

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 28/03/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

MARIA RAQUEL GOMES FERNANDES

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS DA
MICROBIOTA INTESTINAL E OVARIANA DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

Araraquara, SP
2023

MARIA RAQUEL GOMES FERNANDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto

Araraquara, SP

2023

-
- F541b** Fernandes, Maria Raquel Gomes.
Bioprospecção de bactérias com propriedades antivirais da microbiota intestinal e ovariana do mosquito *Aedes aegypti* / Maria Raquel Gomes Fernandes. – Araraquara: [S.n.], 2023.
82 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área Biotecnologia.
- Orientador: Jayme Augusto de Souza Neto.
1. *Aedes aegypti*. 2. Arbovírus. 3. Microbiota. 4. Intestino-médio. 5. Ovários. I. Souza Neto, Jayme Augusto, orient. II. Título.

Impacto potencial dessa pesquisa

O intestino-médio e os ovários do mosquito *Aedes aegypti* são importantes órgãos no ciclo de transmissão dos arbovírus aos seres humanos ou à prole de mosquitos. A caracterização e avaliação antiviral das bactérias cultiváveis encontradas nesses órgãos pode ampliar o entendimento sobre a interação hospedeiro/microbiota e promover a elaboração de estratégias inovadoras de controle vetorial e terapias antivirais.

Potential impact by this research

The midgut and ovaries from *Aedes aegypti* mosquito are important organs in the arboviruses cycle transmission to humans or mosquito offspring. The profiling and antiviral assessment of the cultivable bacteria found in these organs can broaden the understanding of the host/microbiota interaction contributing to development of innovative strategies for vector control and antiviral therapies.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Araraquara
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Bioprospecção de bactérias com propriedades antivirais da microbiota intestinal e ovariana do mosquito *Aedes aegypti*

AUTORA: MARIA RAQUEL GOMES FERNANDES

ORIENTADOR: JAYME AUGUSTO DE SOUZA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, área de conhecimento: Biotecnologia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JAYME AUGUSTO DE SOUZA NETO (Participação Virtual)

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agronomicas do Câmpus de Botucatu da UNESP

Dra. MARTA RODRIGUES DE OLIVEIRA (Participação Virtual)

Departamento de Entomologia e Acarologia / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. ADRIANO MONDINI (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 28 de março de 2023

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, a minha família e amigos. Especialmente a minha saudosa avó Rody que mesmo que não tenha tido a oportunidade de finalizar a educação básica, sempre me incentivou a estudar enquanto esteve viva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** pela oportunidade e privilégio de cumprir mais uma etapa de realização pessoal e profissional na minha vida. Por Ele ter colocado pessoas de boa índole no meu caminho para me ajudar ao longo dessa jornada, incluindo a minha família desde o início. Por Ele sempre enviar a Sua palavra e falar comigo para me confortar e renovar as minhas forças. Por Ele sempre ser a minha inspiração e propósito de vida.

Agradeço de coração a minha **família** que sempre esteve ao meu lado torcendo por mim diante dos desafios. Especialmente a minha mãe **Eliana** que não mediu esforços para me ajudar a realizar o meu sonho. Aos meus irmãos **Erick e Diogo** que sempre compartilharam palavras de conforto e carinho e ao meu pai **Edson** que sempre contribuiu com aquilo que estava ao seu alcance. E por fim, ao meu avô **João** que sempre acreditou no meu potencial. Eu amo muito vocês!

Agradeço as **duas famílias** que me acolheram em Botucatu enquanto desenvolvi os experimentos de mestrado, **Elenita e José** como também **Ivani e Misael**, sou muito grata a todos vocês pelo amor e carinho. Especialmente à **Arielle** com quem morei praticamente todo o meu mestrado, minha irmãzinha de coração, dedico toda a minha gratidão e consideração.

Agradeço **aos meus amigos** que sempre estiveram ao meu lado, mesmo que virtualmente, contribuindo com apoio, alegria e conselhos quando eu estive diante das adversidades. Vocês estão no meu coração!

Agradeço imensamente ao meu orientador **Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto** pela oportunidade de poder desenvolver um projeto de pesquisa maravilhoso e desafiador para o mestrado. Sou muito grata pela orientação, por compartilhar as suas experiências comigo e pela parceria. Também, agradeço de coração pelo apoio, motivação e conselhos ao longo do processo.

Agradeço imensamente aos meus colaboradores **Dr. Jacksson, Dra. Vanessa, Mestranda. Amanda, Dr. Elerson, Doutoranda. Lauana, Mestranda.**

Heloysa, Dr. Leonardo, Dra. Fabiana, Dra. Saura e Prof.^a Dra. Rejane pela parceria ao longo do desenvolvimento do projeto de pesquisa para o mestrado. Vocês contribuíram de forma significativa para que o trabalho fosse finalizado com êxito. Sou extremamente grata a todos vocês pelas conversas, compartilhamento de experiências, apoio e motivação. Especialmente a **Prof.^a Dra. Rejane** por ter permitido eu desenvolver a segunda parte dos meus experimentos em seu Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas de Botucatu.

Agradeço aos membros da comissão que fizeram parte do meu exame geral de qualificação (**Prof.^a Dra. Mara, Dra. Marta e Prof. Dr. Vitor**) e defesa da dissertação (**Prof. Dr. Jayme, Dra. Marta e Prof. Dr. Adriano**). Contribuíram de forma didática com sugestões construtivas que aperfeiçoaram a minha dissertação de mestrado. Sou muito grata a todos vocês.

Agradeço a todos os membros do **Laboratório Vectomics** e do **Laboratório de Biotecnologia Aplicada** do Hospital das Clínicas de Botucatu que me acolheram gentilmente durante o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa para o mestrado. Sou grata pelas conversas, pelo compartilhamento de experiências e aprendizados.

Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia (PPG-BBAF)** por proporcionar uma experiência única e enriquecedora ao ser matriculada no curso de mestrado. Especialmente a todos os **Professores** que ministraram as aulas, ao **conselho do programa** e a toda **equipe técnica** que sempre esteve disposta a esclarecer as dúvidas. Sou muita grata também por ter tido a oportunidade de participar da comissão organizadora de vários eventos científicos da PPG-BBAF. Isso me proporcionou crescer em diversos aspectos além de conhecer pesquisadores incríveis.

Agradeço imensamente a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento do meu projeto de pesquisa para o mestrado (**nº do processo: 2019/19686-6**). O apoio financeiro foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho e contribuição de novas evidências científicas para a área.

Agradeço ao **CNPq** pelo apoio financeiro e institucional ao **Laboratório de Biotecnologia Aplicada** do Hospital das Clínicas de Botucatu durante o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa para o mestrado.

Agradeço a **Prof.^a Dra. Cristiane** que foi minha orientadora de Iniciação Científica durante a graduação e que sempre me apoiou nas minhas decisões científicas, inclusive quando decidi mudar de área de pesquisa. Sou grata pelo trabalho que desenvolvemos juntas e que rendeu bons frutos. Também sou grata a todos os membros do grupo de pesquisa “Uso Racional de Medicamentos”, especialmente ao **Prof. Dr. Silvio** e a **Dra. Lívia**.

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor dos arbovírus dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela e representa um grande problema de saúde pública. Os microrganismos simbiossantes que constituem a microbiota do intestino-médio e ovários do *Ae. aegypti* podem interferir na replicação do arbovírus e consequentemente na sua competência vetorial. No entanto, pouco se sabe sobre as bactérias cultiváveis desses órgãos e seu papel na resposta antiviral. O objetivo do presente estudo foi identificar bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio e dos ovários do mosquito *Ae. aegypti* com atividade antiviral contra o vírus da Zika (ZIKV). Após 24h e 72h do repasto sanguíneo pelos mosquitos fêmea *Ae. aegypti*, foram dissecados os intestinos-médio e ovários, semeados em ágar sangue e ágar chocolate e mantidos a 24°C e 37°C por 48h. A identificação das bactérias foi realizada via gene 16S rRNA por sequenciamento de Sanger e as sequências foram alinhadas e comparadas no GenBank, SILVA Ribosomal RNA gene database project e Ribosomal Database Project (RDP). Foram dissecados 42 intestinos-médio e ovários, 31 bactérias cultiváveis foram isoladas e identificadas. Houve o predomínio de bactérias gram-negativas pertencentes ao filo Proteobacteria (71%), classe Gammaproteobacteria (71%) e ordem Enterobacteriales (61,3%). Em relação ao gênero, *Serratia* (35,6%) seguida da *Elizabethkingia* (25,8%), *Klebsiella* (16,2%), *Enterobacter* (9,6%), *Pseudomonas* (9,7%) e *Staphylococcus* (3,2%). Todos os gêneros de bactérias identificadas foram encontrados em ambos os órgãos, exceto *Staphylococcus* que foi apenas nos ovários. As espécies de bactérias pertencentes ao mesmo gênero compartilhadas no intestino-médio e nos ovários apresentaram pouca divergência entre si. Sendo assim, a composição da microbiota cultivável do intestino-médio e dos ovários foi semelhante. Nenhum gênero causou redução ou inibição de ZIKV *in vitro*. Portanto, as bactérias cultiváveis da microbiota do intestino-médio e dos ovários não mostraram atividade anti-ZIKV.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, arbovírus, microbiota, intestino-médio, ovários.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector of dengue, Zika, Chikungunya and yellow fever arboviruses and represents a major public health problem. The symbiotic microorganisms from midgut and ovaries microbiota of *Ae. aegypti* can interfere with the replication of the arbovirus. Consequently, its vectorial competence. However, little is known about the cultivable bacteria from these organs and their role in the antiviral response. The objective from this study was to identify cultivable bacteria from midgut and ovaries microbiota of *Ae. aegypti* mosquito with antiviral activity against Zika virus (ZIKV). After 24h and 72h of blood meal by female *Ae. aegypti*, the midguts and ovaries were dissected, seeded on blood agar and chocolate agar and kept at 24°C and 37°C for 48h. Bacterial identification was performed via 16S rRNA gene by Sanger sequencing and the sequences were aligned and compared in GenBank, SILVA Ribosomal RNA gene database project and Ribosomal Database Project (RDP). 42 midguts and ovaries were dissected, 31 cultivable bacteria were isolated and identified. There was a predominance of gram-negative bacteria belonging to the phylum Proteobacteria (71%), class Gammaproteobacteria (71%) and order Enterobacteriales (61.3%). Genera *Serratia* (35.6%) followed by *Elizabethkingia* (25.8%), *Klebsiella* (16.2%), *Enterobacter* (9.6%), *Pseudomonas* (9.7%) and *Staphylococcus* (3.2%). All genera were found in both organs, except *Staphylococcus* which was found only in the ovaries. Bacteria species belonging to the same genera shared between midgut and ovaries showed little divergence between them. Therefore, the composition of the cultivable microbiota from midgut and ovaries was similar. No genera showed reduction or inhibition of ZIKV *in vitro*. Therefore, cultivable bacteria from midgut and ovaries microbiota did not show anti-ZIKV activity.

Keywords: *Aedes aegypti*, arbovirus, microbiota, midgut, ovaries.