina Montezano e meus irmãos Isabela Montezano Cintra e Gabriel Montezano Cintra por me fazerem muito feliz e me apoiarem;

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Genômica Funcional e Microbiologia de Vetores que fazem o trabalho ser mais leve;

Ao meu Orientador Jayme Augusto de Souza Neto pelo apoio profissional e cuidado com o bem-estar de seus alunos;

A minha Coorientadora Vanessa Rafaela de Carvalho por todos os momentos de aprendizado e amizade para além do estágio;

A minha grande amiga Giovana Spicacci Tavares que esteve sempre comigo ao longo de todos esses anos e fez tudo parecer mais leve apesar das dificuldades, me apoiando em todos os momentos difíceis;

A minha amiga Nathalia Gonçalves de Carvalho por cuidar de mim em todos os momentos;

A minha namorada Andressa Bernardo de Oliveira por todo carinho, abraço e acolhimento, com você me sinto leve e segura;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela contribuição financeira a este projeto.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) que cerca de 2,5 bilhões de pessoas habitam áreas de risco de infecção pelo vírus dengue (DENV) doença transmitida por vetores como *Aedes aegypti*, sendo relatados entre 50 e 100 milhões de casos de infecção a cada ano. Além da transmissão da dengue o mosquito também é um dos responsáveis por transmitir outras arboviroses de suma importância para a saúde pública, como febre amarela, Zika e chikungunya. Quando *Ae. aegypti* se alimenta de sangue humano infectado com patógenos como, por exemplo o vírus da Dengue, ocorre uma interação dos vírus com o próprio organismo do mosquito, e o primeiro local onde essa interação será estabelecida é o intestino. O tubo digestivo do mosquito *Ae. aegypti* é dividido anatomicamente em 3 partes: intestino posterior, médio e anterior. Entre o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico está localizada a matriz peritrófica (foco de estudo deste projeto) que pode ser localizada acima das microvilosidades intestinais e é composta primordialmente por quitina e proteínas associadas à sua estrutura. Acredita-se que tenha uma função principal de evitar que microrganismos presentes no bolo alimentar penetrem no tubo digestório desses animais, além de facilitar a digestão evitando que enzimas não sejam eliminadas juntamente com esse bolo alimentar ao longo do processo. A matriz peritrófica meconial se forma em um curto período próximo da emergência de adultos e pode possuir um papel de seleção de microrganismos. A microbiota do intestino médio do mosquito influencia a competência em vetores para múltiplos patógenos humanos, no entanto a microbiota é altamente variável e as fontes dessa variabilidade não são bem compreendidas, o que limita a capacidade de entendimento ou prevenção na transmissão de patógenos. Para compreender a relação presente entre a microbiota intestinal e a matriz peritrófica meconial presente durante a transição de larvas para adultos de *Ae. aegypti* foi realizado a degradação da mesma a partir da utilização de polioxina D e com isso é possível realizar uma comparação da diversidade microbiana encontrada na presença e ausência desta estrutura. A estrutura da matriz peritrófica no intestino médio desses animais é responsável por abrigar uma grande parte dessa microbiota adquirida pelo animal em sua fase larval, com isso o objetivo desse projeto foi desvendar a importância da matriz meconial para o estabelecimento das bactérias ao longo do tecido na transição entre pupa e mosquito adulto.

It is estimated by the World Health Organization (WHO) that about 2.5 billion people live in areas at risk of infection with dengue virus (DENV) vector-borne disease such as *Aedes aegypti*, with between 50 and 100 million cases of infection each year. Besides the transmission of dengue, the mosquito is also responsible for transmitting other arboviruses of great importance to public health, such as yellow fever, Zika and chikungunya. When *Ae. aegypti* feeds on infected human blood with pathogens such as Dengue virus, an interaction of viruses with the mosquito's own organism occurs, and the first place where this interaction will be established is the intestine. The digestive tract of the mosquito *Ae. aegypti* is divided anatomically into 3 parts: posterior, middle and anterior intestine. Between the endoperitrophic space and the ectoperitrophic space is located the peritrophic matrix (focus of study of this project) that can be located above the intestinal microvilli and is composed primarily by chitin and proteins associated with its structure. It is believed to have a major role in preventing microorganisms in the food cake from entering the digestive tract of these animals and facilitating digestion by preventing enzymes from being eliminated along with that food bolus throughout the digestion process. The meconium matrix forms in a short period near the emergence of adults and may have a role of selection of microorganisms. However, the microbiota is highly variable and the sources of this variability are not well understood, which limits the ability to understand or prevent the transmission of pathogens. To understand the present relationship between the intestinal microbiota and the meconium peritrophic matrix present during the adult larvae transition from *Ae. aegypti* will be carried out the degradation thereof from the use of polyoxin D and with this it will be possible to carry out a comparison of the microbial diversity found in the presence and absence of this structure. The structure of the peritrophic matrix in the middle intestine of these animals is responsible for harboring a large part of this microbiota acquired by the animal in its larval stage, with the purpose of this project is to uncover the importance of the meconial matrix for the establishment of bacteria along the tissue in the transition between pupa and adult mosquito.

Lista de Gráficos e Figuras

Figura I.....	3
Figura II.....	5
Figura III.....	6
Figura IV.....	7
Figura V.....	13
Figura VI.....	14
Figura VII.....	15
Figura VIII.....	16
Figura IX.....	17
Figura X.....	20
Figura XI.....	21
Figura XII.....	27
Gráfico I.....	22
Gráfico II.....	23
Gráfico III.....	24
Gráfico IV.....	28
Gráfico V.....	29
Gráfico VI.....	30
Gráfico VII.....	31
Gráfico VIII.....	33
Gráfico IX.....	34
Gráfico X.....	35
Gráfico XI.....	36
Gráfico XII.....	37
Gráfico XIII.....	38
Gráfico XIV.....	39

1.Introdução.....	1
1.1. O vetor <i>Aedes aegypti</i>	1
1.2. A importância do controle do vetor.....	3
1.3 Ambiente intestinal.....	4
1.4. A matriz peritrófica em <i>Ae. Aegypti</i> e sua interação com a microbiota intestinal.....	5
1.5. Utilização da substância Polioxina D na inibição da produção da matriz peritrófica.....	8
1.6. Competência vetorial.....	8
2.Objetivos.....	9
2.1. Objetivo geral.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. Materiais e métodos.....	10
3.1. Criação de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> em laboratório.....	10
3.2. Degradação da matriz peritrófica com a utilização de polioxina D	10
3.3. Dissecções dos mosquitos recém emergidos, larvas L3, L4 e pupas	10
3.4. Extrações de DNA.....	11
3.5. Preparos das bibliotecas.....	11
3.5. Sequenciamento Illumina e processamento das sequencias.....	11
3.6 Análise de taxa de pupação.....	11
4. Especificações metodológicas.....	12
5. Resultados e discussão.....	21
6. Referências.....	41

1. Introdução

1.1 O vetor *Aedes aegypti*

O vetor *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) é um dos grandes responsáveis pela transmissão de doenças como a dengue, uma das maiores arboviroses no mundo, e seu controle está basicamente restrito ao combate do mosquito. A doença ocorre em regiões tropicais e subtropicais do globo, é estimado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que cerca de 2,5 bilhões de pessoas habitam áreas de risco de infecção pelo vírus dengue (DENV), sendo relatados entre 50 e 100 milhões de casos de infecção a cada ano (Barreto *et al.* 2006; Halstead, 1979). O grande desafio dos pesquisadores para o controle da doença está no grande número de alterações gênicas que geram diferentes cepas de vírus como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Até o momento, apenas uma vacina tetravalente, de uso e eficácia limitados, está disponível comercialmente (Flipse & Smit, 2015). Essa vacina foi liberada no Brasil em 28 de dezembro de 2015, é a primeira em combate a doença (yellow fever -17D-dengue vírus – CYD-TDV; Dengvaxia®, Sanofi Pasteur), entretanto, sua eficiência difere quanto aos quatro sorotipos do vírus (Pitisuttithum & Bouckenooghe, 2016). Além da transmissão da dengue o mosquito também é um dos responsáveis por transmitir outras arboviroses de suma importância para a saúde pública, como febre amarela, Zika e chikungunya (David *et al.*, 2013).

A disseminação dessas doenças causadas pelo mosquito *Ae. aegypti* é dada devido ao hábito hematófago das fêmeas, pois é neste momento que ocorre o contato entre vírus e vetor. Características naturais desses animais são favoráveis a essa disseminação viral como voos rápidos, escapes durante o repasto sanguíneo a qualquer movimento do hospedeiro e a alternância entre hospedeiros (Neves, 2009). Fêmeas fecundadas se alimentam de sangue, pois as proteínas sanguíneas são necessárias na maturação dos ovos e para o fitness reprodutivo do mosquito, características fundamentais para o seu ciclo de vida. Nesse momento as fêmeas podem adquirir os vírus e, conseqüentemente, permitir a dispersão viral (Takken e Verhulst, 2013).

Quando *Ae. aegypti* se alimenta de sangue humano infectado com patógenos ocorre uma interação dos vírus com o próprio organismo do mosquito, e o primeiro local onde essa interação será estabelecida é o intestino. As partículas virais infectam o epitélio do intestino médio, pelo mecanismo de endocitose mediada por clatrin, proteínas que desempenham um importante papel no processo de formação de vesículas (Cherry & Perrimon, 2004). A

fusão do envelope viral com a membrana celular ocorre devido ao baixo PH no interior dos endossomos, permitindo o desencapsulamento do nucleocapsídeo e a liberação do RNA viral no citoplasma. Este RNA viral a partir de um processo denominado replicação viral é então traduzido em uma poliproteína, uma única molécula que ao ser clivada origina as proteínas estruturais que serão responsáveis pela formação e montagem dos vírus. As proteínas não estruturais atuam na formação de novas moléculas de RNA viral. O material genético é então replicado e encapsulado em uma estrutura viral denominada nucleocapsídeo, competente para romper a célula em que se encontra e infectar outras (Rodenhuiszybert et al., 2010).

Após a infecção do epitélio intestinal do mosquito em cerca de 7 dias é atingido o pico máximo de vírus no intestino. O vírus atinge a hemolinfa dos insetos, utilizando o aparato circulatório do animal para se espalhar em outros órgãos do vetor. Ao atingir as glândulas salivares os vírus já podem ser transmitidos para outros indivíduos a cada picada do inseto, pois este libera parte de seu conteúdo salivar em seu hospedeiro. (Salazar et al., 2007). Uma vez infectado, o mosquito pode transmitir vírus pelo resto da vida (Cheng et al., 2016).

Como o controle dessas doenças está vinculada maioritariamente ao combate do mosquito é necessário o estudo e entendimento desses animais e seu ciclo de vida.

São holometábolos, possuem um ciclo biológico composto por quatro estágios: ovo, quatro instares larvais, sendo eles L1, L2, L3, L4 pupa e mosquito adulto (Figura I). São fundamentalmente aquáticos e ganham o ambiente terrestre somente na fase adulta, onde fazem sua reprodução e a possível dispersão de patógenos. Suas larvas alimentam-se de matéria orgânica dissolvida e de microrganismos presentes no ambiente (Forattini, 1996).

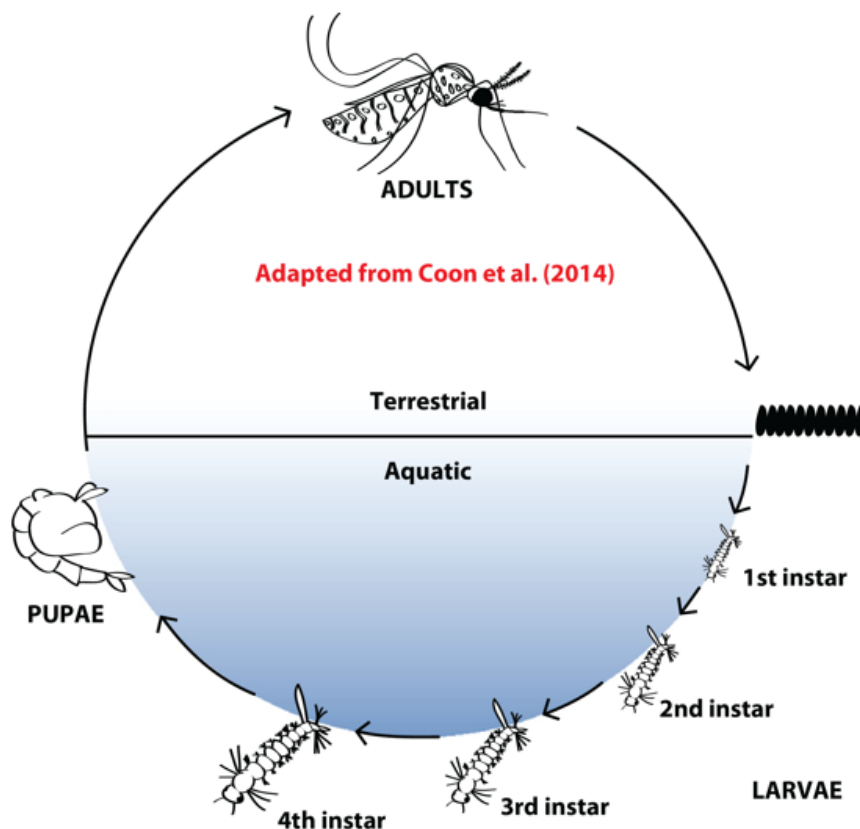


Figura I: Imagem indicando a mudança morfológica dos diferentes estágios de vida do ciclo do mosquito *Ae. aegypti*. Estágios que podem ser divididos entre larvas: L1, L2, L3 e L4, pupa e mosquito adulto com mudança do ambiente aquático do estágio larval para o ambiente terrestre em mosquito adulto (adaptado de Coon et al. 2014).

Devido à falta de políticas públicas e educacionais e a adaptação constante do vetor a ambientes urbanos, os casos de arboviroses urbanas são cada vez mais frequentes tornando dengue uma endemia em países como Brasil, além de frequentes epidemias de outras arboviroses, como a ocorrência de aparecimentos dos primeiros casos de febre Chikungunya (Secretaria de Vigilância em Saúde 2014).

1.2 A importância do controle do vetor

O *Ae. aegypti* é um artrópode terrestre pertencente à ordem Díptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero Aedes e subgênero Stegomyia (Linnaeus, 1762) (Powel & Tabachnick, 2013). O controle da transmissão de dengue tem como base a eliminação do mosquito vetor envolvendo principalmente o uso de larvicidas e inseticidas organofosforados, como malationa e fenitrothion, e inseticidas piretróides

(Kantor, 2016). Porém, a prática do uso de larvicidas pode vir a selecionar larvas com maior resistência a esses químicos. Com isso uma importante linha de pesquisa ascendente nos dias atuais é o combate de arboviroses por meio do controle biológico do vetor. Esse controle biológico pode ser dado a partir do estudo de bactérias, bloqueando a transmissão viral, como exemplo desse controle podemos citar pesquisas com bactérias como *Wolbachia* (Ormaetxe et al., 2011).

A manipulação da microbiota intestinal do mosquito pode lançar as bases para novos métodos de controle de transmissão de doenças. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais o mosquito controla este crescimento bacteriano e sobre quais os fatores responsáveis pela seleção dessa microbiota intestinal (Jarusevicius, 2018). Além do controle biológico o controle genético também é uma via importante para o controle de arboviroses, com a modificação genética de mosquitos, sendo com a criação de mosquitos machos estéreis ou com o desenvolvimento de mosquitos refratários ao parasita (Alphey et al., 2013).

1.3 Ambiente intestinal

O tubo digestivo do mosquito *Ae. aegypti* é dividido anatomicamente em 3 partes: intestino posterior, médio e anterior. Entre o espaço endoperitrófico (bolo alimentar) e o espaço ectoperitrófico (epitélio do tubo digestório) está localizada a matriz (membrana) peritrófica (PM) (Figura II). As células epiteliais do intestino médio são caracterizadas por possuírem microvilosidades e serem produtoras de enzimas e mucinas, a matriz peritrófica pode ser localizada acima dessas microvilosidades e é composta primordialmente por quitina e proteínas associadas à sua estrutura. (Bolognesi, 2005).

Essa estrutura possui muitas funções presentes em diversos estudos, mas acredita-se que tenha uma função principal de evitar que microrganismos presentes no bolo alimentar penetrem no tubo digestório desses animais, além de facilitar a digestão evitando que enzimas não sejam eliminadas juntamente com o bolo alimentar ao longo do processo, para maior rendimento dessas estruturas (Bolognesi, 2005).

Por ter a função de separar o bolo alimentar do epitélio do intestino médio a membrana pode atuar como uma barreira para organismos potencialmente invasivos ingeridos com alimentos, assim como possuir um papel se seleção de microrganismos (Moll et al., 2001).

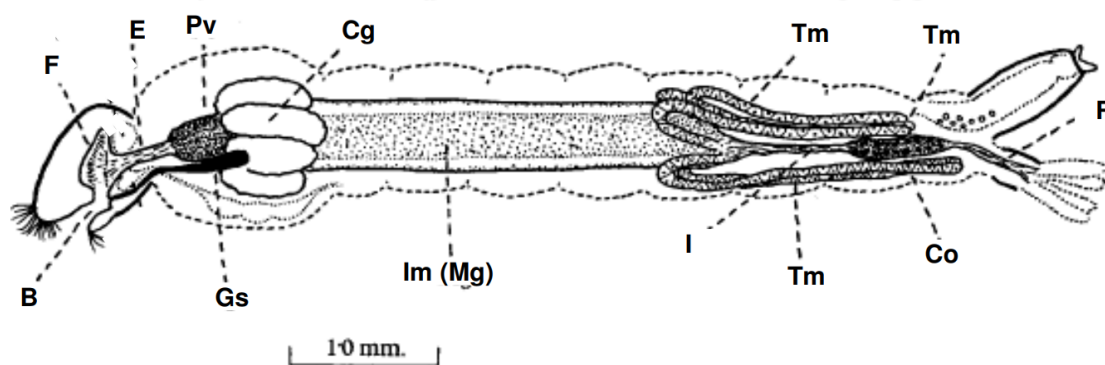


Figura II: Diagrama do tubo digestório com destaque da matriz peritrófica em larvas de *Ae. Aegypti*. Vista lateral de larva mostrando anatomia geral do canal alimentar. Compreendendo o espaço anatômico do intestino anterior. B: boca, F: faringe, E: esôfago, Pv: proventrículo, Gs: glândula salivar, Cg: Ceco gástrico, Im: intestino médio contendo bolo alimentar e matriz peritrófica, E: espaço anatômico do intestino, I: íleo, Tm: Túbulos de Malpighi, Co: ceco, R: reto (Adaptado de Christopher, 1960).

1.4 A matriz peritrófica em *Ae. Aegypti* e sua interação com a microbiota intestinal

A quitina é um homo-amino-polissacarídeo formado por monômeros de Nacetil-glicosamina (GlcNAc) ligados entre si através de pontes glicosídicas do tipo β . Essa estrutura não é encontrada apenas na superfície externa de muitos artrópodes, mas também internamente, revestindo regiões como o intestino, tubos traqueais, parte do sistema reprodutor e também recobrindo ovos de insetos. Considerada o segundo biopolímero mais abundante na natureza é em sua maior parte encontrado em associação com proteínas, formando uma rede protetora denominada cutícula. A região posterior (intestino posterior) e a região anterior (intestino anterior) do mosquito *Ae. aegypti* é coberta por cutícula. Entretanto, o intestino médio dos insetos (mesodeum ou *midgut*) é a única estrutura que tem contato com o ambiente externo e não é revestida por cutícula e, denominada de matriz peritrófica, que também possui quitina em sua composição (Ferreira, 2009).

A matriz peritrófica (PM) pode ser subdividida em dois tipos, de acordo com a região em que é formada, tipo I e tipo II. A matriz peritrófica tipo I (PM1) recobre todo o epitélio do intestino médio do inseto, e em muitos casos só pode ser formada em resposta à alimentação sanguínea. Já a matriz tipo II (PM2), produzida em uma região especializada do intestino anterior chamada cárdia, forma uma camada contínua, que está sempre presente (Lehane, 1997).

Curiosamente, muitas espécies produzem diferentes tipos de PM em diferentes estágios de seu ciclo de vida. Por exemplo, larvas de mosquitos produzem PM2 enquanto fêmeas adultas produzem PM1 em resposta à alimentação sanguínea. Essa observação sugere ação de pressões evolutivas que garantam correlação entre o tipo de PM e o hábito alimentar do inseto (Lehane, 1997).

Além das matrizes peritrófica larvares e adultas (PM1 e PM2), também é possível observar a formação de uma matriz denominada meconial (mecPM1) na fase de pupa em torno do mecônio, que é caracterizado pelo epitélio degenerado do intestino médio das larvas. Uma segunda matriz meconial (mecPM2) (Figura III) se forma em um curto período próximo da emergência de adultos e é estimulada pela distensão do epitélio do intestino médio, de modo que, ambas foram relacionadas com a transição das fases de pupa em mosquitos recém emergidos. Diferenças na ocorrência, persistência e tempo de desaparecimento do mecônio mecPMs foram estudadas dissecando o conteúdo do intestino médio de pupa de pós-idade conhecida e de adultos de pós-emergência conhecida (Moll et al., 2001).

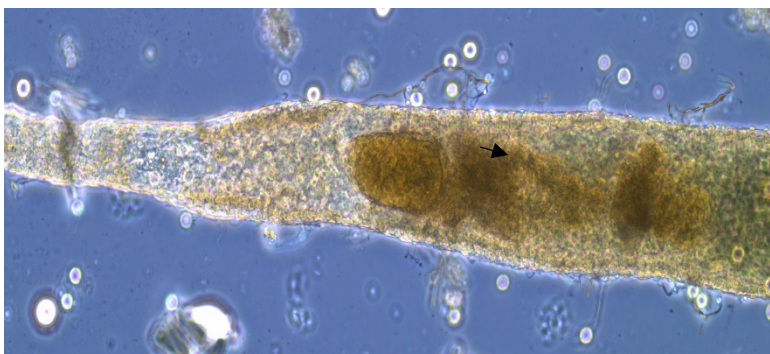


Figura III: Imagem realizada pela autora indica a presença da matriz peritrófica meconial (estrutura apontada pela seta) vista em uma ampliação de 10x. Figura mostra uma dissecção da região do intestino médio de adultos recém emergidos de *Ae. aegypti* em um período de 14 horas realizada em meio a uma solução tampão PBS.

Segundo estudos essas mecPMs foram relacionadas a uma esterilização intestinal das bactérias durante a metamorfose de mosquitos como *Ae. aegypti*. Contagens bacterianas retiradas do mecônio e lúmen de adultos recém emergidos revelou que na maioria dos casos haviam poucas ou nenhuma bactéria encontrada diferindo significativamente dos estágios larvais desse animal. As contagens foram muito altas no quarto ínstar antes da defecação final, mas diminuíram drasticamente após a defecação larval final e a eliminação da matriz

peritrófica. As contagens bacterianas diminuíram para quase zero em todos os espécimes adultos recém-emergidos examinados (Moll et al., 2001). Para além disso mecPMs podem proteger o animal da ação de micro-organismos potencialmente prejudiciais presentes no lúmen do intestino a partir do estágio larval e também amenizar o efeito de enzimas hidrolíticas nas células epiteliais do intestino médio (Moncayo e Romoser, 2005).

A matriz peritrófica não celular (PM) que se forma ao redor do bolo alimentar no intestino médio de muitas espécies de artrópodes pode influenciar o destino das bactérias adquiridas (Moncayo, 2005). A estrutura da matriz peritrófica no intestino médio desses animais é responsável por abrigar uma grande parte dessa microbiota adquirida pelo animal em sua fase larval, com isso o objetivo desse projeto é desvendar a importância da matriz meconial para o estabelecimento das bactérias ao longo do tecido na transição entre pupa e mosquito adulto.

Estudos com o vetor da malária *Anopheles coluzzi* mostraram que a síntese e integridade da PM do mosquito é dependente de microbiota, revelando que essa determina a persistência ou não de determinadas enterobactérias. Resultados demonstram que a PM é um regulador chave do intestino do mosquito, pois tratando com antibióticos é possível observar uma degradação significativa da estrutura, mostrando uma forte relação da composição física do espaço com as bactérias presentes (Figura IV) (Rodgers et al., 2017).

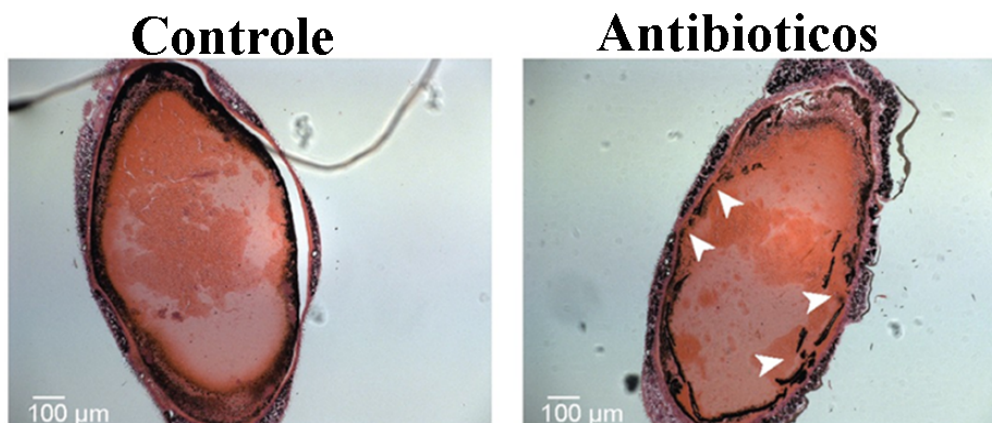


Figura IV: Resultado do tratamento com antibióticos comprometendo a produção e integridade da matriz peritrófica (Rodgers et al., 2017).

Resultados de estudos revelaram a transição da composição da microbiota intestinal, principalmente pela diminuição progressiva da diversidade de bactérias como efeito da colonização. Os gêneros mais abundantes encontrados, como *Pantoea*, *Burkholderia* e

Enterobacter, permaneceram em proporções similares ao longo destas gerações. Estes dados sugerem que existe transmissão de bactérias entre as gerações e que o ambiente intestinal possui mecanismos para manter a composição original de sua microbiota (Jarusevicius, 2018).

A microbiota do intestino médio do mosquito influencia a competência em vetores para múltiplos patógenos humanos. No entanto a microbiota é altamente variável e as fontes dessa variabilidade não são bem compreendidas, o que limita a capacidade de entendimento ou prevenção na transmissão de patógenos. Estudos demonstram a existência de uma variação significativa na carga bacteriana no intestino médio de fêmeas adultas entre cepas de *Ae. aegypti* que variam em sua suscetibilidade ao vírus da dengue (Short et al., 2017).

1.5 Utilização da substância Polioxina D na inibição da produção da matriz peritrófica

É estimado, de 3 a 13% da matriz peritrófica presente do intestino médio do *Ae. aegypti* é composta por quitina. Os monômeros de N-acetil- glicosamina são unidos entre si formando poros que, por sua vez, são consequentes da ligação das pontes de hidrogênio com a água presente no intestino, conferindo assim maior flexibilidade à estrutura, já que se formam com maior intensidade que a ligação entre os monômeros na cadeia (Ferreira, 2009).

Em insetos, existem duas classes de quitina sintase: enzimas de classe 1 sintetizam quitina para os tecidos epidermais, enquanto as de classe 2 são responsáveis pela síntese de quitina para o epitélio intestinal (Tellam *et al.*, 2000; Moussian *et al.*, 2005).

A enzima quitina sintase segue uma via exocítica transportada por vesículas a partir do complexo de Golgi até a superfície celular. Estudos de marcação mostram o acúmulo de fibras quitinosas recém secretadas no topo das microvilosidades das células epiteliais entre o espaço endoperitrófico (bolo alimentar) e o espaço ectoperitrófico (camada epitelial) (Ferreira, 2009).

A ação da polioxina D bloqueia a produção da enzima quitina sintase 2 (Ferreira, 2009). O que pode acarretar na inibição da produção da matriz peritrófica, desse modo pode ser possível verificar qual será a natureza da microbiota intestinal de larvas do mosquito *Ae. aegypti* com a ausência dessa estrutura.

1.6 Competência vetorial

A capacidade intrínseca de um vetor tornar-se infectado, propiciar a multiplicação do agente infeccioso e de transmitir o vírus a um hospedeiro vertebrado é denominado

competência vetorial. Fatores intrínsecos (genéticos), concentração viral no hospedeiro infectado, barreiras fisiológicas e anatômicas do mosquito vetor, sua microbiota, dentre outros são fatores, ainda não bem compreendidos podem influenciar positivamente ou negativamente essa competência (Bennett et al., 2002; Calisher, 1998).

Em relação às barreiras anatômicas do vetor se destacam: a barreira de infecção do intestino médio (MIB - *Midgut Infection Barrier*), a barreira de escape do intestino médio (MEB - *Midgut Escape Barrier*) e a barreira de transmissão da glândula salivar (TB - *Transmission Barrier*) (Bennett et al.; 2002, Black et al., 2002).

Mosquitos infectados podem ser analisados e classificados de acordo com diferentes fenótipos como: mosquitos totalmente resistentes, neste caso, os vírus não conseguem estabelecer infecção no intestino médio; mosquitos com infecção viral no intestino, neste caso não ocorrerá disseminação para outros órgãos e/ou tecidos; mosquitos com infecção intestinal e disseminação para outros órgãos e tecidos, porém não atingirá as glândulas salivares e mosquitos com infecção e disseminação para todos os tecidos, incluindo as glândulas salivares. Destes, apenas aqueles que se enquadrem no último item descrito podem ser considerados vetores competentes (Cox et al., 2011).

A interação vírus-vetor é resultado de um processo biológico de coevolução contínua, que envolve o sistema imune do vetor e suas barreiras físicas e moleculares e os mecanismos virais de escape destas defesas (Obbard & Dudas, 2014).

Estudos demonstram que além dos fatores genéticos do mosquito(intrínsecos) a microbiota intestinal também atua como um fator determinante na competência vetorial dos mosquitos (Dillon & Dillon 2004). Pois testes que se utilizaram de técnicas para a remoção da microbiota simbiote no intestino de vetores mostraram resultados em níveis mais altos de infecção por *Plasmodium falciparum* em *Anopheles gambiae* (Dong et al., 2009) e DENV em *Ae. aegypti* (Xi et al., 2008). O que pode sugerir que tais bactérias são capazes de selecionar a entrada de patógenos infectantes como vírus e protozoários. Esses mecanismos de seleção da microbiota de vetores ainda não são amplamente conhecidos, porém, uma hipótese seria que a microbiota promova uma estimulação basal do sistema imune dos mosquitos, o que resulta em um aumento na produção das moléculas efetoras que reconheceriam a presença de patógenos, evitando assim, que ocorra o processo de infecção (Cirimotich et al., 2011).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é investigar o papel da matriz peritrófica meconial na definição da diversidade microbiana intestinal durante a transição de larvas para adultos de *Ae. Aegypti*.

2.2 Objetivos específicos

Observar o efeito da polioxina D sobre a formação da matriz peritrófica tipo II em larvas durante os estágios 3 e 4 (L3, L4).

Observar o efeito dessa substância na formação da matriz peritrófica meconial em pupas e mosquitos recém emergidos.

Elucidar o efeito da eliminação da matriz peritrófica sobre a diversidade microbiana intestinal de adultos.

3. Metodologia

3.1 Criação de mosquitos *Ae. aegypti* em laboratório

No presente estudo, utilizamos mosquitos *Ae. aegypti* linhagem Rockefeller e colonizados no Laboratório de Genômica funcional & Microbiologia de Vetores/LACEM. Os mosquitos adultos foram mantidos em condições padrões de insetário a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $80\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 h/12 h. Os ovos foram induzidos à eclosão em bandejas contendo água destilada e suplementada com ração para peixe ornamental TetraMin (Tetra©). Diferentes estágios larvais receberam ração de peixe como alimento e mosquitos adultos mantidos em gaiolas não foram alimentados.

3.2 Degradação da matriz peritrófica com a utilização de polioxina D

Foi realizado uma alimentação com polioxina D para a degradação da membrana peritrófica em larvas, preparada com uma solução-mãe 0,01M a partir de pó em água e adicionado a ração de peixe em uma concentração final de 100 μM . Um volume igual com água apenas foi adicionado à refeição do grupo controle (Rodgers et al., 2017).

3.3 Dissecções dos mosquitos recém emergidos, larvas e pupas

Os diferentes estágios de desenvolvimento dos mosquitos a serem dissecados tiveram suas superfícies esterilizadas. A dissecação de larvas L4 assim como em pupas foram feitas com o objetivo de observar o efeito da polioxina D sobre a matriz peritrófica tipo II e matriz peritrófica meconial formadas no intestino médio. Em adultos recém emergidos cada intestino dissecado foi mantido em tampão ATL do kit de extração de DNA "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen) em -20°C.

3.4 Extrações de DNA e preparos das bibliotecas

Os intestinos dissecados serão dissecados individualmente com kit de extração de DNA "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Será utilizada a técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) para a amplificação do gene 16S rRNA, utilizando-se pares de primers que compreendem a região hipervariável V4 (Caporaso et al., 2012). As reações serão realizadas em triplicata técnica. Os primers utilizados no método definido por Caporaso et al. (2010). As bibliotecas purificadas serão quantificadas no aparelho Step One Plus TM Real Time PCR (Applied Biosystems®). Serão utilizados 4,0 µl de cada amostra diluída e 16 µl de solução preparada com fluorescência, fornecida pelo kit de quantificação Library Quantification Kit - Illumina/Universal (KAPA Biosystems). A técnica utiliza primers que se anelam aos adaptadores Illumina presentes nas amostras. Após a quantificação, a concentração de cada amostra será ajustada para 4 nM. ideal para o sequenciamento.

3.5 Sequenciamento Illumina e processamento das sequencias

O sequenciamento de nova geração (NGS) será realizado no equipamento de MiSeq Personal Sequencer (Illumina) pelo workflow Metagenomics, com dois kits MiSeq Reagent v2 (300 ciclos) com capacidade para gerar 15 milhões de reads cada. Com o software CLC Microbial Genomics Module (Qiagen) foram realizadas as análises secundárias, seguindo as orientações do manual do usuário.

3.6 Análise da taxa de pupação

Estudos concentram-se na análise de fitness a partir da interação da microbiota intestinal de mosquitos adultos, entretanto outras observadas em estágios larvais podem explicar a variação natural de características adultas. Um fator muito utilizado para avaliação do fitness é a taxa de pupação em diferentes tratamentos como, por exemplo, presença de matriz e degradação da matriz peritífica. Será comparado a taxa de crescimento (ou seja, a inclinação da fase exponencial) e o tempo que levará para que 50% das larvas entrem em estágio de pupa. A taxa de pupação será determinada pela contagem do número de pupas por dia em três frascos replicados em três experimentos independentes. A significância estatística das diferenças aos pares na taxa de pupação entre os tratamentos será determinada usando um modelo de três parâmetros para comparar a inclinação da fase exponencial assim como visto na literatura (Dickson, 2017).

4. Especificações metodológicas

4.1 Teste de sobrevivência larval

Para atingir a concentração constante de 100 μ M da substância para degradação da matriz peritífica larval e meconial (mecPM) foi necessário tratar larvas em um pequeno volume, portanto, foram feitos testes de sobrevivência com o objetivo de alcançar a concentração desejada com pouca massa de reagente (polioxina D) visando obter um número suficiente de organismos tratados.

Portanto foram feitos testes de sobrevivência de larvas em placas de 24 poços (Figura III), utilizando respectivamente 10, 15 e 20 larvas por poços a partir do estágio L3 tratados em 2 ml de AUP (água ultrapura) e 20 microlitros de uma solução de ração de peixe diluída TetraMin (Tetra©) em AUP, para o preparo desta solução foram adicionados 1mg da ração utilizada para 25 mL de água em intervalos de 1 dia. Além disso os poços foram marcados em um nível fixo de 2ml de água para observar a evaporação.



figura V: Imagem realizada pela autora durante o teste de sobrevivência larval, onde utilizando uma placa de 24 poços foram distribuídas as respectivas quantidades de 10, 15 e 20 larvas (4 poços cada) utilizando um total de 12 poços e respectivamente 40, 60 e 80 larvas por tratamento.

Baseado nos resultados obtidos no primeiro teste (teste de 24 poços) foram feitos testes utilizando placas de 6 poços com o objetivo de garantir um semelhante número de indivíduos e melhorar a qualidade do experimento, portanto foram usados 33 larvas por poço utilizando 5 ml de AUP e 50 μ l da mesma concentração de ração de peixe utilizada no primeiro teste o experimento. Para a preparação da solução de ração foi utilizado 0,5gr de ração triturada solubilizadas em 25 ml de água miliQ, a solução foi previamente autoclavada.

4.2 Tratamento larval com polioxina D

Para o tratamento das larvas com polioxina D foi utilizado a metodologia padronizada pela autora a partir do teste de sobrevivência larval realizado em placas de 6 poços (previamente realizado). Foi preparada uma solução estoque 0,01M a partir de pó em AUP e adicionado a ração de peixe em uma concentração final de 100 μ M (Figura VI). Um volume igual com AUP apenas foi adicionado à refeição do grupo controle.

Portanto as larvas foram tratadas do terceiro instar larval (L3) até o estágio de pupa em concentração de 100 μ M de polioxina D, em placas de 6 poços com 5 ml de solução por poço. Diariamente foram adicionados 50 μ l de ração diluída e o volume de solução perdida durante a evaporação era repostado, mantendo a concentração desejada.



Figura VI: Imagem esquemática realizada pela autora, representa as diluições realizadas e as respectivas concentrações resultantes dessas diluições, com o objetivo de manter o tratamento das larvas em polioxina D a uma concentração constante de 100µM.

4.3 Dissecção de larvas (L3 e L4), pupas e mosquitos adultos (machos e fêmeas)

Antes da dissecção, todo o material utilizado ficou por aproximadamente 20 min em U.V., as pinças foram autoclavadas juntamente com o material preparado previamente com PBS 1x e água milli-Q. Para evitar contaminação durante a dissecção do material EPI's como luvas, jaleco e máscaras descartáveis foram utilizados.

Os diferentes estágios de desenvolvimento dos mosquitos a serem dissecados (L3, L4, pupa e mosquitos adultos) passaram por um processo de lavagem, suas superfícies foram assepsiadas através da imersão individual em etanol a 70% (v/v) por 3 minutos, seguida de cinco enxagues em tampão fosfato-salino-estéril (PBS) 1x por 2 minutos cada enxague, pois, dessa forma, o material isolado dos intestinos não sofreu interferência da microbiota superficial externa do mosquito. As pinças foram lavadas em álcool 100% e 2 enxagues água milli-Q após cada dissecção e autoclavadas para utilização de grupos diferentes. A dissecção foi realizada com o auxílio de um protocolo padrão através de um microscópio estereoscópico Stemi DV4 (Carls Zeiss) (Coleman & James, 2007).

Figura VII: Imagem de uma dissecação intestinal de *Aedes aegypti* fêmea em estágio adulto se desenvolvimento, é possível observar anatomicamente o intestino anterior, médio (porção dilatada) e posterior coberto pelos túbulos de malpighi. Dissecação realizada pela autora.

A dissecação de larvas em estágios L3 e L4, pupas e adultos foram feitos com o objetivo de observar o efeito da polioxina D sobre a matriz peritrófica tipo II e matriz peritrófica



meconial formadas no intestino médio. Para a obtenção de adultos recém emergidos com matriz peritrófica meconial presente foram coletados mosquitos com menos de 24 horas após a mudança de pupa para mosquitos adultos, machos e fêmeas foram coletados em proporções idênticas com o objetivo de identificar a influência do sexo no tratamento. Cada intestino dissecado foi mantido em tampão ATL do kit de extração de DNA "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen) em -20°C.

4.4 Observação da estrutura da matriz peritrófica com a utilização de Calcoflúor

Com o objetivo de observar a ação da polioxina D nos diferentes pontos (estágios de desenvolvimento) na formação da matriz peritrófica. Foi utilizado a substância Calcofluor White Stain (SIGMA-ALDRICH) seguindo recomendações do fabricante, devido a capacidade da substância de emitir fluorescência quando excitado com ondas U.V. Primeiramente o material dissecado foi posicionado em uma lâmina limpa, em seguida foi adicionado na mesma proporção (5 µl) Calcoflúor White Stain e uma solução previamente preparada de hidróxido de potássio a 10% e a estrutura marcada foi observada com o auxílio de um microscópio confocal de fluorescência U.V. com comprimento de onda de excitação x100 a x400.

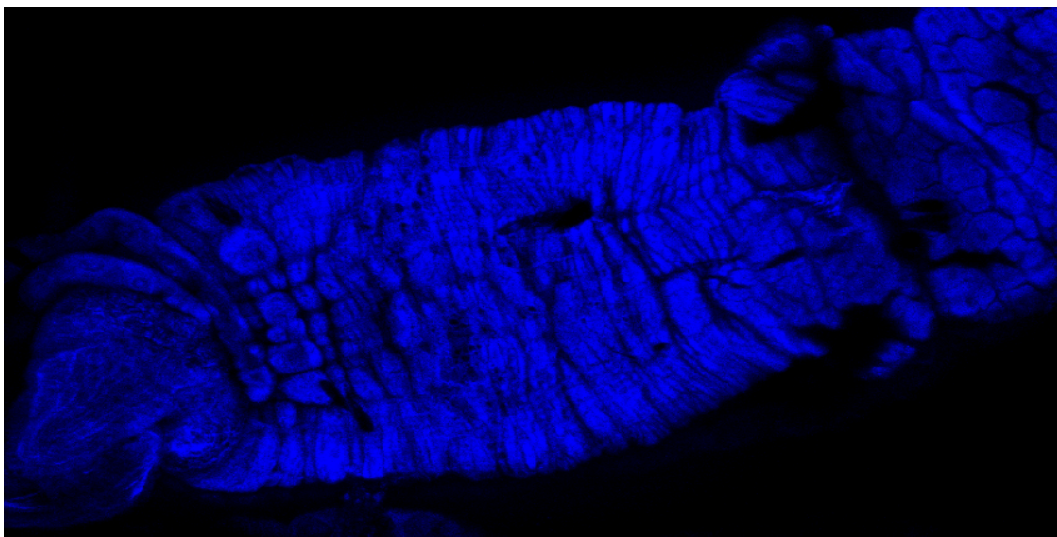


Figura VIII: Imagem realizada pela autora, refere-se a região do intestino médio de uma larva em quarto estágio de *Aedes aegypti* não tratado com polioxina D.

4.5 Extrações de DNA

Os intestinos dissecados foram mantidos em pool de 5 intestinos para 180 μ L tampão ATL do kit de extração de DNA "DNeasy Blood & Tissue" (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente foram adicionados 20 mL de proteinase K, misturados por vortex e incubados 56°C por 1 hora. Foram adicionados 200ml de etanol (96-100%) e misturados. O líquido foi transferido para coluna e centrifugados a 8000 rpm durante 1 minuto, em seguida foi descartado o líquido do tubo de coleta e adicionado 500 mL de Tampão Buffer AW1, novamente centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm e descartado o líquido do tubo de coleta. Posteriormente, foi adicionado 500 mL de Tampão Buffer AW2, centrifugado por 3 minutos a 14000 rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo de 2 mL e adicionado 100 mL de tampão AE ao centro do filtro, incubado à temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto e centrifugado 8000 rpm por mais 1 minuto. As amostras extraídas foram armazenadas a -20°C.

4.6 Preparos das bibliotecas

Utilizamos a técnica de reação em cadeia polimerase (PCR) para a amplificação do gene 16S rRNA, utilizando-se pares de primers que compreendem a região hipervariável V4 (Caporaso et al., 2012). As reações foram realizadas em triplicata técnica. Utilizamos 10 μ l

de DNA molde, uma quantidade acima do que normalmente é utilizado devido à baixa concentração de bactérias no material isolado (cada amostra corresponde a 5 intestinos de mosquito *Ae.aegypti*). Foram utilizados os reagentes Tampão PCR 10x Taq Platinum (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), MgCl₂ 1,5 mM, 1 U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), dNTPs 2,5 mM (GE Healthcare), 1 µL de cada primer forward e reverse (10 pmol/µL), resultando num volume final de 25 µL. Os primers utilizados no método definido por Caporaso et al. (2010) foram idealizados especificamente para análises de microbioma bacteriano a partir do rRNA 16S, presente na subunidade menor do ribossomo bacteriano. Os primers utilizados nessa 14 estratégia foram separados em 5 diferentes regiões: a primeira é do adaptador Illumina; a segunda é do índice referente à amostra; a terceira e a quarta são sequências estabilizadoras entre as sequências anteriores e a do primer; e a quinta é a região do primer referente à região constante do RNA ribossomal 16S. O primer forward (F) é o mesmo para todas as amostras e não possui a segunda região descrita (515F

5'AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGTGTGCCAGCMG
CCGCGGTAA 3').

Cada amostra foi amplificada com um primer reverse diferente. As amplificações foram realizadas no termociclador Mastercycle Nexus X2 (Eppendorf), iniciando em 94°C por 3 min, seguidas de 40 ciclos de 94°C por 45 s (desnaturação), 60°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 1 min e 30 s (extensão), finalizando em 72°C por 10 min. Os fragmentos de amplificados foram visualizados em transiluminador UV em géis de agarose a 2%, corados com HydraGreen (Actgene) (Figura IX).



Figura IX: Imagem realizada pela autora, retrata os fragmentos amplificados observados a partir de um transiluminador UV em gel de agarose. Amplificação do microbioma de

mosquitos adultos machos e fêmeas tratados com a substância polioxina a partir do terceiro instar larval.

4.7 Purificações dos produtos do PCR de microbioma

As bibliotecas geradas foram purificadas com o sistema de partículas magnéticas, ou beads magnéticas (AMPure Agencourt) e um suporte magnético (Magnetic Stand – Life Technologies). Ao homogeneizar as partículas com o material amplificado, todo o DNA se manteve ligado às partículas. Em seguida, a placa contendo o homogeneizado foi posicionada sobre o suporte magnético de modo que as partículas/ se agrupem na parede do recipiente formando um pellet. Nesta etapa, todo o sobrenadante foi descartado, e duas lavagens com álcool 70% foram realizadas. Para a dissociação do DNA das partículas magnéticas foi adicionado 40 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen) ao pellet.

4.8 Quantificação do produto de PCR purificado por qPCR

As bibliotecas purificadas foram quantificadas no aparelho StepOnePlus™ RealTime PCR (Applied Biosystems®). Após uma diluição necessária em solução Tris-HCl (10 mM) e Tween 20 (0,05%) de concentração final de 1:10⁴ de cada amostra.

Três padrões foram utilizados para a confecção de curvas de referência, que delimitam os valores esperados da quantificação. Para cada amostra foi quantificada em triplicata, utilizando 4,0 µl de cada amostra diluída e 16 µl de solução preparada com fluorescência, fornecida pelo kit de quantificação NEBNext® DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina®. A técnica utiliza *primers* que se anelam aos adaptadores Illumina presentes nas amostras. Após a quantificação, a concentração de cada amostra foi ajustada para 4 nM, ideal para o sequenciamento.

4.9 Preparo do cartucho de sequenciamento Illumina

Variações na concentração de DNA amplificado em cada amostra podem influenciar a qualidade da reação de sequenciamento e, conseqüentemente, influenciam no resultado, portanto para que isso não ocorra foi necessário ajustar a concentração de todas as amostras para 2,0 nM. Além disso 5,0 µl de cada amostras ajustadas (2,0 nM) foram adicionados em um pool (união de amostras individuais), após essa

etapa, 5,0 µl deste pool com todas as amostras foram combinados com uma solução de NaOH 0,2 N recém preparada e tampão Hyb, obtido no kit MiSeq Reagent Nano v2 (300 ciclos), obtendo-se ao final um pool de bibliotecas à 10 pM. Este conteúdo foi adicionado ao cartucho (kit MiSeq Reagent Nano v2), foram adicionados 3 primers (sentido, index sequence e anti-sentido) que correspondem às sequencias de adaptadores necessários para o sequenciamento (Caporaso et al., 2012).

4.10 Sequenciamento Illumina e processamento das sequencias

O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq Personal Sequencer (*Illumina*) do Departamento de Genética/IBB/Botucatu, pela workflow *Metagenomics*, com dois kits MiSeq Reagent v2 (300 ciclos) com capacidade para gerar 15 milhões de reads cada. Os dados foram pré-processados pelo software MiSeq Report, gerando arquivos no formato fastq e de multiplexados. Com o software CLC Microbial Genomics Module (Qiagen) foram realizadas as análises secundárias, seguindo as orientações do manual do usuário. Para o pareamento de *reads* foram utilizados os parâmetros: *Mismatch cost*: 2; *Minimum score*: 8; *Gap cost*: 3; *Maximum unalignment and mismatches*: 0; seguido da fixação do comprimento de *reads*. Será realizada uma filtragem de amostras para que todas tivessem o valor mínimo de 100 reads e porcentagem mínima de distância da mediana de 50%. A clusterização de OTU (*operational taxonomic unit*) é feita com o banco de dados SILVA com similaridade de 97% entre as sequencias. *Reads* com menos de 0,1% do total de *reads* clusterizadas com o banco de dados, em cada amostra, não serão consideradas para a análise.

4.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas serão realizadas de forma complementar nos *softwares* CLC Microbial Genomics Module (Qiagen) e R (v.3.2.3), utilizando os parâmetros de alfa e beta diversidade. A primeira é um parâmetro utilizado nas análises de microbioma para identificar se cada amostra do estudo é representativa para serem posteriormente comparadas, enquanto a segunda estima as diferenças de OTUs entre as amostras do estudo. Para o cálculo de α -diversidade será realizada a construção de uma árvore filogenética com as 100 OTUs mais abundantes da análise usando o método *Maximum Likelihood* que se baseia no alinhamento múltiplo de sequencias pelo *software* MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by*

LogExpectation) pelo software CLC Microbial Genomics Module. Os valores de alfa-diversidade serão calculados pela medida de Shannon, com o pacote *phyloseq* (v. 1.14.0) de R (v.3.2.3). Para estimar as diferenças realizaremos uma análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando a medida de Bray-Curtis, com o pacote *vegan* (v.2.4.1) de R (v.3.2.3). Para completar os dados de β -diversidade será realizada a análise PERMANOVA (*Permutational multivariate analysis of variance*) no software CLC Microbial Genomics Module.

4.12 Análise da taxa de pupação

Para este experimento foram utilizados um total de 99 larvas tratadas com a substância polioxina D, subdivididas em 3 independentes grupos de 33 larvas por poço, o mesmo número também foi feito para o grupo controle (Figura X).



Figura X: Imagem realizada pela autora, indica o tratamento com a substância polioxina D em larvas a partir do terceiro ínstar de desenvolvimento em placas de 6 poços, contendo a concentração específica de 100 μ M em 5 ml de solução por poço, o tratamento foi realizado em triplicata, totalizando um número amostral de 99 larvas tratadas.

Diariamente as larvas que realizaram mudas do quarto estágio para o último estágio aquático de desenvolvimento (pupas) eram coletadas e separadamente mantidas em 3 diferentes gaiolas, de acordo com o poço no qual foram mantidas em tratamento durante seu desenvolvimento larval, alimentadas a partir de uma solução autoclavada de sacarose a 10%

(Figura XI), o mesmo foi feito em relação ao grupo controle, para dar início a análises posteriores como morfometria alar, longevidade, fecundidade e taxa de eclosão.

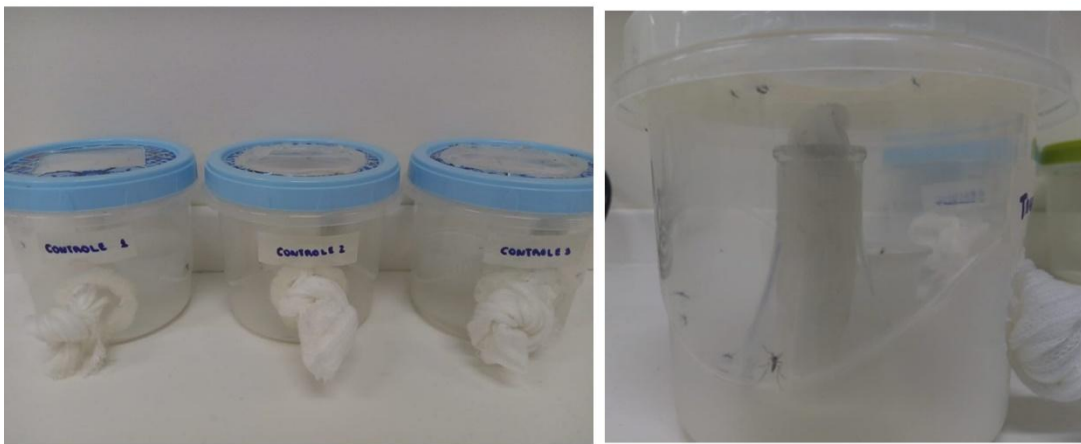


Figura XI: Imagem realizada pela autora, indica a separação realizada em triplicata de pupas dos grupos tratado e controle, respectivamente. Mantidos em condições padrões de insetário a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $80\pm 10\%$, fotoperíodo de 12 h/12 h e alimentados com sacarose a 10%.

5.Resultados e Discussão

5.1. Resultados do teste de sobrevivência larval

Ao decorrer do teste de sobrevivência larval foram observadas duas diferentes variáveis e estas foram em relação ao número de mortes e variações nos estágios de desenvolvimento, ambas as variáveis foram observadas durante um período de 12 dias e diariamente verificadas.

O primeiro teste realizado um teste realizado em placas de 24 poços, em que nestes 12 poços foram utilizados e em cada um foi adicionado um volume de 2mL de AUP (água ultrapura) e Nestes poços foram adicionadas diferentes quantidades de larvas sendo estas 10, 15 e 20 larvas em quadruplicatas a partir do terceiro estágio de desenvolvimento (L3), com o objetivo de averiguar qual seria o menor volume que comportaria uma maior quantidade de larvas, mantendo um suficiente número de indivíduos e atingir com facilidade a

concentração constante de 100 μ M da substância para degradação da matriz peritrófica larval e meconial (mecPM).

Em relação aos estágios de desenvolvimento dos grupos tratados em 2mL foi possível observar um atraso no desenvolvimento larval em relação ao grupo controle sem estresse devido á pouco volume ou aglomeração, ou seja, em condições laboratoriais normais que variam entre um período de 2 a 3 dias por estágio durando em cerca de 7 a 10 dias, sendo o estágio de pupa o mais curto durando em torno de 2 dias até o estágio adulto (Silva et al., 2018).

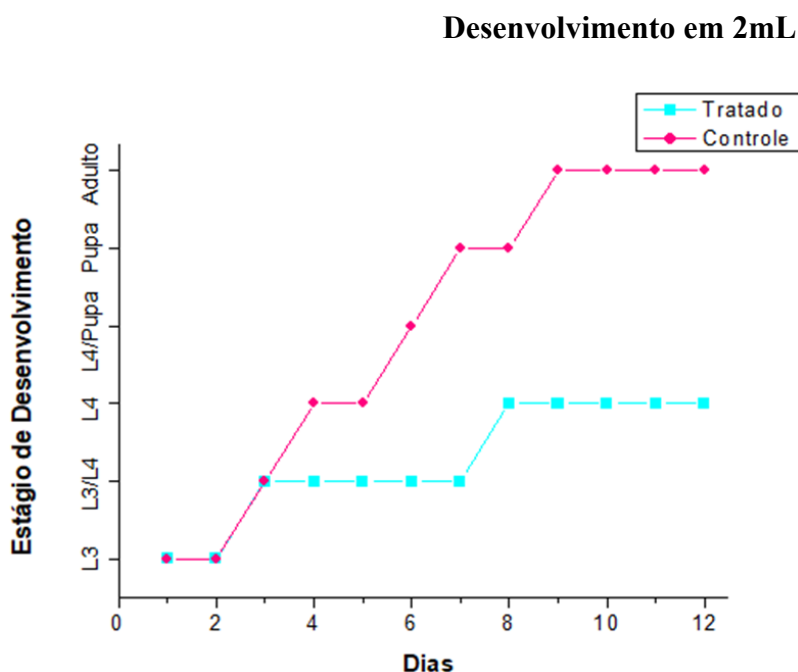


Gráfico I: O gráfico mostra a mudança de estágio de desenvolvimento a partir de L3 até mosquitos adultos nas larvas tratadas em apenas 2mL de água (azul) em relação ao grupo controle que foi mantido em condições laboratoriais normais (rosa), é possível observar o atraso no desenvolvimento pois o grupo tratado não manifestou estágios de pupa ou mosquitos adultos ao longo do experimento, mantendo-se em terceiros e quartos estágios larvais de desenvolvimento.

Devido a este resultado foram feitos testes em placas de 6 poços, sendo que destes 4 poços foram utilizados e em cada um foi adicionado 5mL de AUP (água ultrapura) e 33 larvas foram adicionadas em cada poço, com o objetivo de alcançar um maior rendimento e verificar alguma melhora no tempo de desenvolvimento do grupo tratado.

Uma segunda variável foi verificada ao decorrer dos dois diferentes tratamentos (2mL e 5mL), com o objetivo de constar se ambos os tratamentos possuiriam alguma atividade

larvicida e se possivelmente poderiam influenciar negativamente na obtenção de um número suficiente de organismos tratados, esta variável foi a sobrevivência larval, demonstrada através da realização de um gráfico de sobrevivência.

Com isso foi possível verificar que o tratamento das larvas em volume de 2mL independentemente do número de lavras adicionados (10, 15 ou 20) obtiveram uma mortalidade acima de 10% podendo ser prejudicial ao rendimento do experimento. Contudo o tratamento em 5ml se mostrou mais eficiente com uma mortalidade abaixo de 10%.

Desenvolvimento em 5mL

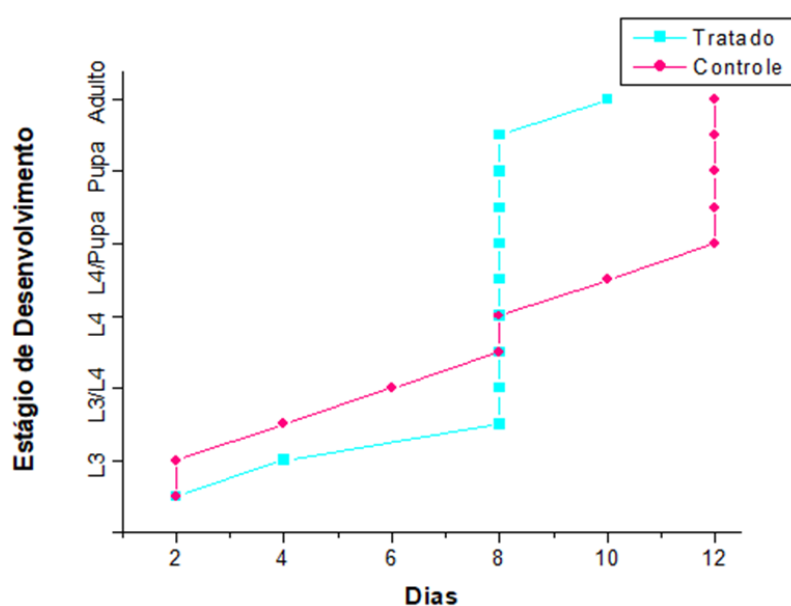
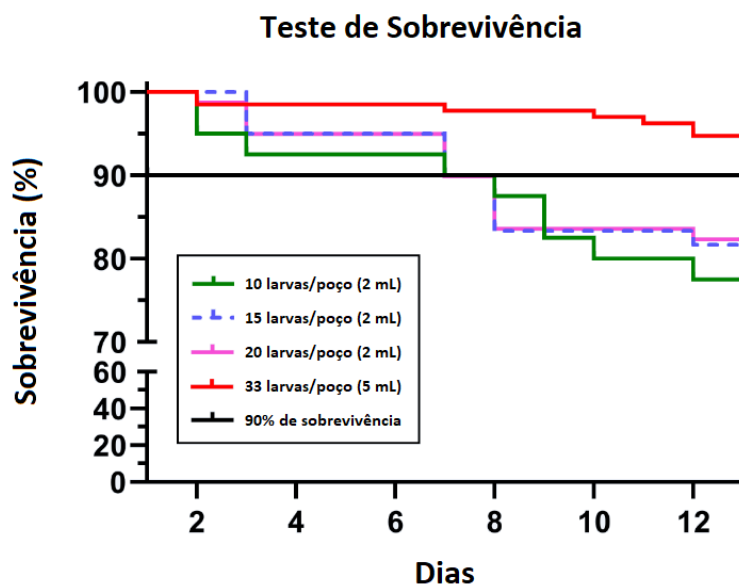


Gráfico II: Gráfico mostra a mudança de estágio de desenvolvimento a partir de L3 até mosquitos adultos nas larvas tratadas em um volume de 5mL de água (azul) em relação ao grupo controle que foi mantido em condições laboratoriais normais (rosa), entretanto neste experimento o grupo tratado se desenvolveu rapidamente alcançando estágios de pupa e mosquitos adultos.



Gáfico III: O gráfico de sobrevivência compara os tratamentos em volumes de 2mL com diferentes quantidades de larvas por poço (10, 15 e 20) com o tratamento em 5mL com 33 larvas por poço, evidenciando a eficiência deste último representado pela linha vermelha que encontra-se acima da linha preta representando uma mortalidade de 10%.

Devido ao tratamento em volumes de 5mL ter se mostrado mais efetivo tanto em termos de desenvolvimento de estágio quanto em termos de mortalidade este foi escolhido para dar início ao experimento sendo utilizado como base para o tratamento com a substância polioxina D. Totalizando um número de 160 intestinos ao longo do experimento, referentes a 80 intestinos grupo controle e 80 intestinos do grupo tratado com a substância polioxina D, subdividido em pools de 5 intestinos por amostra.

5.2. Resultados do tratamento dos grupos larvais (L3 e L4), pupa e adultos recém emergidos com Polioxina D

O tratamento com a substância polioxina D foi realizado após os testes de sobrevivência baseados nos resultados obtidos, os mosquitos foram tratados a partir dos estágios L3 até os estágios de pupa em uma solução de 100µM em meio líquido sendo repostos quando perdidos por evaporação, e um volume equivalente de AUP (água ultrapura) foi adicionado no grupo controle, uma solução de ração foi adicionada até o quarto estágio de desenvolvimento.

Para verificar a interação da polioxina D com a matriz peritrófica do topo II (PM2) indivíduos em estágios larvais foram dissecados devido a esta estrutura se mostrar presente desde os primeiros estágios de desenvolvimento (Lehane, 1997) e para identificar a interação da substância com a matriz peritrófica meconial (mecPM) indivíduos em estágios de pupa e mosquitos adultos com menos de 24 horas foram dissecados pois a estrutura será desenvolvida durante este período (Moll et al., 2001). Parte das disseções foram aleatoriamente selecionadas em todos os grupos tratados e observadas a partir de fluorescência com Calcofluor White Stain (SIGMA-ALDRICH) seguindo recomendações do fabricante a fim de observar a degradação dos diferentes tipos de matriz peritróficas citados pela polioxina D em comparação com o grupo controle (não tratado com a substância), outra parte do material dissecado foi separado para estudos de microbioma que serão futuramente realizados com o intuito de observar a interação da microbiota intestinal com a estrutura.

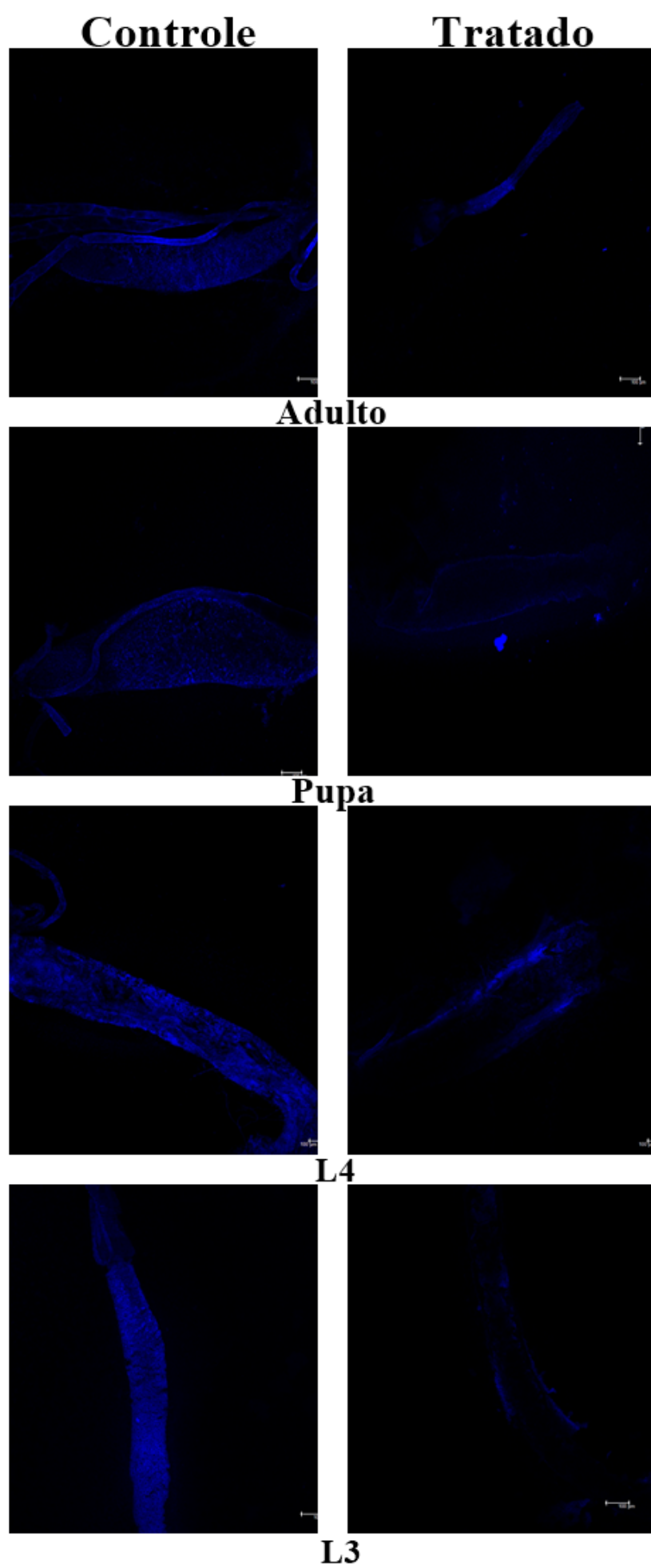


Figura XII: A imagem realizada pela autora a partir da fluorescência manifestada por Calcofluor White Stain (SIGMA-ALDRICH) estruturas quitinosas manifestadas em tonalidades azuladas encontradas nas dissecções intestinais dos diferentes grupos, sendo eles: machos adultos dissecados em períodos inferiores a 24 horas, pupas e larvas em terceiro e quarto estágio larval (L3 e L4) em grupos tratados e não tratados (controle) com a substância polioxina D de acordo com a legenda.

Ao observarmos o padrão de fluorescência foi notado uma possível degradação da matriz peritrófica com o tratamento utilizando polioxina D, esta etapa é primordial e de extrema importância para obtermos respostas futuras e completarmos nossos objetivos. Pois devido a degradação da estrutura poderemos estudar a interação da microbiota intestinal em com a matriz peritrófica (PM) em *Aedes aegypti* a partir da caracterização das espécies, famílias e ordens bacterianas encontradas em grupos que sofreram degradação em comparação com os grupos que não sofreram degradação da estrutura.

5.3 Microbioma

5.3.1 Panorama do microbioma de larvas em estágio 3 (L3)

O estágio larval 3 foi o primeiro a ser estabelecido e escolhido para o início do tratamento com a substância polioxina D com o intuito de degradar a matriz peritrófica do tipo II, como dito anteriormente a matriz tipo II (PM2) é produzida em uma região especializada do intestino anterior chamada cárdia nos estágios iniciais (larvais), forma uma camada contínua, que está sempre presente. Após a realização do tratamento, extração de DNA, PCR de microbioma, quantificação por qPCR e sequenciamento os dados gerados foram processados via CLC e gráficos referentes a caracterização da microbiota desse grupo foram gerados.

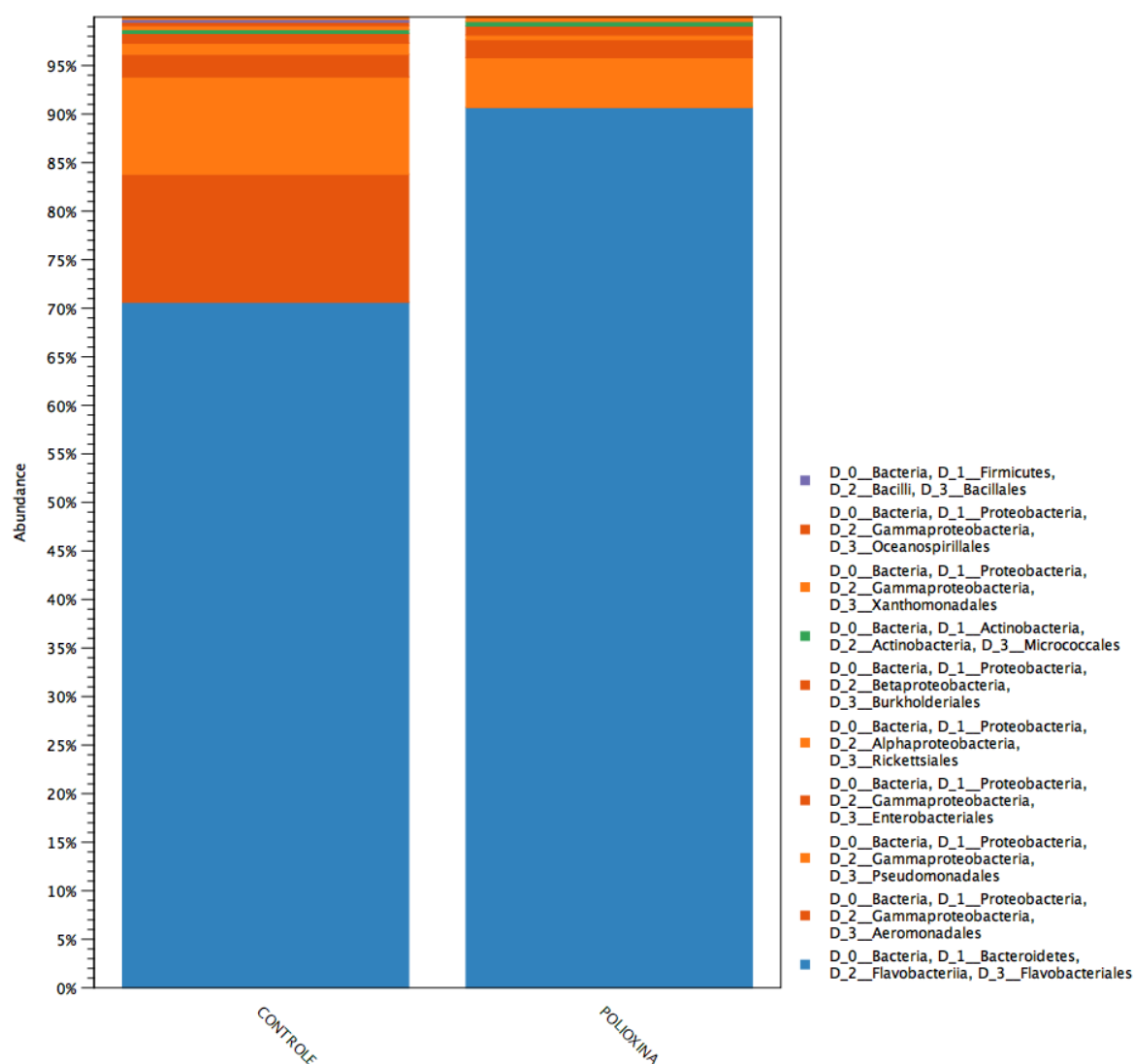
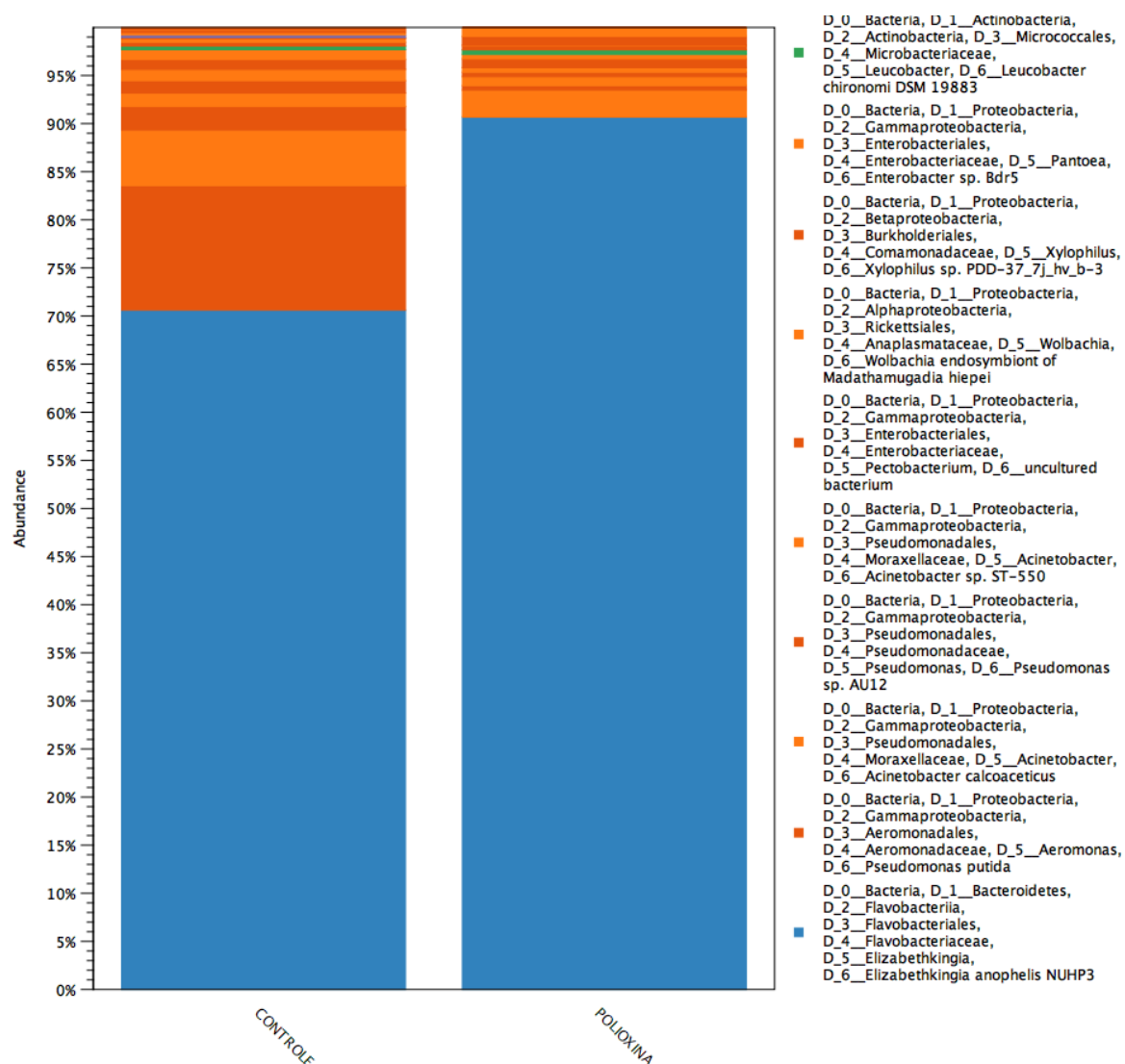


Gráfico IV: Imagem refere-se a microbiota de larvas em estágio de desenvolvimento 3 (L3) a nível de ordem. No eixo y podemos observar á direita a legenda referente a ordem das bactérias encontradas e á esquerda a porcentagem em sua abundância, já no eixo x observamos a caracterização da microbiota do grupo controle e tratado com a substância polioxina D, respectivamente.



Gáfico V: Imagem retrata a nível de espécie as bactérias encontradas no intestino médio de larvas em estágio 3 (L3) dos grupos controle e tratados com polioxina D em abundância.

Conseguimos observar a partir dos gráficos um aparente aumento qualitativo da diversidade microbiana intestinal do grupo controle em relação ao grupo tratado com polioxina, principalmente neste estágio de desenvolvimento larval inicial do tratamento. É possível verificar em ambos os gráficos representados acima uma maior presença representativa do grupo de bactérias Aeromonadales (*Pseudomonas putida*) que são bactérias consideradas chave para a manutenção de um ambiente microbiano de qualidade devido a sua versatilidade metabólica, em ambientes aeróbicos, obtendo um importante papel na reciclagem de resíduos orgânicos (Timms, 2002) podendo deduzir uma possível mudança ambiental gerando um cenário de estresse microbiano nos grupos tratados com a substância polioxina D.

5.3.2 Panorama do microbioma de larvas em estágio 4 (L4)

O estágio de desenvolvimento 4 de larvas de *Ae. Aegypti* precede o último estágio de desenvolvimento larval e, portanto, modo de vida aquático desses animais. Nesta etapa, assim como presente na etapa anterior a matriz peritrófica encontrada é do tipo II (PM2). Com o objetivo de degradar a PM2 realizamos o mesmo tratamento com a substância polioxina D com o intuito de verificar o panorama da microbiota intestinal durante a possível degradação dessa estrutura.

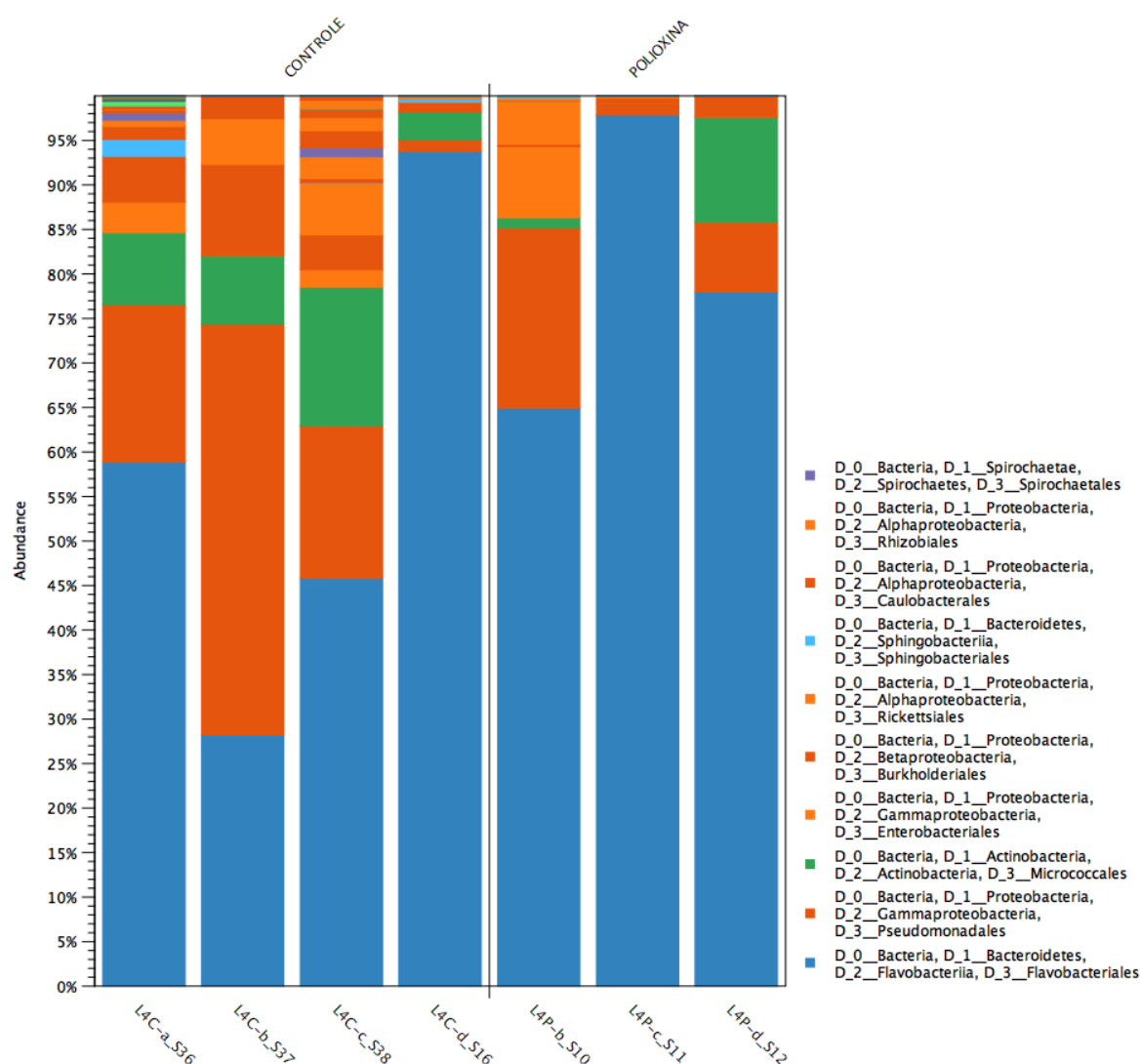


Gráfico VI: O Gráfico acima mostra a caracterização do microbioma de larvas em estágio 4 de desenvolvimento. No eixo Y mostramos as bactérias encontradas nesses animais a nível de ordem em abundância, no eixo X é possível verificar a caracterização de cada amostra

(que se refere a um pool contendo 5 intestinos cada) dos grupos controle e tratado, respectivamente.

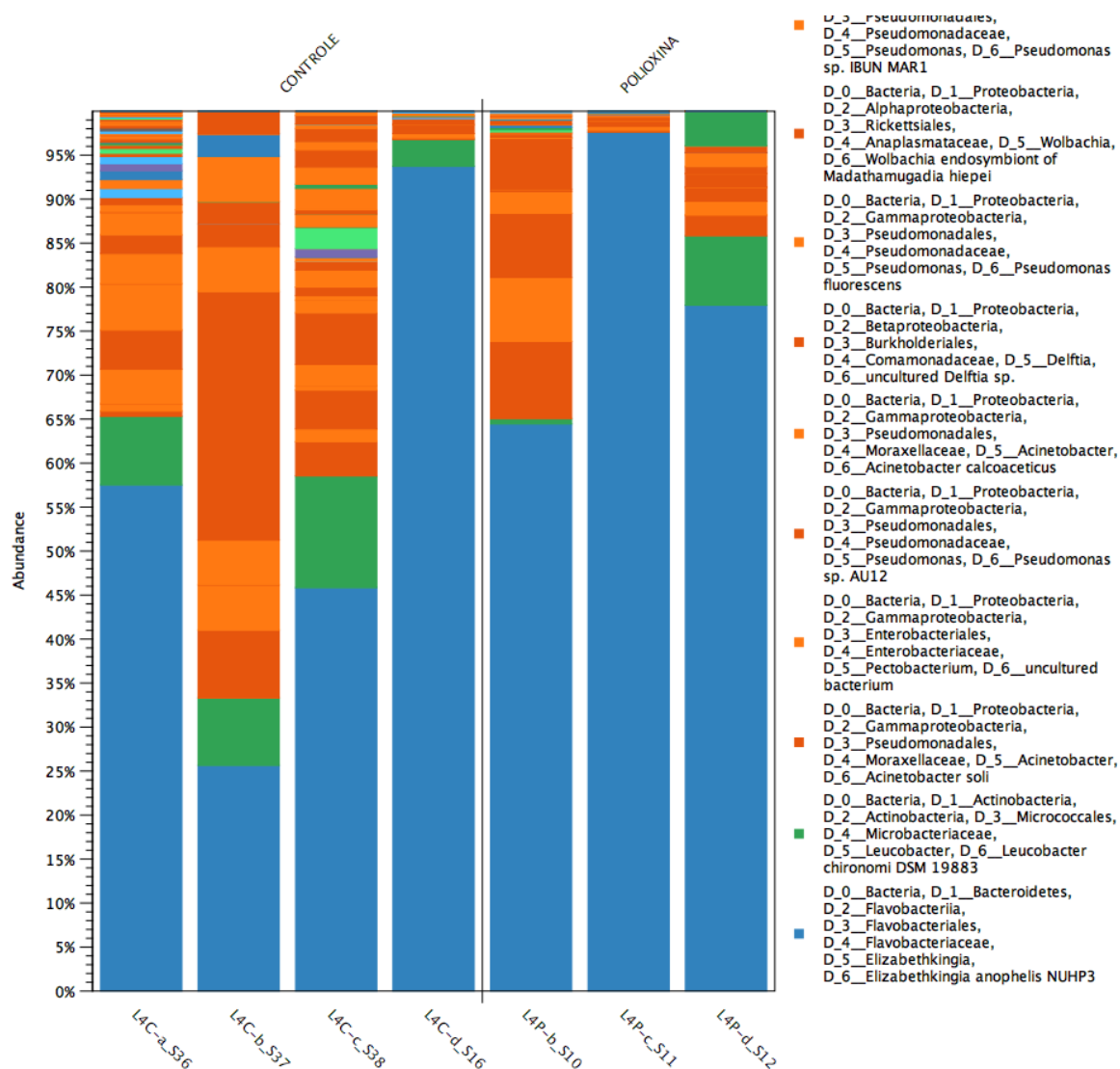


Gráfico V: A imagem mostra a caracterização do microbioma em larvas de estágio 4 á nível de espécie, no eixo Y é possível observar as espécies bacterianas em abundância e no eixo X as amostras dos intestinos em pool dos grupos tratados com a substância polioxina D e controle.

Da mesma forma que encontramos uma aparente diminuição na diversidade microbiana em grupos tratados com polioxina em estágio de desenvolvimento 3, também podemos observar esta diferença qualitativa em grupos de estágio larvar 4 (L4), mesmo que de maneira mais sutil, é possível observar uma mudança no cenário microbiano deste grupo, destacando a mudança decorrente não apenas do tratamento, mas também da mudança em relação ao estágio de desenvolvimento. Destacando nesta etapa o grupo bacteriano

Pseudomonadales (*Pseudomonas sp AU12*) que possuem uma dependência ao substrato oxidado (Mandelbaum et al., 1995) o que pode vir a ser uma certa alteração do substrato intestinal em relação ao tratamento com a substância polioquina, visto que, este grupo foi, em sua maior parte, encontrado em grupos não tratados com a substância.

5.3.3 Panorama do microbioma de larvas em estágio de pupa

O estágio de pupa é de extrema importância para o desenvolvimento da microbiota desses animais, é o último estágio que possui um modo de vida aquático, entretanto, durante esse estágio de desenvolvimento esses animais se abstêm em termos de alimentação e a matriz peritrófica encontrada é a do tipo meconial, como explicado anteriormente, essa matriz (mecPM1) é presente em torno do mecônio, que é caracterizado pelo epitélio degenerado do intestino médio das larvas e está relacionada a uma esterilização intestinal das bactérias durante a metamorfose de mosquitos como *Ae. Aegypti*. Contudo, realizamos a caracterização da microbiota desses animais durante esse estágio de desenvolvimento a partir do tratamento com a substância polioquina D com o objetivo de verificar a natureza dessa microbiota em contato com a degradação da estrutura da matriz meconial.

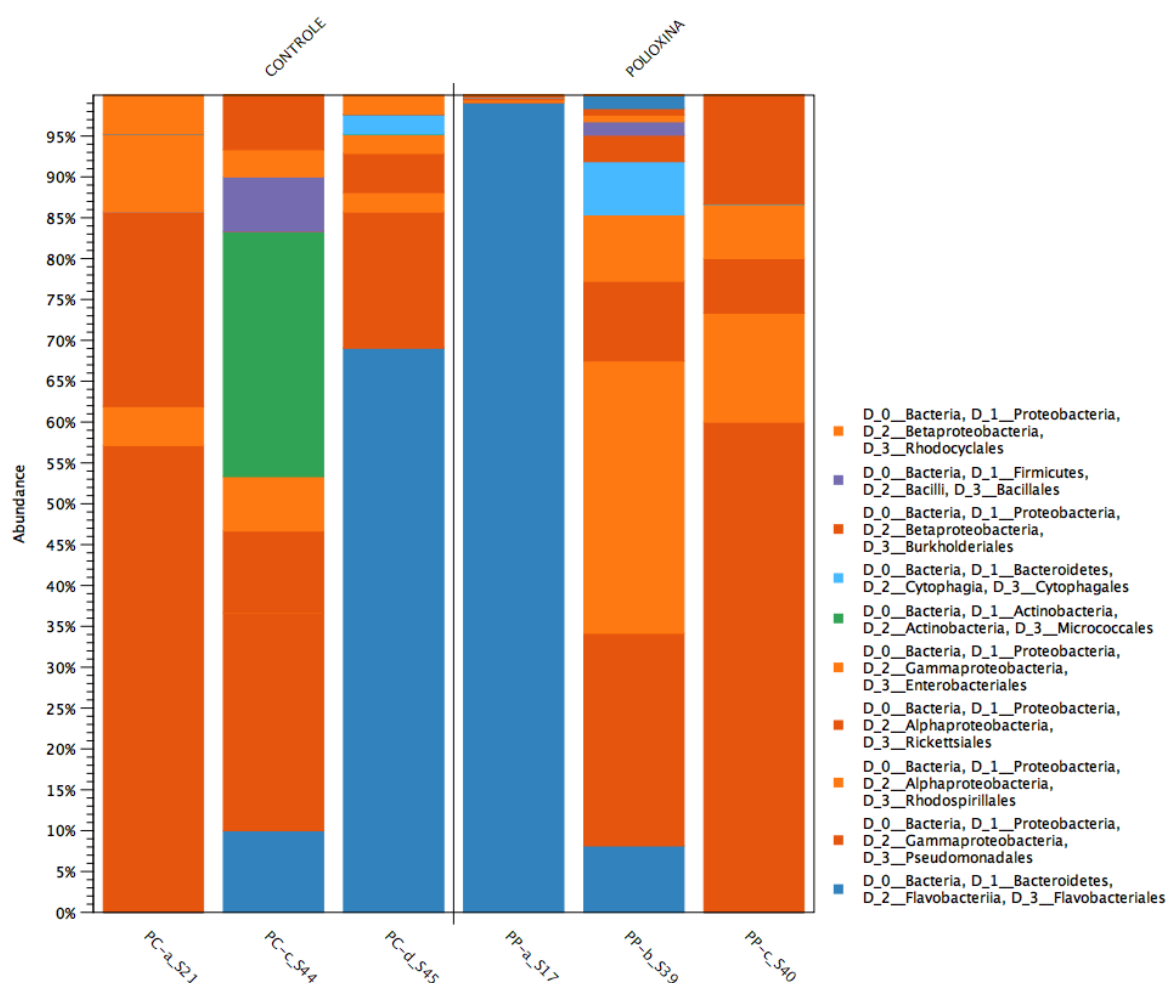


Gráfico VI: Gráfico mostra o panorama da microbiota de larvas em estágio de pupa dos grupos controle e tratado com a substância polioxinina D. No eixo Y é possível verificar a microbiota á nível de ordem em abundância, no eixo X é possível verificar as amostras em pool dos dois respectivos grupos.

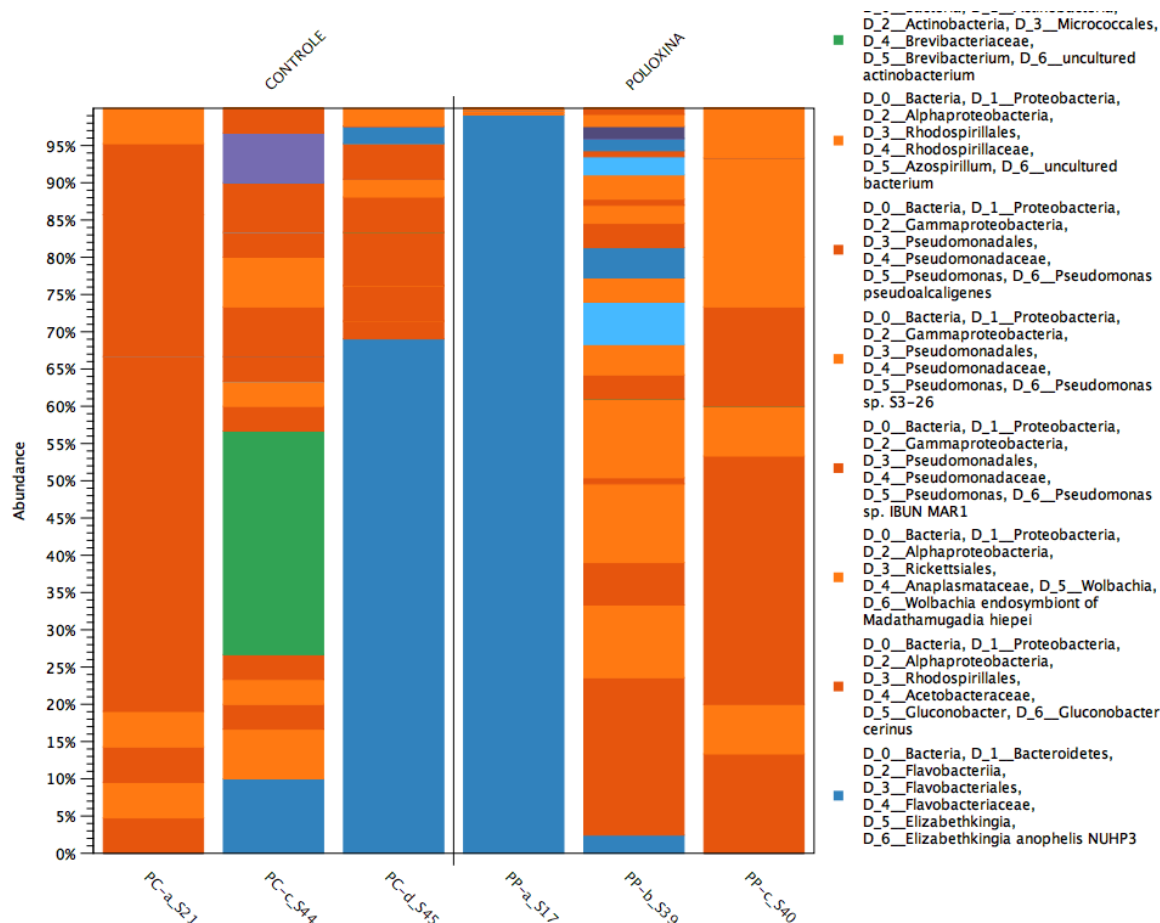


Gráfico VII: Gráfico mostra a nível de espécie a caracterização da microbiota de larvas em último estágio (pupa) é possível verificar essa caracterização em cada amostra de maneira individual, sendo que, cada amostra representada pelo eixo X representa um pool de 5 intestinos coletados tanto do grupo tratado com polioxina D quanto controle em abundância mostrados em forma de porcentagem.

Diferentemente dos resultados expostos em grupos anteriores de estágio de desenvolvimento, não foi possível verificar alguma aparente diferença na microbiota destes animais em estágio de pupa. Neste estágio a matriz peritrófica a ser estudada é a matriz do tipo meconial, formada a partir da distensão epitelial durante a muda de larvas em instar 4 e pupas ((Moll et al., 2001). Dada a diferença do tipo de matriz peritrófica a mudança do padrão encontrado até o estágio 4 é compreensível. Muitos estudos mostram que a matriz peritrófica meconial possui uma forte relação com a mudança da microbiota durante a metamorfose de mosquitos como *Ae. aegypti*.

5.3.4 Panorama do microbioma de adultos de *Ae. aegypti*

Adultos de *Ae. aegypti* possuem um hábito de vida terrestre, diferentemente dos estágios anteriores de desenvolvimento, esse fato pode influenciar diretamente na caracterização da microbiota desses animais. Realizamos da mesma forma um tratamento com a substância polioxina D e analisamos a microbiota desse grupo relacionando este tratamento com a possível degradação da estrutura da matriz peritrófica. Os mosquitos observados foram dissecados em um período de 12 horas após a emergência do estágio de pupa, portanto a matriz peritrófica aqui relacionada é a do tipo meconial (mecPM) presente em mosquitos recém emergidos em um período de até 24 horas.

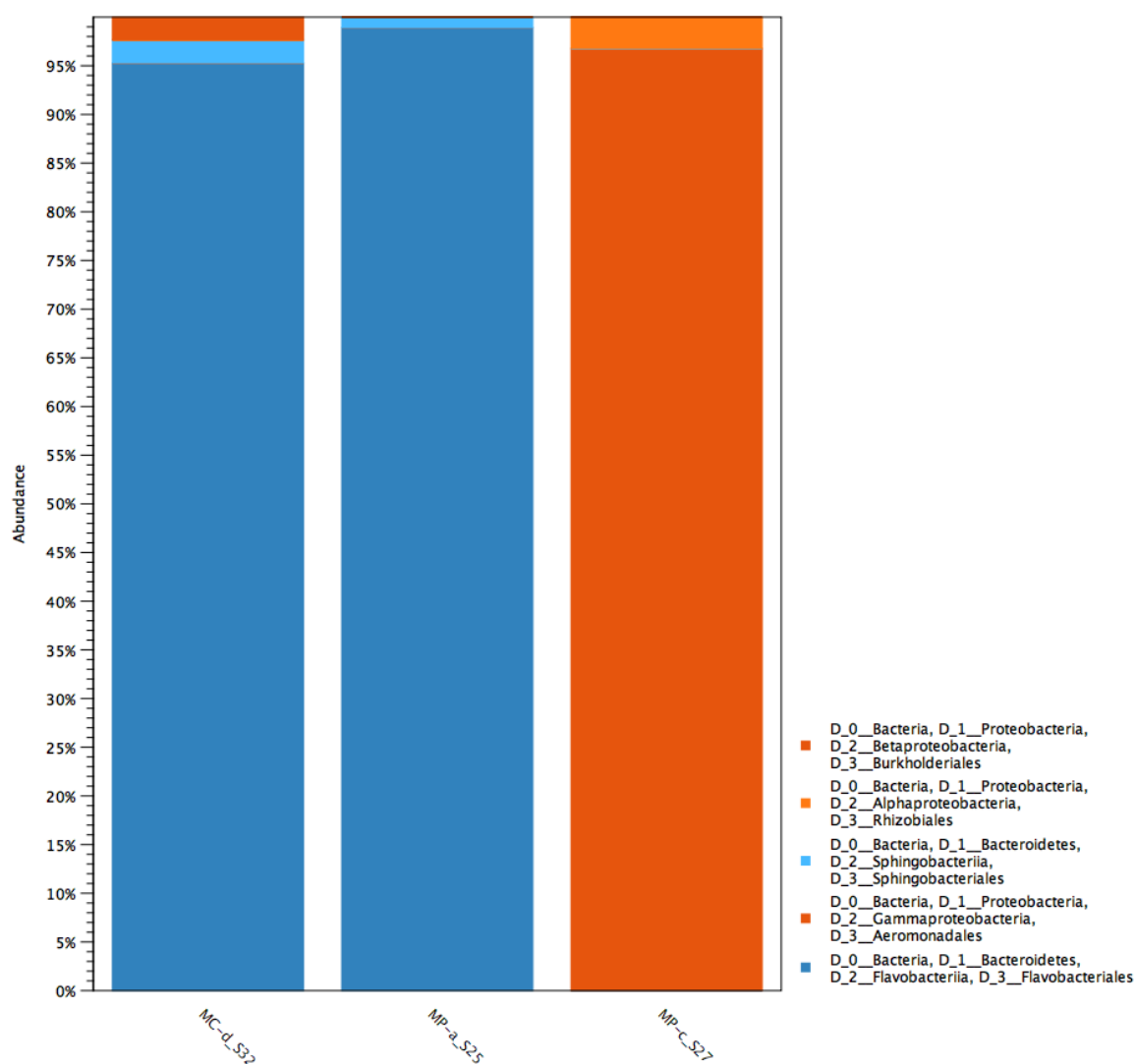


Gráfico VIII: Figura exemplifica a caracterização da microbiota de mosquitos adultos com 12 horas pós fase de pupa, cada amostra é referente a um pool de 5 intestinos, sendo que MC-d_S32 trata-se do grupo controle e MP-a_S25 e MP-c_S27 trata-se do grupo tratado com a substância polioxina D a nível de ordem.

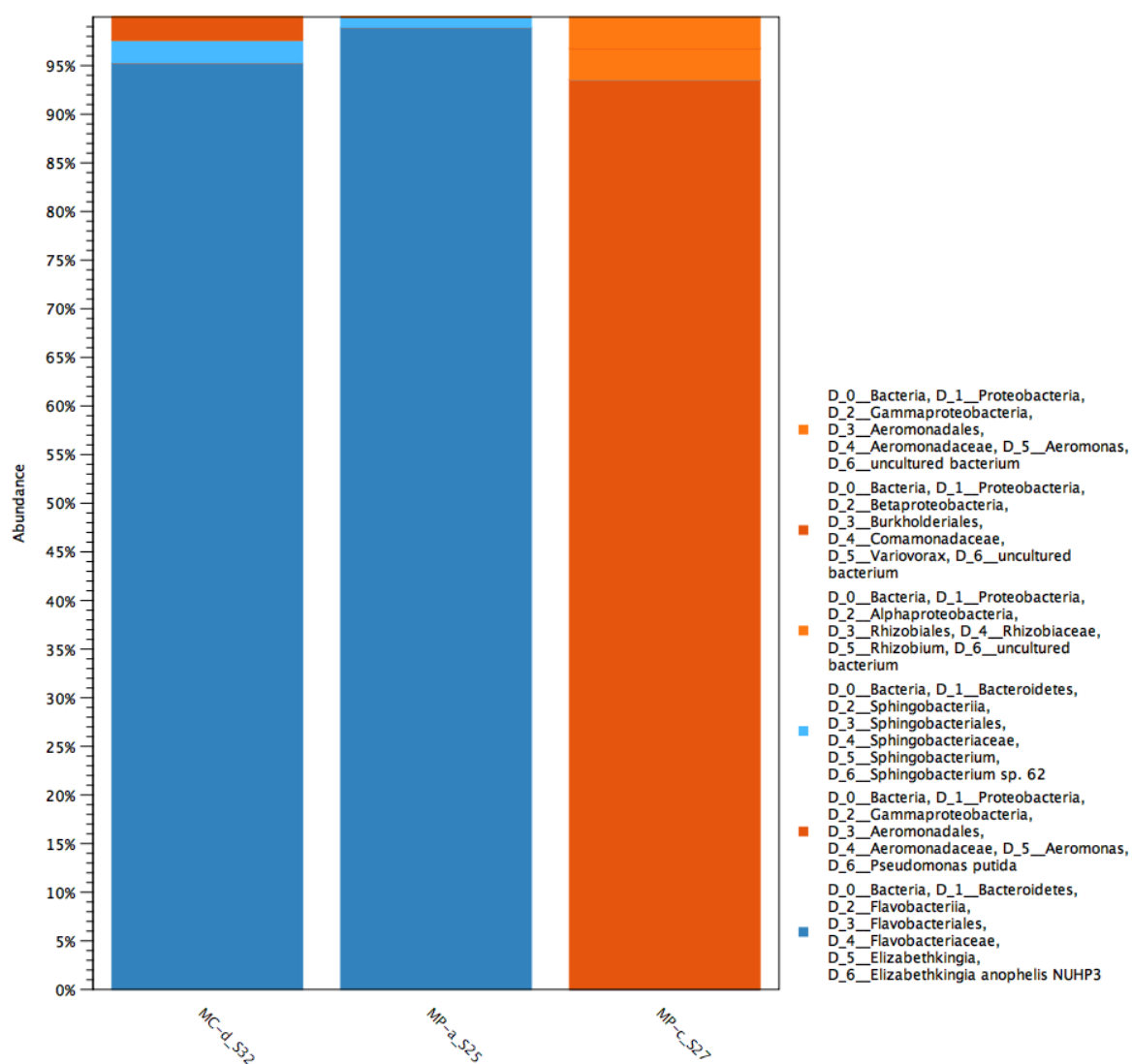


Gráfico IX: Gráfico mostra a nível de espécie a caracterização da microbiota de mosquitos adultos de *Ae. aegypti* em até 12 horas após estágio de pupa. é possível verificar essa caracterização em cada amostra de maneira individual, sendo que, cada amostra representada pelo eixo X representa um pool de 5 intestinos coletados tanto do grupo tratado com polioxina D (MP-a_S25 e MP-c_S27) quanto controle (MC-d_S32) em abundância mostrados em forma de porcentagem.

Em mosquitos adultos, neste período de 12 horas após emergência, podemos verificar a presença da matriz peritrófica meconial em condições naturais (grupo controle) e em condições de degradação (grupo tratado) visto nos gráficos, entretanto, devido aos parâmetros de análise do sistema CLC - Microbial Genomics Module (Qiagen) que utilizam

filtros nas análises de microbioma para identificar se cada amostra do estudo é representativa para serem posteriormente comparadas, a maior parte de nossas amostras foram bloqueadas por este sistema, principalmente neste último grupo a ser analisado. Estatisticamente não houve diferença quantitativa da microbiota em resultado ao tratamento com a substância polioxina D, entretanto estamos avaliando outros parâmetros para um melhor entendimento do impacto da matriz peritrófica no fitness e na competência vetorial.

5.4 Análise da taxa de pupação em resultado ao tratamento

Obtivemos resultados relacionados ao comportamento de pupação dos grupos que obtiveram suas mudanças de instares de desenvolvimento em contato com a substância polioxina D a 100 μ M e grupos controle, subdivididos em triplicata em gráficos.

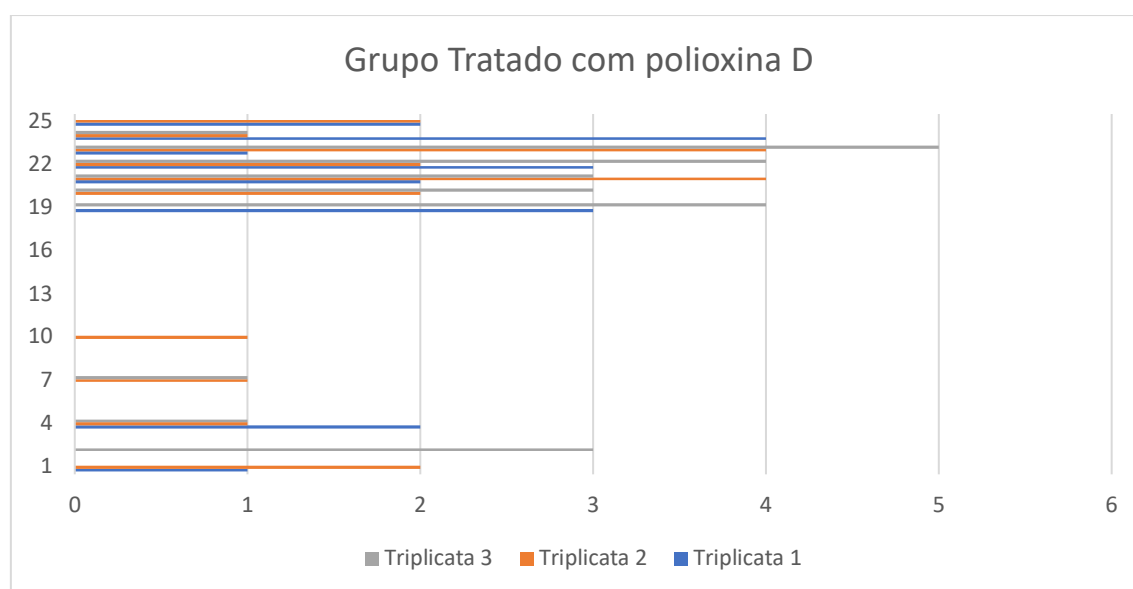


Gráfico X: Podemos observar no eixo Y a quantidade de dias analisados de 1 á 25, contabilizados após a primeira mudança de instar de desenvolvimento de larvas em estágio 4 (L4) para pupa relatado. No eixo X destacamos a quantidade de pupas que sofreram essa mudança de estágio, em cinza está descrito o panorama da taxa de pupação do primeiro grupo, em laranja do segundo grupo e em azul do terceiro grupo que foram tratados com a substância polioxina D, visto que o experimento foi realizado em triplicata.

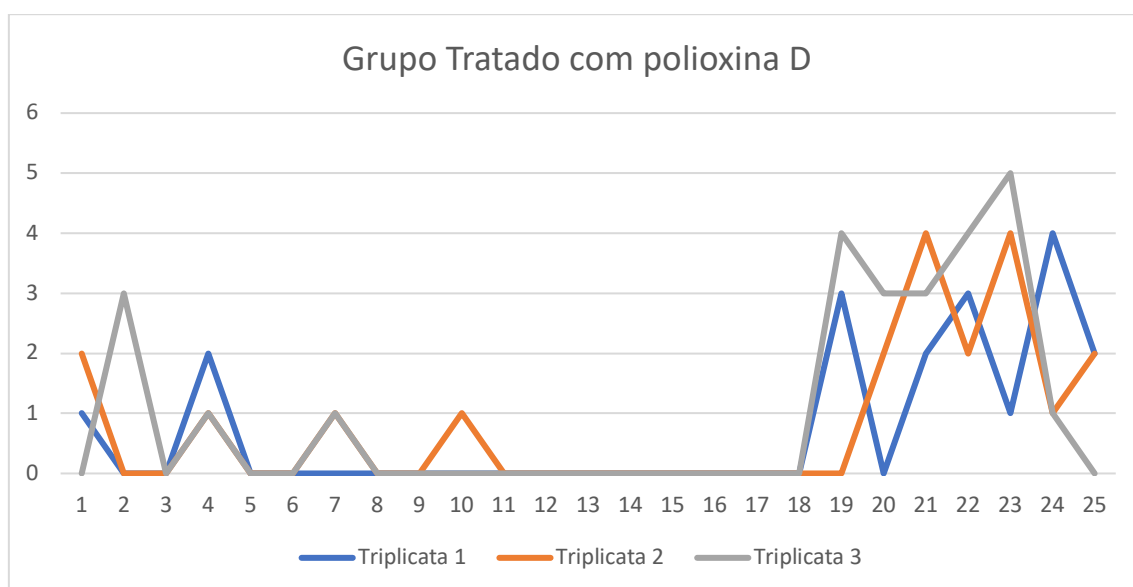


Gráfico XI: A partir deste gráfico conseguimos observar no eixo Y o número de larvas que sofreram mudanças do quarto estágio larval para o estágio de pupa de cada triplicata, representada pelas linhas cinza, laranja e azul. No eixo X é possível observar o número de dias de 1 a 25 a partir do primeiro aparecimento de pupas relatados durante o experimento realizado com a substância polioxina D.

A partir destes dados conseguimos observar que o grupo tratado com a substância polioxina D do primeiro dia ao décimo primeiro dia obteve a presença de pupas em uma taxa média de pupação de 0,27272727 para a primeira réplica, 0,45454545 para segunda réplica e 0,4545455 para terceira réplica o que é considerada baixa, porém foi relatado a presença de pupas neste período. Entretanto nos períodos constados do décimo primeiro ao décimo oitavo dia obtivemos uma média 0 em todas as réplicas observadas, indicando que as larvas entraram em diapausa durante um período de 8 dias, o que pode vir a ser resultado de algum estresse durante o tratamento.

A partir do décimo oitavo dia foi possível observar uma mudança no panorama da taxa de pupação desse grupo, em todas as réplicas, sendo cada uma delas de: 1,875; 1,875 e 2,5 respectivamente.

Totalizamos ao longo de todo experimento um total (soma) de 63 pupas coletadas, individualmente cada réplica obteve um número amostral de 18, 20 e 25 pupas coletadas respectivamente com uma média total de 0,72; 0,8 e 1 pupas coletadas em resultado ao tratamento com a substância polioxina D e possível degradação da matriz peritrófica.

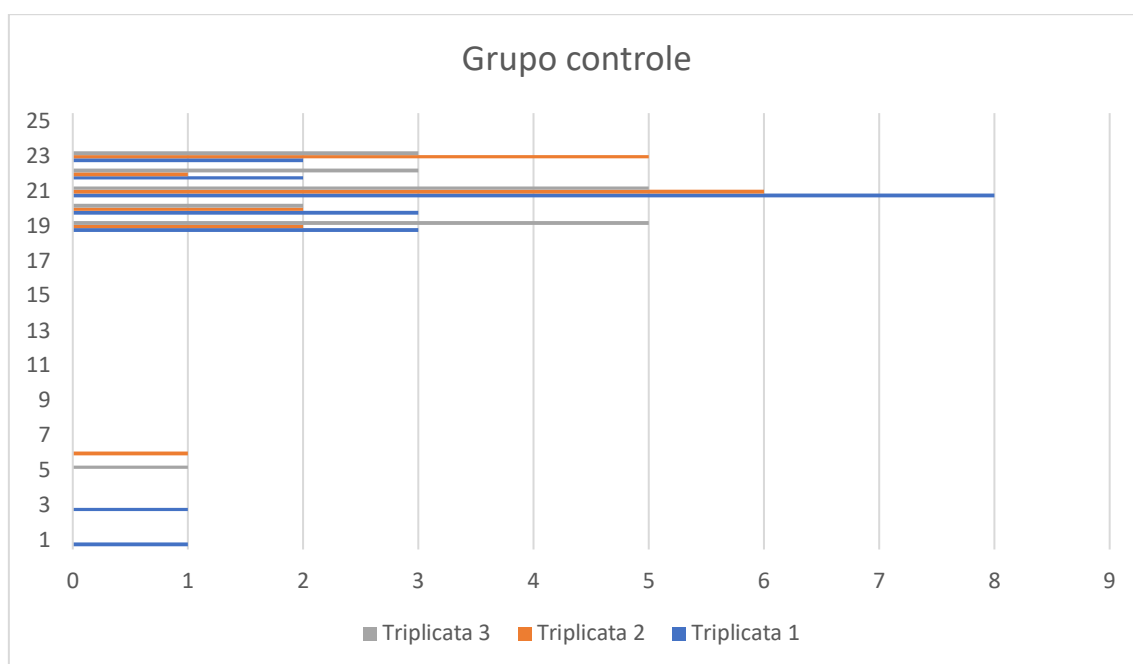


Gráfico XIII: Podemos observar no eixo Y do gráfico acima a quantidade de dias analisados de 1 à 25, contabilizados após a primeira mudança de instar de desenvolvimento de larvas em estágio 4 (L4) para pupa relatado. No eixo X destacamos a quantidade de pupas que sofreram essa mudança de estágio, em cinza está descrito o panorama da taxa de pupação do primeiro grupo, em laranja do segundo grupo e em azul do terceiro grupo que representam cada réplica controle deste projeto, larvas não tratadas com a substância polioxina D.

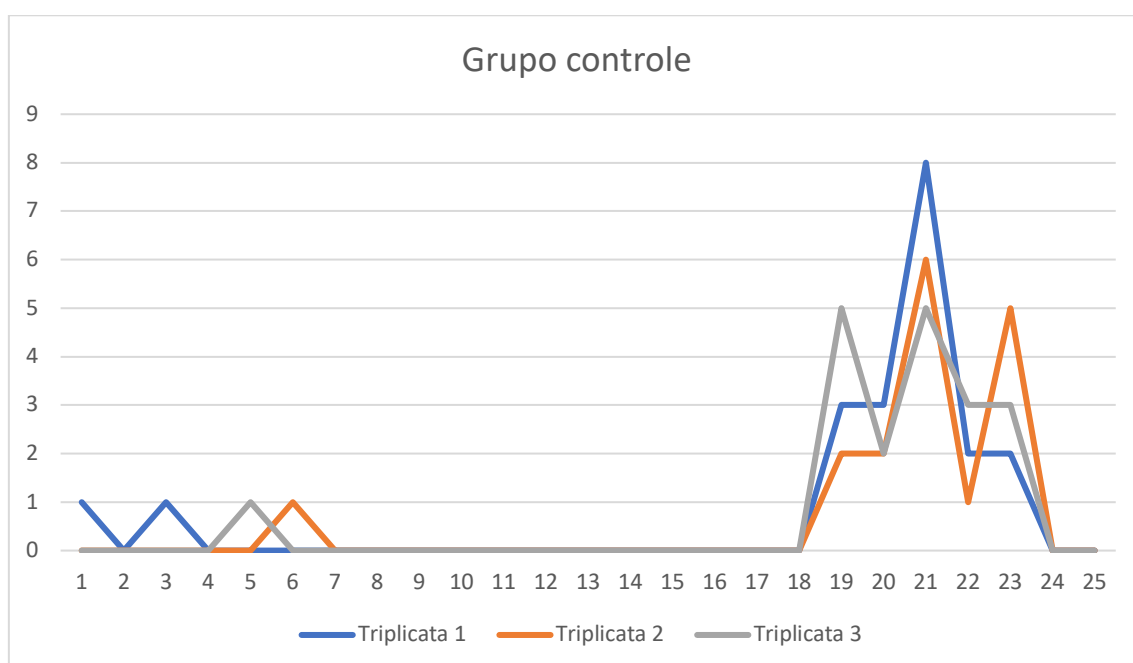


Gráfico XIV: A partir deste gráfico conseguimos observar no eixo Y o número de larvas que sofreram mudanças do quarto estágio larval para o estágio de pupa de cada triplicata, representada pelas linhas cinza, laranja e azul. No eixo X é possível observar o número de dias de 1 a 25 a partir do primeiro aparecimento de pupas relatados durante o experimento realizado para o grupo controle.

Os dados obtidos para o grupo controle mostraram um total de 56 pupas, sendo cada réplica contribuindo com 20, 17 e 19 larvas em estágio de pupa, respectivamente.

A partir da observação dos gráficos representativos ao grupo controle podemos verificar uma taxa média de pupação de 0,28571429; 0,14285714 e 0,14285714 do primeiro ao oitavo dia, a taxa de pupação inicial se mostrou baixa no início do experimento, assim como observado no grupo tratado com polioxina. Ainda semelhante ao observado no grupo tratado com a substância a partir do oitavo ao décimo oitavo dia também foi observado uma taxa de pupação 0, podendo indicar que a diapausa observada no grupo tratado pode não vir a ser decorrente ao tratamento, e sim a algum estresse devido ao tratamento em placas com quantidade de água reduzida em comparação ao volume comumente utilizado. Vale ressaltar que a redução do volume de água utilizado ao longo do experimento foi necessária para o controle da concentração de 100 μ M de solução de polioxina D para o grupo tratado e, respeitando a equidade do volume da água utilizado, o grupo controle foi mantido às condições de redução de volume.

Após o décimo oitavo dia de observação conseguimos identificar um aumento na taxa média de pupação das réplicas analisadas (panorama semelhante ao relatado com o grupo tratado com a polioxina D) as médias de cada replicada observada a partir do décimo oitavo dia foram: 2,25; 2 e 2,25 respectivamente. Neste período a taxa de pupação do grupo tratado foi inferior ao grupo controle, além disso, devido ao panorama observado pelas curvas dos gráficos é possível verificar uma certa constância no número de pupas encontradas a cada dia contabilizado no grupo que obteve contado com a substância polioxina D, sendo que, no grupo controle observamos um maior número de quedas acentuadas no gráfico principalmente a partir do décimo oitavo dia, indicando uma maior inconstância no número de pupas verificadas por dia.

Referências

- ALPHEY, L., MCKEMEY, A., NIMMO, D., NEIRA OVIEDO, M., LACROIX, R., MATZEN K., & BEECH, C. (2013). Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathogens and global health*, 107(4), 170-9.
- BARRETO, C. F.; CAVASIN, G. C.; SILVA, H. H. G. & GARCIA-SILVA, I. 2006. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* lin (Sapindaceae). *Revista de Patologia Tropical*, 35 (1): 37-57.
- BENNETT, K.E.; OLSON, K.E.; MUÑOZ, M.L.; FERNANDEZ-SALAS, I.; FARFAN-ALE, J.A.; HIGGS, S.; BLACK, W.C.; BEATY, B.J. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 67, n. 1, p.85- 92, 2002.
- BLACK, I.V. W.C.; BENNET, K.E.; GORROCHÓTEGUI-ESCALANTE, N.; et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arc. Med. Res.*, v.33, p.379-388, 2002.
- BOLOGNESI, R. 2005 Síntese, degradação e funções da membrana peritrófica dos insetos. 167p. Tese de Doutorado (Instituto de Química) - Universidade de São Paulo (USP), 2005.
- CALISHER, C.H. Evolutionary, ecological and Taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U. S. A. and Brazil. In: An overview Arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Travassos da Rosa, A. P. A., Vasconcelos, P. F. C., Travassos da Rosa, J. F. S (ed.) Belém-Pa, Instituto Evandro Chagas. p. 32-41, 1998.
- CAPORASO, J. G., LAUBER, C. L., WALTERS, W. A., BERG-LYONS, D., HUNTLEY, J., FIERER, N. & GORMLEY, N. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8), 1621.
- CHENG, G. et al. Mosquito defense strategies against viral infection. *Trends Parasitol.* v. 32, p. 177-186, 2016.
- CHERRY, S.; PERRIMON, N. Entry is a rate-limiting step for viral infection in a *Drosophila melanogaster* model of pathogenesis. *Nat. Immunol.* v. 5, p. 81-87, 2004.
- CHRISTOPHERS, S.R. (1960) *Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press, London, 739 p.
- CIRIMOTICH, C.M.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe*, v.10, p.307–310, 2011.

CLARIDGE, M. 1991. An introduction to the study of insects. 6th edition. By D. J. Borror, C. A. Triplehorn and N. F. Johnson. (Philadelphia, Saunders College Publishing, 1989) 875 pp. ISBN 0-03-025397-7. *Bulletin of Entomological Research*, 81(2), 225-225

COLEMAN, J., JUHN, J., & JAMES, A. A. (2007). Dissection of midgut and salivary glands from *Ae. aegypti* mosquitoes. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (5).

COON, K. L. et al. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol.* v. 23, p. 2727-2739, 2014.

COX, J.; BROWN, H.E.; RICO-HESSE, R. Variation in Vector Competence for Dengue Viruses Does Not Depend on Mosquito Midgut Binding Affinity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* v. 5, e1172, 2011.

DAVID, J. P., ISMAIL, H. M., CHANDOR-PROUST, A., & PAINE, M. J. I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 368(1612), 20120429.

DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 49, p. 71-92, 2004.

DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.*, v. 5, e1000423, 2009.

FERREIRA, L C. F. 2009. Avaliação do efeito de Novaluron, um inibidor da Síntese de Quitina sobre a formação de larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). 88f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

FLIPSE J. & SMIT, J. M. 2015. The complexity of a Dengue Vaccine: a review of the human antibody response. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, June 11.

FORATTINI, O. P. 1996. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia. São Paulo: EDUSP; 2002. v.2.

HALSTEAD, S. B. 1979. In vivo enhancement of Dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 140, Issue 4, 1 October 1979, Pages 527–533.

HOFFMANN A.A. et.al. 2011. Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* p.454–457, v. 476.

JARUSEVICIUS, J. 2013. Avaliação da diversidade microbiana intestinal de populações naturais do mosquito *Aedes aegypti*. 57p. Tese (Doutorado Ciências Biológicas

Genética - IBB) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.

JORGE R. REY SHEILA M. O'CONNELL .2014. Oviposition by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Influence of congeners and of oviposition site characteristics. *Journal of vector ecology* p. 190-196, v. 39.

KANTOR, I. N.2016. Dengue, Zika Y Chikungunya. *Medicina* (B Aires). v. 76.

LEHANE, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 42, 525–550.

MOLL, R. M.; ROMOSER W. S.; MODRAKOWSKI, M. C.; MONCAYO, A. C. & LERDTHUSNEE, K. 2001. Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*, 38, 1:1, 29–32.

MONCAYO A. C.; LERDTHUSNEE, K.; LEON, R.; ROBICH, R. M. & ROMOSER, W. S. 2005 Meconial Peritrophic Matrix Structure, Formation, and Meconial Degeneration in Mosquito Pupae/Pharate Adults: Histological and Ultrastructural Aspects, *Journal of Medical Entomology*, Volume 42, Issue 6, (1). Pages 939–94.

MOUSSIAN B, SCHWARZ H, BARTOSZEWSKI S, NÜSSLEIN-VOLHARD C. Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Morphology* 2005; 264 p.117-130.

NEVES, D. P. Culicidae. In: Parasitologia Dinâmica. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2009. cap. 52, p. 485-486.

OBBARD, D. J. & DUDAS, G. The genetics of host-virus coevolution in vertebrates. *Curr. Opin. Virol.*, v. 8, p. 73-78, 2014.

PITISUTTITHUM, P. & BOUCKENOOGHE, A. 2016. The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection. *Expert Rev Vaccines* 2016 Jul 15(7):795-8.

POWELL, J. R., & TABACHNICK, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 11-7.

RODGERS, F.H.; GENDRIN M.; WYER, C. A. S. & CHRISTOPHIDES, G. K. 2017. Microbiota induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathog* 13(5): e1006391.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A. et al. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 67, p. 2773-2786, 2010.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* v.30, p.7–9, 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2014. Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, p. 6, v. 45, n. 20.

SHORT S.M.; MONGODIN, E.F.; MACLEOD, H.J.; TALYULI, O. A. C. & DIMOPOULOS, G. 2017. Amino acid metabolic signaling influences *Aedes aegypti* midgut microbiome variability. *PLoS Negl Trop Dis* 11(7): e0005677

TAKKEN, W. & VERHULST, N. Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. *Annu Rev Entomol.* v. 58, p. 433-453, 2013.

TELLAM RL, VUOCOLO T, JOHNSON SE, JARMEY J, PEARSON RD. Insect Chitin Synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. *Euro J Biochem.* 2000; 267 p.6025-6042.

TONNING A, HEMPHÄLÄ J, TÅNG E, ULF NANNMARK, SAMAKOVLIS C, UV A .2000. A Transient Luminal Chitinous Matrix Is Required to Model Epithelial Tube Diameter in the Drosophila Trachea. *Developmental Cell* p. 423-430, v. 9.

XI, Z.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.*, v. 4, n. 7, e1000098, 2008.