

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO

GUSTAVO DA SILVA RIBAS BRANCO

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA DE LARVAS DE
ANOFELINOS NA REGIÃO AMAZÔNICA**

BOTUCATU

2016

GUSTAVO DA SILVA RIBAS BRANCO

**ANÁLISE METAGENÔMICA DA MICROBIOTA DE LARVAS DE
ANOFELINOS NA REGIÃO AMAZÔNICA**

Trabalho apresentado ao curso de ciências biológicas
como requisito para obtenção de título de bacharel em
biologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-orientador: Diego Peres Alonso

BOTUCATU

2016

RESUMO

A caracterização da microbiota de larvas de anofelinos nos dá melhores compreensões da dinâmica da transmissão para que existam estratégias mais efetivas no controle do vetor da malária. Este estudo analisou a microbiota intestinal de larvas de anofelinos na região Amazônica, especificamente no município de Mâncio Lima, AC, com o objetivo de se comparar diferenças estruturais nas comunidades de bactérias, propondo que a diversidade das mesmas poderia ser um fingerprint dos locais de reprodução dos anofelinos adultos. A coleta de dados foi realizada no período entre março e abril de 2016, com cinco diferentes pontos de coleta de larvas de *Anopheles*, e um ponto para a coleta de adultos anofelinos, principalmente *Anopheles darlingi*. Utilizou-se extração de DNA, análise do gene COI para identificação das amostras, também foi descrito a presença ou não de adultos infectados através de qPCR. A grande maioria das espécies de larvas coletadas pertenciam principalmente às espécies *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara*. Nenhum dos adultos coletados se mostrou infectado. Os resultados referentes às larvas demonstraram que a diversidade de bactérias presentes na microbiota está relacionada aos locais de reprodução, e não à espécie de mosquito em questão. Já que as espécies *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* são importantes vetores nesta região, o município de Mâncio Lima pode ser considerado uma potente região de transmissão da malária, assim, medidas de vigilância e prevenção deveriam ser tomadas para que possa se ter uma melhor eficácia no controle da doença.

Palavras chave: Malária; Região Amazônica; Microbiota; Dinâmica populacional

ABSTRACT

The characterization of the anopheline larvae microbiota gives us better understanding of the dynamics of the transmission so that there are more effective strategies in the control of the malaria vector. This study analyzed the intestinal microbiota of anopheline larvae in the Amazon region, specifically in the municipality of Mâncio Lima, AC, in order to compare structural differences in the bacterial communities, proposing that their diversity could be a fingerprint of the breeding sites regarding adult anopheles. Data collection was performed between March and April 2016, with five different *Anopheles* larvae collection points, and one collection point for anopheline adults, mainly *Anopheles darlingi*. DNA extraction, analysis of the COI gene for identification of the samples, the presence or not of infected adults through qPCR was also described. The majority of species of larvae collected belonged mainly to the species *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara*. None of the adults collected were infected. The results concerning the larvae showed that the diversity of bacteria present in the microbiota is related to the breeding sites, and not to the mosquito species in question. Since the species *Anopheles darlingi* and *Anopheles marajoara* are important vectors in this region, the municipality of Mâncio Lima can be considered a powerful region of transmission of malaria, so surveillance and prevention measures should be taken in order to have a better efficacy in the Control of the disease.

Keywords: Malaria; Amazon region; Microbiota; Population dynamics

1. INTRODUÇÃO

A malária é a doença parasitária mais importante atualmente. Em 2015, 95 países tinham relatos de transmissão da malária, com 3.2 bilhões de pessoas em risco. De acordo com as últimas estimativas, ocorreram 214 milhões de novos casos em todo o mundo. A região africana foi a que contou com o maior número de casos (88%). Foram registrados uma média de 438 mil mortes devido à malária, sendo 90% na região africana. No período entre 2010 e 2015, os índices de casos de malária caíram em 37% no mundo, e a mortalidade em 60% (WHO, 2015).

Na maioria dos casos, a malária é transmitida através da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles sp* (Manguin et al, 2008). Existem mais de 400 espécies do gênero *Anopheles*; onde 30 espécies são de maior importância na transmissão da malária. Em 2013 haviam 465 espécies de anofelinos apropriadamente nomeadas e divididas em sete subgêneros: *Anopheles* (cosmopolitano, 182 espécies), *Baimaia* (Oriental, uma espécie), *Cellia* (Europeia, 220 espécies), *Kerteszia* (Neotropical, 12 espécies), *Lophopodomyia* (Neotropical, seis espécies), *Nyssorhynchus* (Neotropical, 39 espécies), *Stethomyia* (Neotropical, cinco espécies), mas apenas os subgêneros *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus* são capazes de transmitir os parasitas causadores da malária (Harbach, 2013). Os principais vetores da malária na América do Sul são *An. darlingi*, *An. albimanus* e *An. nuneztovari* na Colômbia; *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus*, *An. darlingi* no Peru; *An. darlingi*, *An. pseudopunctipennis* na Bolívia; *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *An. nuneztovari* na Venezuela; *An. darlingi*, *An. aquasalis* na Guiana e *An. darlingi*, *An. albitarsis* e *An. aquasalis* no Brasil (WHO, 2014).

Todas as espécies vetores importantes tem o hábito de se alimentar do período crepuscular ao amanhecer (Rosa-Freitas, 1992; Tadei et al, 1998; da Silva-Vasconcelos et al, 2002; Moreno et al, 2007; Magris et al, 2007), a intensidade da transmissão depende de fatores relacionados ao parasita, o vetor, o hospedeiro humano, e o ambiente (WHO, 2015). Nas áreas com uso extensivo de inseticidas no interior das residências, os mosquitos que previamente picavam no interior, agora possuem um hábito mais exofílico (Charlwood, 1996; Soares Gil et al, 2003). Os mosquitos anofelinos depositam seus ovos

na água, que então eclodem para se tornarem larvas, posteriormente pupas e eventualmente mosquitos adultos (sendo os três primeiros estágios na fase aquática). A fêmea vai à procura de sangue para nutrir seus ovos. A transmissão da doença se mostra mais intensa em locais onde os mosquitos têm uma expectativa de vida mais prolongada (para que o parasita possa ter tempo para se desenvolver por completo dentro do mosquito), e quando prefere picar humanos ao invés de outros animais. Em muitos lugares, a transmissão é sazonal, com picos logo após os períodos chuvosos. A imunidade do indivíduo também é um importante fator, especialmente em áreas com moderada ou intensa condição de transmissão. A Imunidade parcial é desenvolvida após anos de exposição, apesar de nunca se tornar uma completa proteção, acaba reduzindo os riscos de se contrair a malária mais severa. Por essa razão, a maior parte de mortes na África ocorre em crianças, embora em áreas com menos transmissão e baixa imunidade, todos os grupos estão em risco (WHO, 2015).

Os agentes etiológicos da malária humana são do gênero *Plasmodium*, sendo *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae* (Cox-Singh et al., 2008; Oliveira-Ferreira et al., 2010) e as subespécies *Plasmodium ovale curtisi* e *Plasmodium ovale wallikeri* (Sutherland et al., 2010). O *P. falciparum* é o principal responsável pela causa de mortes por malária na África (WHO, 2015). *P. vivax* possui uma distribuição mais ampla que *P. falciparum*, devido ao fato de se desenvolver em temperaturas mais brandas, e sobrevivência em grandes altitudes.

A localização dos anofelinos se encontra principalmente na floresta amazônica na América do Sul; e floresta tropical e subtropical na América Central (Conn & Ribolla, 2015), o que difere da África, onde as regiões endêmicas se distribuem em uma ampla variedade de nichos ecológicos, da floresta úmida à savana africana.

Nas América do Sul, o *Anopheles darlingi* é o principal vetor da malária, enquanto na África as espécies *Anopheles coluzzi*, *Anopheles funestus*, *Anopheles gambiae* e *Anopheles arabiensis* (Molina-Cruz et al., 2004; Loaiza et al., 2008).

O *Anopheles darlingi* foi descrito inicialmente por Root em 1926 e depois obteve seu nome pelo líder em doenças tropicais, Dr. Samuel Taylor Darling. Esse mosquito possui ampla distribuição geográfica, desde o norte da Argentina até o sul do México, e da costa do oceano Atlântico até o leste da cordilheira dos Andes (Forattini, 2002; Hiwat & Bretas, 2011). Há três fatores que são importantes para que o *Anopheles darlingi*

consiga transmitir a malária: O comportamento oportunístico ou antropofílico (Zimmerman et al., 2006; Sinka et al., 2012), a rápida interação com consequente resposta às modificações ambientais (Rozendaal, 1990; Vittor et al., 2006; Hiwat & Bretas, 2011) e pôr fim a susceptibilidade ao agente etiológico humano. Foram encontrados tanto em criadouros naturais (áreas alagadas, margens dos rios, lagos e córregos) como em criadouros artificiais (tanques de piscicultura, valas), mas normalmente em áreas protegidas da luz solar, com vegetação flutuante e pobre em nutrientes (matéria orgânica e sais) (Forattini, 2002; Vittor et al., 2009). Entretanto, algumas larvas já foram encontradas em locais distintos: como águas salobras (Manguin et al, 1996), águas turbidas e poluídas (da Silva-Vasconcelos et al, 2002), e em minas de ouro abandonadas na Venezuela (Moreno et al, 2000), confirmando a ideia da adaptação dos mosquitos a ambientes relacionados com atividade humana (Brochero, 2005). O *Anopheles darlingi* é incapaz de sobreviver em climas áridos como o nordeste do Brasil (Sinka et al, 2010), e suas populações aumentam com o início da estação chuvosa (Moutinho et al, 2011).

Nas últimas décadas, a piscicultura se tornou uma importante atividade econômica no ocidente da Amazônia brasileira, onde o número de açudes está rapidamente aumentando. Uma das maiores preocupações com este fenômeno é a contribuição destes açudes para a manutenção e aumento da população de mosquitos anofelinos, e o consequente aumento na malária humana.

O objetivo do trabalho consiste na análise de diferenças estruturais nas comunidades de bactérias, presentes em populações naturais de mosquitos transmissores da malária, localizados na região amazônica através da coleta de larvas e adultos anofelinos. Análise metagenômica da região 16S de múltiplas larvas anofelinas coletadas em cinco diferentes regiões, propondo que a diversidade de bactérias poderia ser um fingerprint dos locais de reprodução.

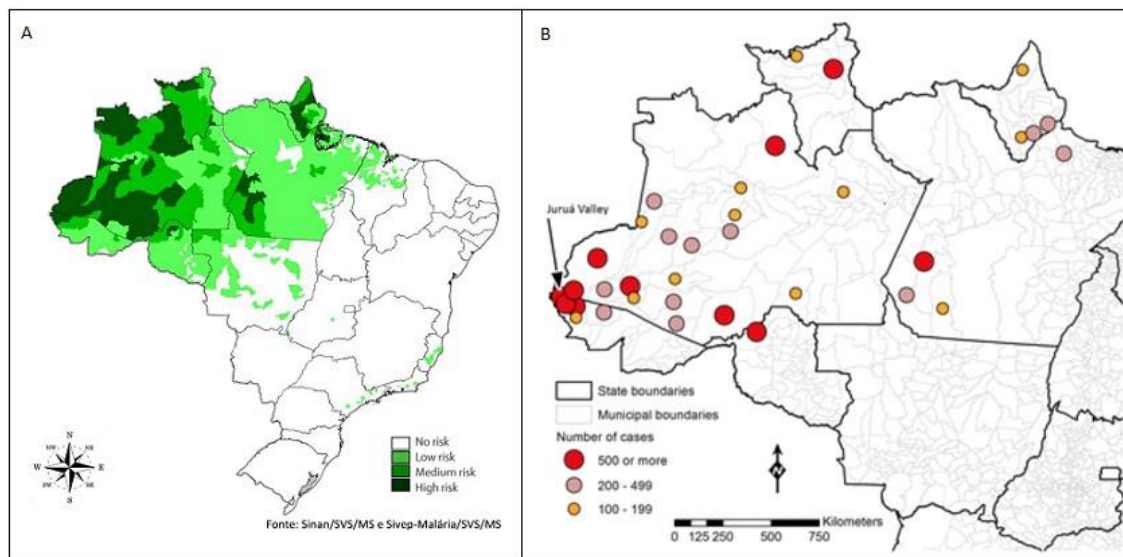


Figura 1: **Incidência de malária no Brasil.** A) Mapa de risco de infecção por malária no Brasil em 2014. B) Foco de malária por *Plasmodium falciparum* no Brasil. Municípios estão indicados em círculos no mapa onde foram registradas infecções por *P. falciparum* na Amazônia em 2014. O tamanho do círculo é proporcional ao número absoluto de casos em cada município. Mâncio Lima, juntamente com Cruzeiro do Sul, Lima, Rodrigues Alves, e Guarajató são os municípios com alto risco, situados no vale do Juruá, no extremo oeste do Brasil.

2. MÉTODOS

Local de estudo

O estudo foi realizado no município de Mâncio Lima ($7^{\circ}37'33.42''S$, $72^{\circ}53'29.89''W$), localizado ao noroeste do estado do Acre, faz divisa ao norte com o Amazonas, ao sul e oeste com o Peru, a leste com o município de Rodrigues Alves e a nordeste com Cruzeiro do Sul. Conta com 17.545 habitantes, densidade populacional de 2.9 (hab./km²), a população urbana como sendo 59,7% e a rural 40.3%. Seu bioma se caracteriza na Amazônia, e sua principal fonte de renda é a produção de farinha de mandioca e a piscicultura. O clima quente e úmido é caracterizado por um período chuvoso que vai de abril a novembro, e a estação seca de dezembro a março. Mâncio Lima está entre os 10 municípios mais afetados por malária no Brasil, os números de casos notificados da doença aumentaram consideravelmente desde 2004, coincidindo com a expansão da piscicultura na região.

A coleta de adulto foi realizada no ponto Z (7°37'14S;72°53'7W). O local inclui duas grandes moradias isoladas com anexo, galinheiros e a presença de grandes tanques artificiais de piscicultura. Além disso, eles são localizados na proximidade de riachos naturais, reservas de água e áreas inundadas, na região da floresta amazônica. A coleta de larvas, em vez disso, foi realizada em locais que exploram uma vasta área de locais rurais, peri-urbanos e urbanos. Cinco pontos diferentes foram analisados: Ponto B (7°36'43S; 72°54'50W), Ponto C (7°37'42S;72°53'50W), Ponto D (7°38'38S; 72°52'53W), Ponto E (7°39'2S;72°53'20W) e Ponto G (7°36'05S; 72°54'17W).

Coleção de larvas e adultos

Adultos anofelinos foram capturados pelo método de isca humana em março de 2016, das 18h até as 23h no ponto Z. Um grupo de mosquitos recém coletados (aqui alimentados com açúcar) foram alimentados com sangue através de uma membrana. Mosquitos alimentados com sangue e fêmeas alimentadas com açúcar foram armazenadas em etanol 100% para transporte. As larvas foram coletadas com pipeta de pasteur em criadouros artificiais e naturais nos locais listados durante o dia e armazenados em álcool 100%.

Extração de DNA e identificação de espécies

Os mosquitos foram lavados em PBS estéril e sua cabeça e tórax foram separados do abdômen com agulhas estéreis e com um cuidado especial para excluir contaminações. O DNA de todas as amostras foi extraído utilizando o kit de purificação Wizard® Genomic (Promega, Wisconsin, EUA) de acordo com as instruções. A concentração de

DNA de cada extração foi determinada utilizando um Qubit® 2.0 com o ensaio Qubit® dsDNA de alta sensibilidade (HS). A identificação das espécies de adultos e larvas foi obtida pela amplificação de um fragmento de 710 pb do gene da subunidade I da citocromo c oxidase mitocondrial (COI) usando o par de iniciadores LCO 1490-HCO 2198. O PCR foi realizado utilizando 1X GoTaq DNA polimerase (Promega, Wisconsin, EUA). O ciclo térmico foi realizado nas seguintes condições: 3 min a 94 ° C, 30 segundos a 94 ° C, 1 min a 55 ° C e 1 min a 72 ° C por 35 ciclos. Amplicons foram então purificados utilizando illustra™ ExoProStar™ (GE Healthcare, UK) e enviadas para sequenciamento no instituto de biotecnologia da UNESP, Botucatu. A taxonomia das amostras foi determinada por um alinhamento local básico com BLASTn de sequências.

Detecção de *Plasmodium* através de RT-PCR

A infecção por *Plasmodium* foi detectada pela técnica RT-PCR da pequena subunidade 18S, utilizando um ensaio TaqMan tríplex (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). A detecção do plasmódio foi obtida utilizando primers específicos e sonda.

A determinação das espécies de *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium falciparum* foi feita utilizando primers forward e sondas imersas dentro do produto específico do gênero.

As amostras de DNA dos mosquitos foram testadas com ensaio tríplex: até 15ng de DNA genômico foi utilizado por reação, com um volume máximo de 7µL. Cada reação de PCR ocorreu em 20µL, contendo 1x PerfeCta qPCR ToughMix, UNG, ROX (QuantaBiosciences), 0.3µL de cada primer, 0.1µL de cada sonda, e DNA genômico. As condições de ciclagem incluíram uma retenção de ativação UNG de 5 minutos a 45° C e um passo de desnaturação por 2 minutos a 95° C, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 segundos e hibridização/alongamento durante 1 minuto. Os controles consistiam de água e DNA genômico de *Anopheles darlingi* não infectados como controles negativos, enquanto o DNA de *Plasmodium falciparum* 3D7 foi utilizado como controle positivo.

Preparação da biblioteca metagenômica, sequenciamento e análise de dados

A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada em triplicado (25 μ L cada) com primers de região específica que incluíram o adaptador de sequências Illumina flowcell. O primer de amplificação reversa também continha uma sequência barcode de 12 bases que suporta pooling de até 2.167 amostras diferentes em cada flowcell. Depois da amplificação, os triplicados foram reunidos para cada amostra e purificados com beads magnéticas (Beckman Coulter) 1.8X Agencourt Ampure XP. As amostras foram então quantificadas por PCR em tempo real utilizando KAPA SYBR® FAST Universal RT-PCR kit (Roche) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração determinada foi utilizada para diluir as amostras até 2nM, e então, utilizou-se o protocolo de desnaturação e diluição MiSeq, de acordo com as recomendações da Illumina a uma concentração final de 10pMolares com a adição de 30% de controle PhiX denaturado. O cartucho de sequenciamento foi preparado da seguinte maneira: a lâmina foi perfurada com a ponta de uma pipeta de 1000 μ L e 600 μ L da biblioteca desnaturada mais PhiX carregada no poço designado. Posteriormente, as vedações foram perfuradas com uma ponta de pipeta e adicionou-se 3.4 μ L de primer sequenciador de índice (100uM) para o reservatório 13, 3,4uL de primer sequenciador de leitura 1 (100uM) para o reservatório 12, e 3,4uL de primer sequenciador de leitura 2 (100uM) para o reservatório 14. Após a formação de Cluster no instrumento MiSeq, os amplicons foram sequenciados com primers específicos. Estes primers específicos foram feitos para serem complementares com os primers de amplificação V4 para evitar o sequenciamento destes primers, e a leitura do barcode usando uma terceira um terceiro primer sequenciador em adição ao ciclo. A amplificação dos primers incluem nove bases extras na região adaptadora do primer de amplificação que suporta sequenciamento de fim de cadeia no MiSeq. A amplificação e sequenciamento dos primers contém uma nova região para evitar a formação de primers fracos com o adaptador modificado. Os testes estatísticos foram feitos usando o teste T de Student bicaudal, teste t com amostra dupla, corrigida com o teste não paramétrico de Bonferoni.

3. RESULTADOS

Identificação das larvas coletadas no município de Mâncio Lima, AC

Diferentes estágios larvais foram coletados em diferentes locais no município de Mâncio Lima, explorando uma vasta área de locais urbanos, peri-urbanos e rurais. Os locais D e E foram identificados como tanques de piscicultura artificiais próximos às moradias dos pescadores, na floresta amazônica. Já os pontos B e C, localizados em áreas peri-urbanas, caracterizadas por uma maior quantidade de casas, embora totalmente cercada por vegetação e pântanos. O local G é representado por uma pequena lagoa entre casas vizinhas, ao lado da estrada principal da vila. Uma primeira análise morfológica foi realizada em campo, incluindo amostragem de somente larvas anofelinas. A amplificação e sequenciamento do gene COI permitiu a diferenciação das espécies: larvas em diferentes estágios de desenvolvimento causou limitações técnicas, e somente o gDNA foi extraído com sucesso de larvas em estágio L3 e L4. A grande maioria de larvas coletadas pertencem às espécies *Anopheles marajoara*, *Anopheles triannulatus* e *Anopheles darlingi*.

A coleta se deu nos meses de março e abril de 2016, por um período de seis horas, a partir do pôr do sol, na varanda da casa de um dos pescadores. A técnica de isca humana permite a coleta de apenas fêmeas em busca de hospedeiros, nos quais o local de reprodução devem ser provavelmente os açudes adjacentes, ou as bacias de água naturais na floresta. Infelizmente, não foi possível fazer coleta de larvas nos açudes adjacentes, pelo fato do proprietário ter recentemente realizado uma limpeza na vegetação ao entorno dos tanques. O reconhecimento prévio dos mosquitos foi feito em campo, e depois confirmados através de análise molecular: todos os mosquitos coletados pertenciam à espécie *Anopheles darlingi*. Utilizando PCR em tempo real, sua infectividade foi testada: separadamente, o DNA do abdômen e tórax foi testada para presença de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, sem obter nenhum resultado positivo.

Tabela 1: **Dados da coleta de adultos:** Identificação das amostras, locais de coleta, identificação molecular e infecção por parasitas estão listados na tabela abaixo. A identificação molecular foi feita pelo sequenciamento do gene COI, detecção de *Plasmodium* por RT-PCR, amplificando um pequeno fragmento da subunidade 18S do gene rRNA, utilizando ensaio TaqMan triplex

ID Sample	Sample type	Collection Site	Molecular Identification	<i>P. vivax</i> - <i>falciparum</i> infection
1	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
2	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
3	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
4	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
5	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
6	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
7	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
8	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
9	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
10	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
11	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
12	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
13	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
14	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
15	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
16	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
17	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
18	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
19	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
20	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
1 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
2 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
3 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
4 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
5 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
6 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
7 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
8 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
9 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
10 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
11 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
12 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
13 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
14 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
15 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
16 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
17 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
18 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
19 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No
20 BF	Adult female	Point Z	<i>An. darlingi</i>	No

Tabela 2: **Dados da coleta de larvas:** Identificação das amostras, locais de coleta, identificação molecular estão listados na tabela abaixo. A identificação molecular foi feita pelo sequenciamento do gene COI.

ID Sample	Sample type	Collection Site	Molecular Identification
L B1	4th instar larvae (L4)	point B	<i>An. marajoara</i>
L B2	L3	point B	<i>An. albiarsis</i>
L B3	L4	point B	<i>An. marajoara</i>
L B4	L4	point B	<i>An. marajoara</i>
L B5	L3	point B	<i>An. marajoara</i>
L B51	L3	point B	<i>An. marajoara</i>
L B52	L4	point B	<i>An. marajoara</i>
L B68	L4	point B	<i>An. marajoara</i>
L C3	L4	point C	<i>An. trianulatus</i>
L C5	L3	point C	<i>An. marajoara</i>
L C10	L3	point C	<i>An. trianulatus</i>
L D2	L3	point D	<i>An. marajoara</i>
L D3	L3	point D	<i>An. marajoara</i>
L D5	L3	point D	<i>An. marajoara</i>
L D6	L3	point D	<i>An. brasiliensis</i>
L D8	L4	point D	<i>An. peryassui</i>
L E1	L3	point E	<i>An. darlingi</i>
L E2	L3	point E	<i>An. darlingi</i>
L E8	L3	point E	<i>An. darlingi</i>
L E9	L3	point E	<i>An. darlingi</i>
L G2	L3	point G	<i>An. trianulatus</i>
LG3	L4	point G	<i>An. trianulatus</i>
L G7	L3	point G	<i>An. trianulatus</i>



Figura 2: **Mapas e detalhes dos pontos de coleta em Mâncio Lima.** As imagens mostram a área de estudo no estado do Acre, Brasil (A). As Fotos B e C são exemplos dos locais de coleta rural e coleta de adultos, respectivamente. Seis locais foram utilizados: Cinco sendo de larvas em regiões rurais (Pontos D e E), peri-urbanos (Pontos B e C) e urbano (G).

Caracterização natural da microbiota de acordo com os estágios de desenvolvimento dos mosquitos

A identificação molecular de larvas permite mapear a distribuição de espécies entre os locais de coleta. Devido à quantidade limitada de larvas coletadas em cada local, uma correlação mais precisa entre as espécies de mosquitos com o local de reprodução não foi possível. Entretanto, poderíamos afirmar, que diferentes espécies compartilharam um mesmo local de reprodução, com exceção do *Anopheles darlingi*, presente apenas no local E (Mandioca). As OTUs (unidade taxonômica operacional) baseada nas espécies de mosquitos não produziram diversidade significativa entre as amostras. Dados mais relevantes são gerados por comparação dos locais de coleta. Áreas urbanas, peri-urbanas e rurais foram adotadas para a coleta de larvas. A análise das sequências estimou um intervalo de 70 a 2231 OTUs por amostra. A análise da divergência intra-amostras revelou uma diversidade alfa significativa, especialmente no local peri-urbano (Music_House), na qual a diversidade é estatisticamente significativa quando comparada com os outros dois locais rurais (Viola, $p=0.02$ e Mandioca, $p=0.05$). Além disso, a comparação intra-amostras mostrou uma diferença significativa entre e nas amostras ($p=0.01$), destacando

uma composição diversa e riqueza na taxa de larvas anofelinas associadas, e por sua vez, ao local de reprodução analisado.

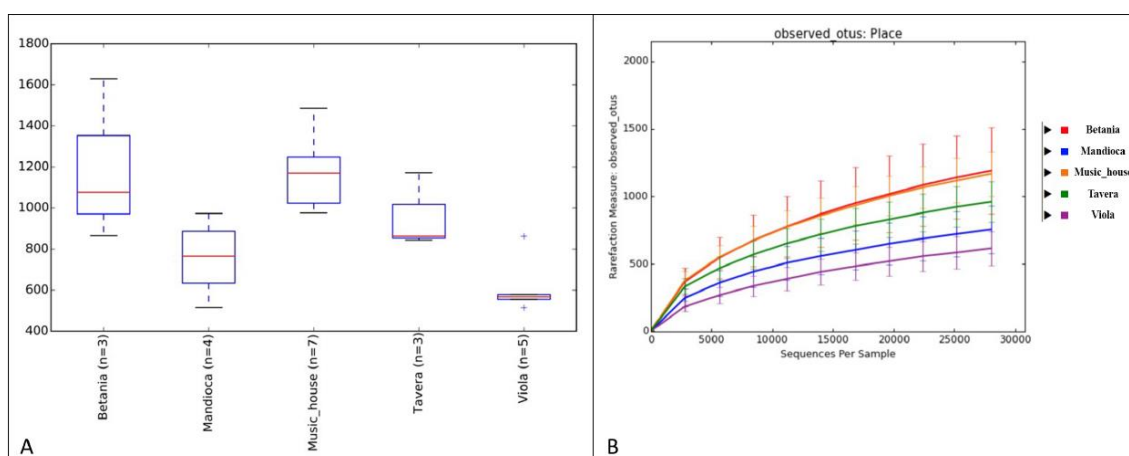


Figura 3: **Análise intra-amostras da coleta de larvas.** A) Diversidade Alfa nas amostras, calculada com o teste t de Student bicaudal, teste t de amostra dupla, corrigida com o teste não paramétrico de Bonferonni, quando comparadas, demonstrando uma significância estatística da Music_House em comparação à Viola e Mandioca. B) As curvas de refração designadas para cada local de coleta mostrando a variabilidade máxima da comunidade de bactérias entre as amostras.

Esta clusterização dos locais também é visível no gráfico PCoA: amostras coletadas na Viola, Music_House e Tavera se clusterizaram em um valor positivo similar de PC1, sugerindo uma microbiota nativa relativamente similar; amostras de Mandioca e Betania estão distribuídas, por outro lado, nas dimensões PC2 e PC3, com um padrão menos integrado (Figura 4). Geralmente, o gráfico indica uma influência considerável do habitat larval na distribuição de filotipos bacterianos. Proteobactérias (média de 91%) dominam transversalmente a comunidade bacteriana de larvas anofelinas, seguidas de Actinobactérias, especialmente nas larvas coletadas no local Mandioca (18,7% nesta amostra).

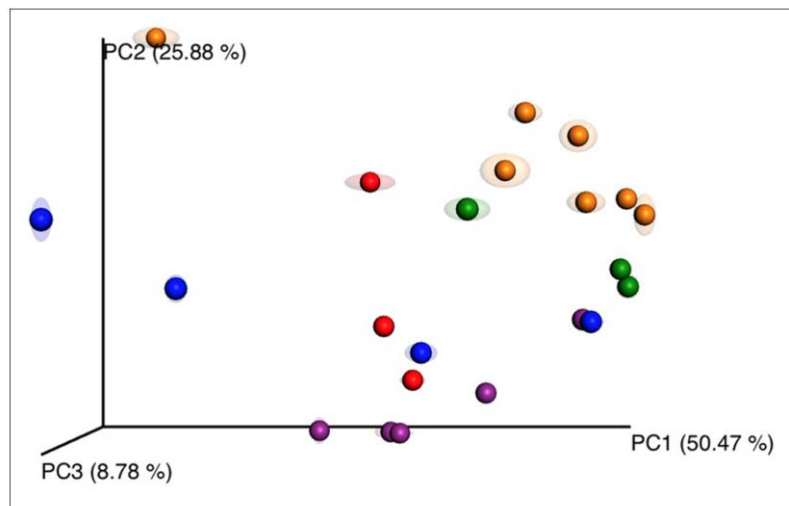


Figura 4: **Análise Inter-amostras:** Gráfico de três dimensões das principais análises de componentes bacterianos contidos em larvas de *Anopheles darlingi*. Em azul larvas do local Mandioca (rural); em vermelho Betania (peri-urbano); em roxo Viola (rural); em verde Tavera (urbano) e em laranja Music_House (peri-urbano). Os dados representam a abundância de todas as amostras para cada local de coleta.

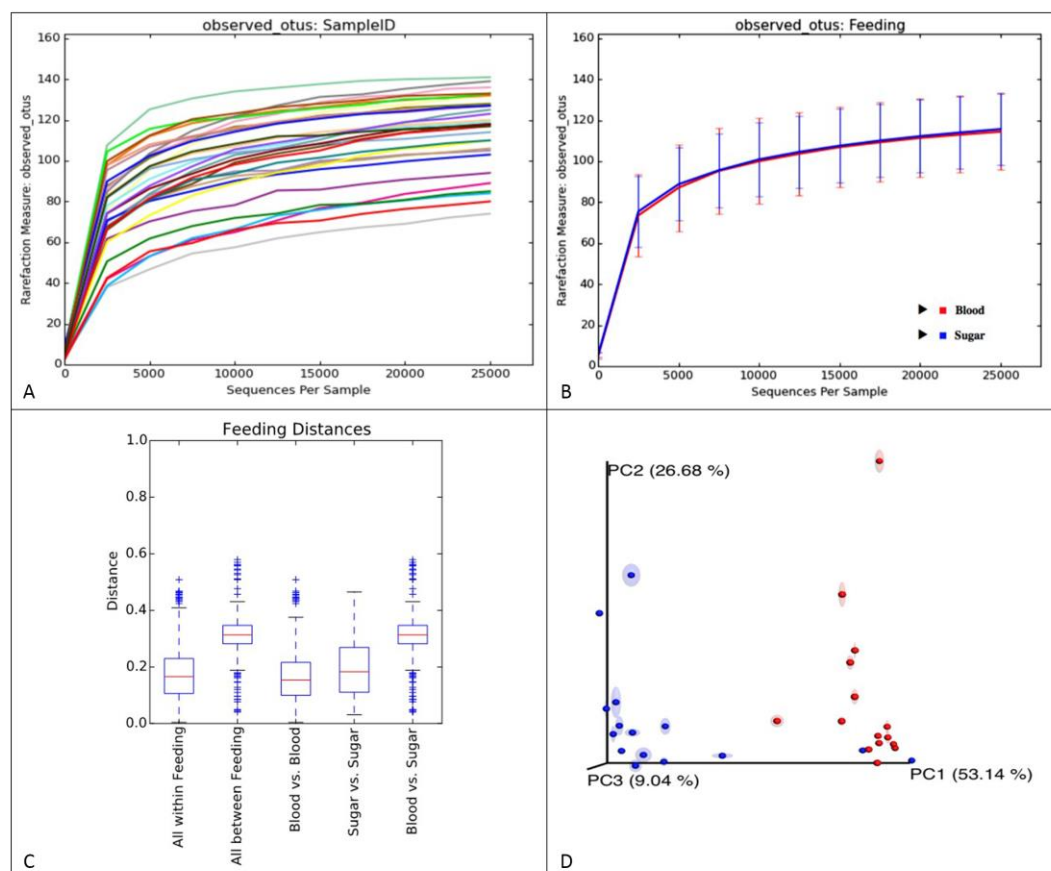


Figura 5: **Análise de amostras de Anopheles darlingi Intra e inter-amostral.** As curvas de refração nos painéis A e B mostrando a riqueza de OTUs em cada amostra e grupo biológico, respectivamente. Distância entre os mosquitos alimentados com açúcar e com sangue são demonstrados no painel C, comparações evidenciadas.

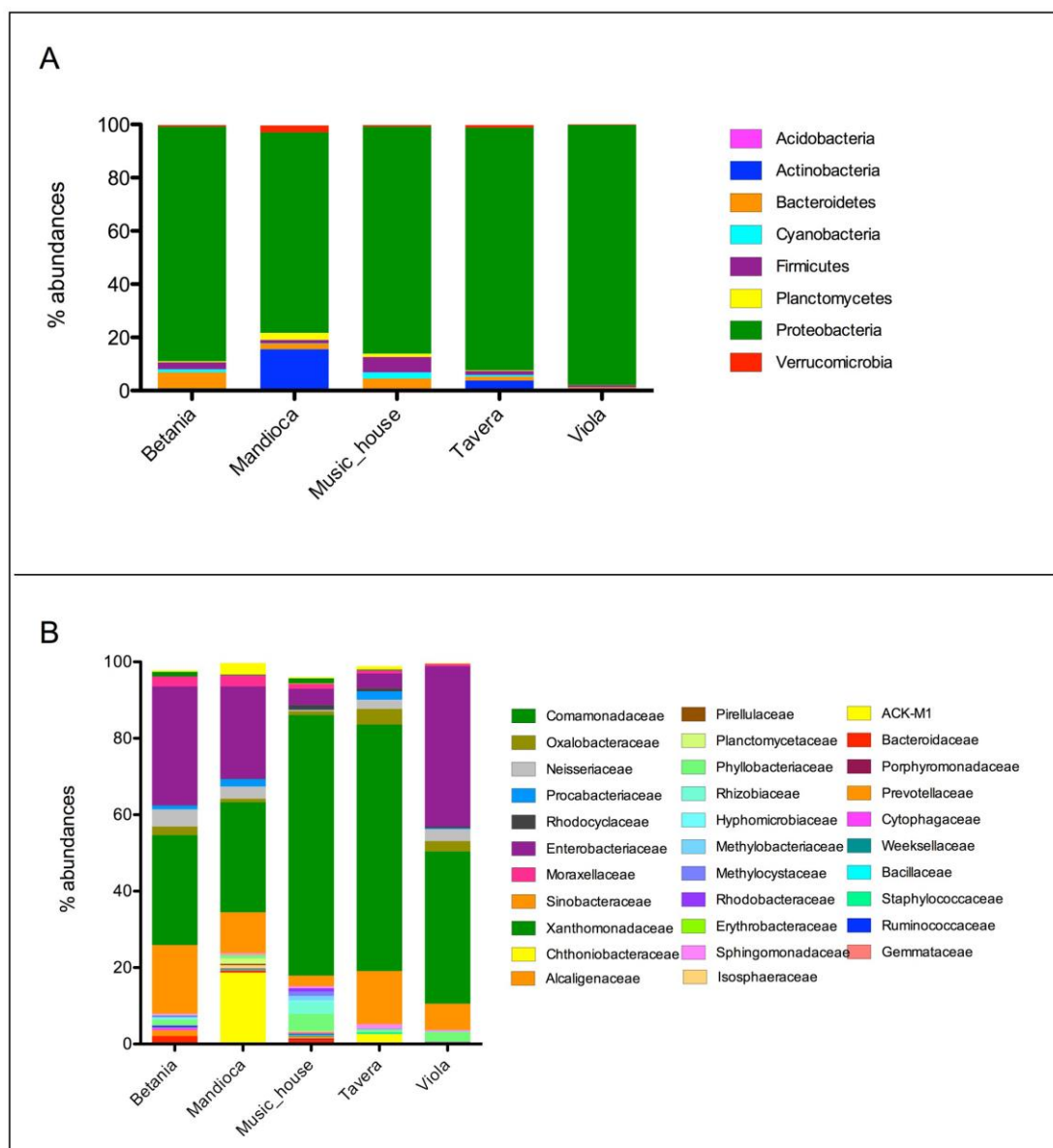


Figura 6: **Abundância de OTUs detectadas em larvas coletadas em campo por local de coleta.** Abundâncias estão representadas em filo (painel A) e família (painel B). Valores maiores que 0.1% estão representados. As larvas anofelinas coletadas nos diferentes locais compartilham um núcleo conservado presente em todas as amostras, principalmente representados pelo filo Proteobacteria e Actinobacteria.

Microbiota natural de adultos de *Anopheles darlingi*

Procuramos ainda descrever a estrutura microbiota natural de *Anopheles darlingi*. Análises de fêmeas recém coletadas e alimentadas artificialmente com sangue produziram uma OTU associada de 7192, variando de 10 a 2745. A diversidade intra-amostra não evidenciou nenhuma diferença significativa entre amostras dos dois grupos ($p=0.86$); enquanto a análise de beta-diversidade revelou uma grande diferença ($p<0.001$) entre as

amostras alimentadas com sangue em comparação com as alimentadas com açúcar, o que é adicionalmente delineado em clusters do gráfico PCoA. Abundâncias são exibidas para indivíduos e grupos biológicos.

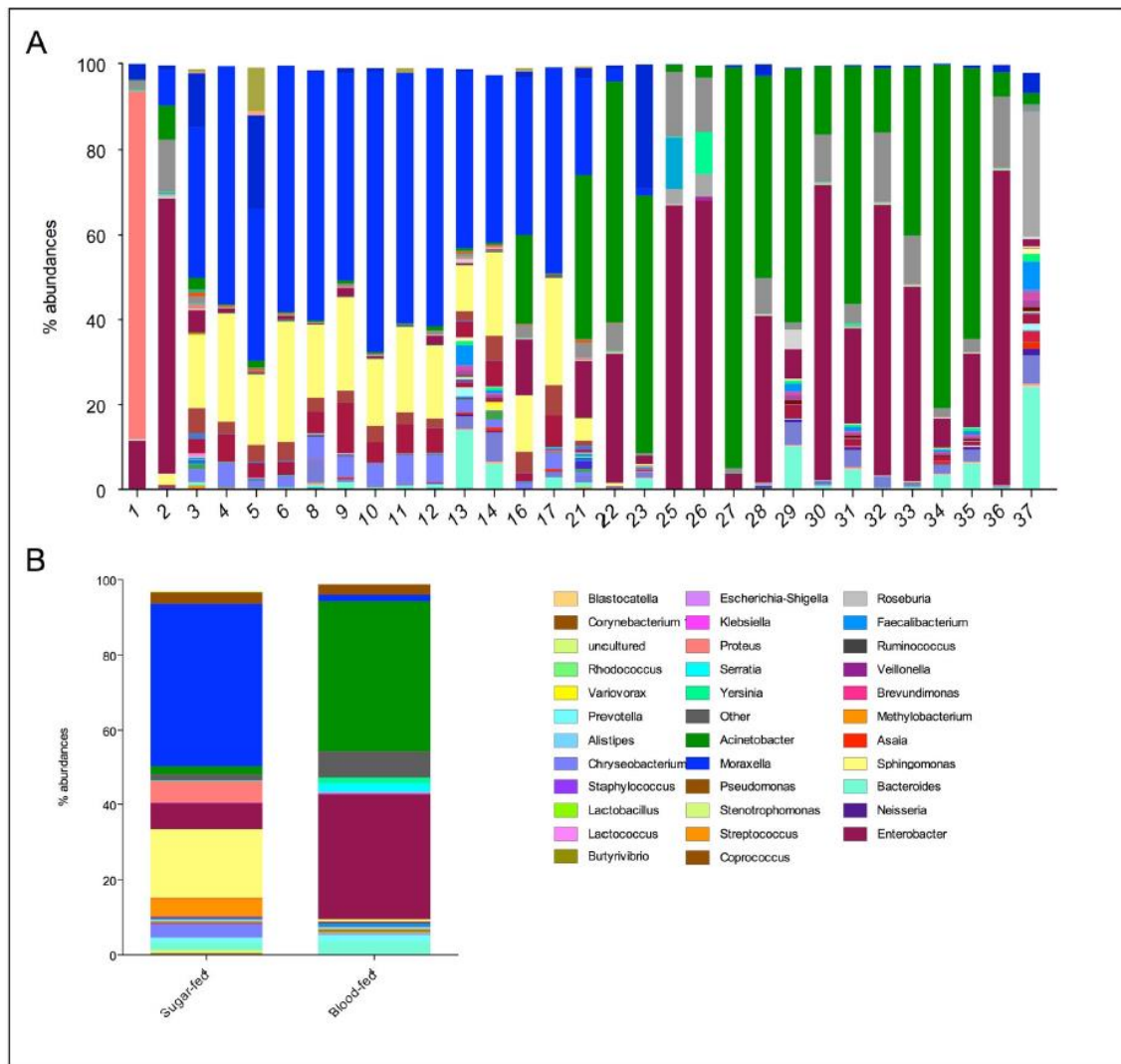


Figura 7: **Abundância de OTUs detectadas em adultos de *Anopheles darlingi* coletados em campo.** Abundâncias representadas em nível de gênero para indivíduos no painel A, enquanto os grupos biológicos (alimentados com açúcar e com sangue) estão representados no painel B. Percentagens maiores que 0.1 estão representadas.

4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui mostram que há variações entre a microbiota natural das larvas entre os pontos de coleta, demonstrando uma relação local entre a larva anofelina e sua composição. Esta mudança está relacionada ao local de coleta, resultando

em uma clusterização dos diferentes grupos de bactérias em relação aos locais de reprodução dos adultos, mas não necessariamente às espécies anofelinas adultas. Estas diferenças podem então funcionar como fingerprint do local de reprodução dos mosquitos adultos, o que demonstra que o acasalamento estaria ligado ao local de reprodução, mantendo assim a estrutura genética observada. Assim, surgem diversas consequências para a fauna do mosquito, estabelecendo diferentes modelos de dinâmica de populações dos vetores da malária.

A presença, e contínuo aumento dos tanques de piscicultura, demonstram que a alteração do ambiente afeta a comunidade de larvas e adultos anofelinos, logo, corroborou-se aqui as diferentes populações de bactérias em diferentes ambientes: urbano, peri-urbano e rural.

Tratando-se do tipo de alimentação e sua influência na microbiota das larvas, seis novos filos de bactéria foram detectados entre os grupos, principalmente representados por *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Ao analisar a microbiota associada à alimentação por sangue ou açúcar em *Anopheles darlingi*, a mudança proeminente da estrutura da comunidade bacteriana pode ser atribuída principalmente aos processos de metabolismo sanguíneo, e, conseqüentemente, diferentes ambientes intestinais.

O intercâmbio entre os membros da família Moracellaceae, isto é, *Moraxella* alimentada com açúcar, enquanto *Acinetobacter* em mosquitos alimentados com sangue, parece curioso, e precisa de uma caracterização microbiológica mais profunda dessas espécies de modo a abordar essa associação ambiental de forma mais rigorosa.

Uma variação considerável na abundância de *Enterobacter* foi observada (alimentados com açúcar 6.8%; e com sangue 33.2%). Esta microbiota é descrita como potencial efetor no controle do mosquito: *Anopheles gambiae* infectado com *Enterobacter* foi descrito como resistente à infecção de *Plasmodium*, conferindo então uma nova estratégia para a proteção da formação da formação bacteriana de espécies reativas ao oxigênio, combinado com um desligamento mútuo do sistema de defesa oxidativo do parasita.

O estabelecimento de *Anopheles darlingi* depende de regiões com matas para que seu estágio larval tenha sucesso de se alcançar a vida adulta, e mudanças profundas no seu habitat alteram a presença e frequência de sua presença.

5. CONCLUSÃO

O sequenciamento do gene mitocondrial COI foi capaz de diferenciar as populações e identificar diferentes espécies de larvas nos diferentes pontos de coleta. Pode-se concluir que há divergência entre a microbiota intestinal das larvas de acordo com o local das amostras. Com isso, análises mais minuciosas demonstraram que há uma clusterização (agrupamento) da diversidade de bactérias encontradas nas larvas dos anofelinos. A diversidade da clusterização se dá pelos locais de reprodução dos mosquitos, e não pela espécie do mosquito em si. O cruzamento poderia estar associado ao local de reprodução, mantendo a estrutura genética observada.

6. REFERÊNCIAS

1. Charlwood JD: Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996, 91:391-398.
2. Charlwood JD: Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996, 91:391-398.
3. CONN JE & RIBOLLA PEM 2015 Ecology of *Anopheles darlingi*, the Primary Malaria Vector in the Americas and Current Nongenetic Methods of Vector Control. In: Zach N. Adelman, editors, Genetic Control of Malaria and Dengue. Oxford: Academic Press, pp. 81-102.
4. da Silva-Vasconcelos A, Kato MY, Mourao EN, de Souza RT, Lacerda RN, Sibajev A, Tsouris P, Povoia MM, Momen H, Rosa-Freitas MG: Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002, 97:151-161.
5. FORATTINI OP 2002 Culicidologia Médica vol. 2: Identificação, Biologia, Epidemiologia. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
6. Magris M, Rubio-Palis Y, Menares C, Villegas L: Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007, 102:303-311.
7. Manguin, S. et al. (2008) Biodiversity of Malaria in the World, John Libbey Eurotext
8. MOLINA-CRUZ A, DE MERIDA AM, MILLS K, et al. 2004 Gene flow among *Anopheles albimanus* populations in Central America, South America, and the Caribbean assessed by microsatellites and mitochondrial DNA. Am J Trop Med Hyg; 71(3):350-9.
9. Moreno JE, Rubio-Palis Y, Paez E, Perez E, Sanchez V: Abundance, biting behaviour and parous rate of anopheline mosquito species in relation to malaria incidence in gold-mining areas of southern Venezuela. Med Vet Entomol 2007, 21:339-349.
10. OLIVEIRA-FERREIRA J, LACERDA MV, BRASIL P, LADISLAU JL, TAUIL PL, DANIELRIBEIRO CT 2010 Malaria in Brazil: an overview. Malaria J, 9:11.
11. Ralph E. Harbach (2013). The Phylogeny and Classification of *Anopheles*, *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors, Prof. Sylvie Manguin (Ed.), ISBN:

- 978-953-51-1188-7, InTech, DOI:
10.5772/54695.<http://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/the-phylogeny-and-classification-of-anopheles>
12. ROZENDAAL JA 1990 Observations on the distribution of anophelines in Suriname with particular reference to the malaria vector *Anopheles darlingi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85: 221-34.
 13. SINKA ME, BANGS MJ, MANGUIN S, RUBIO-PALIS Y, CHAREONVIRIYAPHAP T, COETZEE M, MBOGO CM, HEMINGWAY J, PATIL AP, TEMPERLEY WH et al. 2012 A global map of dominant malaria vectors. Parasit. Vectors, 5, 69.
 14. SUTHERLAND CJ, TANOMSING N, NOLDER D, et al. 2010 Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. J. Infect Dis: 201(10);1544-1550.
 15. Tadei WP, Thatcher BD, Santos JM, Scarpassa VM, Rodrigues IB, Rafael MS: Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg 1998, 59:325-335.
 16. VITTOR AY, PAN W, GILMAN RH, TIELSCH J, GLASS G, SHIELDS T, SANCHEZ-LOZANO W, PINEDO VV, SALAS-COBOS E, FLORES S, PATZ JA 2009 Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 81, 5–12.
 17. WHO: World Malaria Report 2014 (http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/)
 18. WHO: World Malaria Report 2015 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>)
 19. ZIMMERMAN RH, RIBEIRO CALARDO AK, LOUNIBOS LP, ARRUDA M, WIRTZ R 2006 Bloodmeal Hosts of *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) in a Malaria- endemic area of the Brazilian Amazon. J Med Entomol, 43:947-956.

