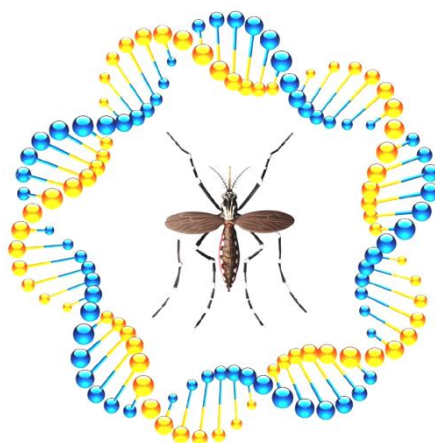


Carine Spenassatto Dreyer

**Caracterização das respostas transcricionais e microbiomas
de populações naturais do mosquito *Aedes aegypti* com
diferentes níveis de suscetibilidade ao vírus dengue**



Botucatu – SP

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências



Caracterização das respostas transcricionais e microbiomas de populações naturais do mosquito *Aedes aegypti* com diferentes níveis de suscetibilidade ao vírus dengue

Orientada: Carine Spenassatto Dreyer

Orientador: Dr. Jayme Augusto de Souza Neto

Co-Orientador: Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu – SP

2015

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

Dreyer, Carine Spenassatto.

Caracterização das respostas transcricionais e
microbiomas de populações naturais do mosquito *Aedes aegypti*
com diferentes níveis de suscetibilidade ao vírus dengue /
Carine Spenassatto Dreyer. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Jayme Augusto de Souza Neto
Coorientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla
Capes: 20202008

1. Dengue. 2. Arboviroses. 3. *Aedes aegypti*. 4.
Microbiota. 5. Diversidade genética. 6. Expressão gênica. 7.
Sequenciamento de nucleotídeo.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*; Microbiota; Transcriptoma.

*Aos meus pais e esposo com todo meu coração
por todo amor e incentivo irrestritos*

Dedico

Agradecimento

A Deus, por me possibilitar alcançar mais uma grande conquista, por me acompanhar e me dar toda sabedoria e entendimento necessário para concluir mais esta etapa em minha vida.

Ao Dr. Jayme Augusto de Souza Neto pela orientação, ensinamento, sugestões e apoio durante a realização desta pesquisa, sobretudo pela oportunidade de realizar um trabalho enriquecedor à minha formação profissional.

Ao professor Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla pela co-orientação e oportunidade que me foi dada em seu laboratório, pelo apoio e ensinamento, muito importante para meu aprendizado.

*Ao professor Silvío Dolabella da UFS e seus alunos pela colaboração nas coletas de *Aedes aegypti* realizadas em Neópolis-SE. Agradeço a atenção e compreensão que nos foi dada.*

*A Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Botucatu e toda sua equipe pelas coletas de *Aedes aegypti* realizadas em Botucatu-SP.*

Ao Dr. Luciano Andrade Moreira do Centro de Pesquisas René Rachou: Fiocruz Minas e sua equipe com a colaboração nos ensaios de infecção.

Ao professor Dr. João Trindade Marques da UFMG e sua equipe pela colaboração, nos cedendo sequência de iniciadores para quantificação viral e o DENV-4 utilizado nos ensaios de infecção.

A colega Jaqueline Jarusevicius pela sua atenção, amizade e pela ajuda prática na realização do sequenciamento do 16S rRNA.

Aos meus pais, irmãos, avós, cunhadas e sobrinhos, enfim, a toda minha família que sempre me deram bons exemplos, e principalmente muito amor. Por todo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida, pela dedicação, amizade, mesmo distante estão sempre presentes. Vocês foram a minha força e por isso nunca desisti dos meus sonhos. Obrigada pela compreensão ao entender minha ausência e por serem meus grandes incentivadores. Por mais que eu agradeça a cada realização, certamente nunca será suficiente.

Ao meu marido Thiago Revers Dreyer, pelo seu amor, apoio, carinho, compreensão, e companheirismo, durante as fases difíceis pelas quais passei e pelas alegrias dos bons momentos. Sua ajuda foi essencial. Graças a sua ajuda e incentivo estou alcançando mais esta vitória em minha vida. Você é meu maior incentivador em tudo que me proponho a fazer. Obrigada por tudo.

A meu sogros Pauli e Alceo, por todo apoio, incentivo e carinho demonstrados.

A todos os colegas do Laboratório: Bianca, Bruno, Letícia Gushi, Letícia Oda, Giovana, a todos os outros que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, pela amizade, troca de experiências e convívio. Aos amigos queridos Karina e Adriano, pela amizade e apoio em todos os momentos. Meu carinho e gratidão a todos que de alguma forma participaram desta minha trajetória!!!

À FAPESP pelo apoio para a realização desta pesquisa com a concessão da bolsa de estudo.

Resumo

Dengue é a arbovirose de maior crescimento nos últimos anos, repercutindo em impactos sociais e econômicos devido às altas taxas de morbidade e mortalidade desencadeadas pela infecção. O dengue tem como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti*, distribuído em toda a faixa tropical e subtropical do planeta. Por apresentar hábito hematofágico antropofílico, rápido desenvolvimento e características comportamentais específicas, é um excelente transmissor do vírus dengue. Medidas de controle estão restritas à eliminação do mosquito vetor, uma vez que um tratamento específico ou uma vacina que previna simultaneamente a infecção pelos quatro sorotipos deste arbovírus ainda não estão disponíveis à população. Uma característica que determina a disseminação de doenças é a alta competência vetorial de seus mosquitos transmissores, que tem sido associada à fatores genéticos do mosquito bem como à microbiota intestinal do inseto. O presente estudo avaliou fatores genéticos e microbianos relacionados à competência vetorial de populações naturais de *Ae. aegypti* com diferenças na susceptibilidades ao vírus dengue sorotipo 4 (DENV-4). Para isso, foi avaliada a susceptibilidade à infecção pelo DENV de duas populações naturais deste inseto (Botucatu-SP e Neópolis-SE) através de ensaios de infecção e quantificação relativa por PCR em tempo real. A expressão gênica diferencial, bem como a diversidade microbiana intestinal, foi realizada através do sequenciamento de nova geração (RNA-seq e sequenciamento do gene 16S rRNA) através das plataformas Illumina HiScan™SQ e MiSeq, respectivamente. Verificamos que as populações estudadas apresentam diferenças na susceptibilidades ao DENV-4 onde Botucatu apresentou maior resistência à infecção quando comparada à Neópolis. Pela análise de expressão gênica diferencial verificamos que houve pouca modulação genica na população de Botucatu em resposta a infecção por DENV, enquanto a população de Neópolis (susceptível), apresentou considerável modulação de vários genes tanto ligados às vias imunes quanto à processos digestivos. Na comparação com outros estudos verificamos que a via imune Toll está sendo ativada nesta população após a infecção. Entretanto, a comparação do perfil de expressão gênica diferencial entre as populações e sua diferença na susceptibilidades ao DENV, nos leva à consideração que genes ligados às tripsinas, DEAD box e às TEPs também podem estar desenvolvendo papel importante na susceptibilidade/resistência. Ademais, sugerimos que as vias imunes estão sendo ativadas como resposta à infecção, porém não são suficientes para eliminar o vírus nestes insetos. A análise dos microbiomas foi realizada com os mesmos mosquitos sequenciadas no RNA-seq. Os gêneros de bactérias encontrados, em ordem decrescente de representatividade em nossos resultados foram: *Elizabethkingia*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Asaia*, *Pantoea* e *Delftia*. Os gêneros *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas* foram prevalentes respectivamente nas amostras ingurgitadas e não infectada e ingurgitada e infectada da população de Neópolis. Nas amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas da população de Botucatu houve maior diversidade de gêneros, sendo considerado o gênero *Elizabethkingia* o mais importante. O comportamento de bloqueio de desenvolvimento de *Plasmodium*, já observado para bactérias deste gênero em mosquitos *Anopheles*, parece estar se repetindo com o DENV em mosquitos *Aedes*, pois possivelmente este gênero, assim como alguns genes diferencialmente expressos podem estar modulando a infectividade da população de Botucatu ao DENV-4. Todavia mais estudos devem ser realizados para confirmação destes achados.

Abstract

Dengue is the arbovirolosis of greater growth in recent years, reflecting on social and economic impacts due to the high morbidity and mortality rates triggered by infection. Dengue has *Aedes aegypti* as its primary vector, which is distributed throughout tropical and subtropical regions of the planet. Due to its anthropophilic and haematophagic habit, rapid development and specific behavioral characteristics, it is an excellent dengue virus transmitter. Control measurements are restricted to eliminating the mosquito vector since neither specific treatments nor tetravalent vaccines are yet commercially available. One feature that determines the spread of the disease is the high vector competence of its vector mosquitoes, which has been associated to its genetic factors and to its gut microbiota. The present study evaluated genetic and microbial factors related to vector competence of natural populations of *Ae. Aegypti* with different levels of susceptibilities to dengue virus serotype 4 (DENV-4). For that, we evaluated the susceptibility to DENV-4 infection of two field collected mosquito populations (Botucatu-SP and Neópolis-SE) through infection assays and relative quantification by qPCR. Differential gene expression and gut microbial diversity analyses were performed using next-generation sequencing (RNA-seq and 16S rRNA gene sequencing) through Illumina HiScanSQ and MiSeq platforms, respectively. The populations presented different susceptibility to DENV-4, of which Botucatu showed higher resistance to infection when compared to Neópolis. Differential gene expression analysis revealed that there was little gene modulation in response to DENV infection in Botucatu, while Neópolis showed consistent modulation on several genes related to immune pathways or digestive processes. When comparing to other studies we found that the Toll immune pathway is being activated in this population after infection. However, the comparison of differential gene expression profiles between the two populations and their different susceptibility to DENV, brings us to the consideration that genes coding to Trypsins, DEAD box proteins and TEPs could also be playing an important role in the susceptibility/resistance of *Ae. aegypti* to DENV. Furthermore, we suggest that immune pathways are activated in response to DENV infection, but are not sufficient to eliminate virus in these mosquitoes. Microbiome analysis was performed with the same mosquitoes sequenced in RNA-seq. The most prevalent genera, in descending order, were: *Elizabethkingia*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Asaia*, *Pantoea* and *Delftia*. *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* genera were prevalent respectively in engorged and uninfected and engorged and infected samples of the population of Neópolis. In engorged-uninfected or -uninfected samples from Botucatu there was greater genus diversity, being *Elizabethkingia* considered the most dominant one. The anti-pathogen activity exerted by this genus against *Plasmodium* seems also to be occurring against DENV in *Aedes*. Further studies will be needed to confirm these findings.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências de iniciadores utilizados para quantificação viral.	34
Tabela 2. Caracterização dos <i>pools</i> de mosquitos utilizados na plataforma HiScan™SQ (Illumina).	36
Tabela 3. Sequências de iniciadores utilizados para o estudo da diversidade microbiana de <i>Ae. aegypti</i> para a plataforma Illumina.	42
Tabela 4. Dados gerais obtidos através dos experimentos de quantificação viral nas populações de Neópolis e Botucatu, após a infecção oral dos mosquitos.	49
Tabela 5. Quantificação do RNA total (ng/μL) dos <i>pools</i> de amostras realizada por NanoDrop.	51
Tabela 6. Quantificação do RNA total (ng/μL) dos <i>pools</i> de amostras realizada por Qubit.	51
Tabela 7. Identificação das amostras e quantificação de RNA total (ng/μL) e determinação do <i>RNA Integrity Number</i> (RIN) dos <i>pools</i> de amostras através da plataforma Bioanalyzer (Agilent Technologies).	52
Tabela 8. Total de reads obtidos no NGS, pareamento, número absoluto e percentual dos reads mapeados e <i>reads</i> não mapeados utilizando-se como referência o transcriptoma da cepa Liverpool do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (<i>Aedes aegypti</i> Liverpool <i>Transcripts</i> , AaegL3.3) (No. de <i>reads</i> , Pareado, <i>reads</i> mapeados e <i>reads</i> não mapeados, respectivamente) obtidos utilizando-se a plataforma <i>CLC Genomics Workbench</i> (Qiagen).	54
Tabela 9. Número de reads obtidos pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das amostras das populações de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas e consideradas positivas e negativas para DENV-4 (BTU+, BTU-, NEO+ e NEO-, respectivamente). As amostras BTU- (rep.b1) e BTU- (rep.b2) são réplicas biológicas da amostra de Botucatu - SP ingurgitada e não infectada.	68
Tabela 10. Números de OTUs calculados utilizando-se subgrupos com 2.440 sequências e respectiva cobertura percentual das amostras de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas e infectadas ou não infectadas com DENV-4 (BTU+, BTU- (rep.b1) e BTU- (rep.b2), NEO+ e NEO-, respectivamente).	69
Tabela 11. Coeficiente de diversidade de Chao e inverso de Simpson das amostras da população de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas e infectadas e não infectadas com DENV (BTU+, BTU- (rep.b1) e BTU- (rep.b2), NEO+, NEO-, respectivamente).	71
Tabela S1. Genes diferencialmente expressos na comparação das amostras das replicatas biológicas (BTU- (rep.b1) e BTU-(rep.b2)) da população de Botucatu– SP ingurgitada e não infectada.	109

Tabela S2. . Genes diferencialmente expressos nos mosquitos BTU+ em relação aos BTU-.....	110
Tabela S3. Genes diferencialmente expressos nos mosquitos NEO+ em relação aos NEO-.....	111
Tabela S4. Genes diferencialmente expressos nos mosquitos NEO- em relação aos BTU-.....	119
Tabela S5. Genes diferencialmente expressos nos mosquitos NEO+ em relação aos BTU+....	126
Tabela S6. Genes co-regulados pelos mosquitos de BTU e NEO infectados com o DENV4.....	140
Tabela S7. Genes sob controle transcricional da via Toll modulados pelo DENV4 nos mosquitos de NEO.....	141
Tabela S8. OTUs mais representativas (50) e suas respectivas composições percentuais.....	142

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático da organização e processamento da poliproteína do DENV. A: Organização linear das proteínas estruturais (structural proteins) e não estruturais (non structural proteins, NPs) dentro da poliproteína. B: Esquema representativo da topologia da membrana da poliproteína predita de análises bioquímicas e celulares, as quais são processadas por diferentes proteases celulares e virais (sítio de clivagem de proteases virais, sítios de clivagem das proteases dos hospedeiros, sítio de clivagem das furinas; possível sítio de clivagem por hospedeiro desconhecido)(indicações das setas). (Adaptado de Assenberg <i>et al.</i> , 2009).....	4
Figura 2. Mosquito <i>Aedes aegypti</i> adulto, mostrando no lado dorsal do tórax a forma de "lira". (CDC/Howell & Collins, 2007).....	7
Figura 3. Ilustração do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Adaptado de Martinho (2013).	9
Figura 4. Esquema anatômico do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Barreiras anatômicas que determinam a infecção de artrópodes por arbovírus. MIB - barreira de infecção no intestino; MEB - barreira de escape do intestino; TB - barreira de transmissão. CG: Corpo gorduroso; D: Divertículo; DD: Divertículo dorsal; E: Estômago; GS: Glândula salivar; IA: Intestino anterior; IM: Intestino médio; IP; Intestino posterior; TM: Túbulos de Malpighi. Modificado de Jobling (1987).	12
Figura 5. Vias imune em <i>Drosophila</i> . Via Toll: detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou de sinal de perigo que ativa uma cascata proteolítica que cliva o precursor da citocina Spätzle. Esta se liga ao receptor Toll da membrana, induz sua dimerização e leva a ligação de proteínas que fazem a fosforilação do cactus. Os fatores de imunidade são levados ao núcleo, induzindo transcrição de genes imunes e peptídeos antimicrobianos. Via Imd: ligação de peptideoglicanos de bactérias gram- a seus receptores que recrutam moléculas da Imd, o que leva a ativação proteica ativando proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de Relish. Os subprodutos destas reações são levados ao núcleo, induzindo transcrição de genes imunes. Via JAK-STAT: após a infecção viral a via é ativada pela ligação de uma citocina ao receptor domeless. Após uma sequência de ligações e fosforilações a Stat92E fosforilada e dimerizada é translocada ao núcleo e induz transcrição de genes que contém sítios de ligação em seus promotores como o RNA-1 induzido por vírus (Merkling & van Rij, 2013).....	16
Figura 6. Esquema representativo de uma ovitrampa utilizada para captura de ovos do mosquito <i>Aedes aegypti</i> . (Comunicação / Instituto Oswaldo Cruz, 2014).	29

Figura 7. Exemplo de alimentador artificial para alimentação sanguínea de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> . Retirado de http://vosshall.rockefeller.edu/research .	32
Figura 8. <i>Box plot</i> em que cada ponto representa a medida da quantificação do RNA total (ng/μL) de mosquitos individuais das populações de Neópolis-SE (NEO) e Botucatu-SP (BTU).	47
Figura 9. <i>Box plot</i> em que cada círculo representa a medida do C _T do CE Rp49/L32 de mosquitos individuais das populações de Neópolis-SE (NEO) e Botucatu-SP (BTU) obtida através de PCR em tempo real.	48
Figura 10. Ensaios da suscetibilidade das populações de <i>Ae. aegypti</i> oriundos de Botucatu e Neópolis. (A) Prevalência da infectividade ao DENV-4 entre as populações do estudo. (B) <i>Box plot</i> da quantificação relativa da carga viral de DENV-4 em relação ao CE Rp49/L32 pelo método de $2^{-\Delta CT}$. Os círculos representam os valores da quantificação dos mosquitos individuais das populações Neópolis-SE (NEO) e Botucatu-SP (BTU). Os círculos abaixo da barra pontilhada representam os valores abaixo do limite de detecção da técnica (C _T 40 - amostras não infectadas) para as respectivas populações.	49
Figura 11. Eletroferograma das amostras (<i>pools</i>) de RNA utilizadas no preparo das bibliotecas para RNA-seq em sequenciamento Illumina. Os resultados foram obtidos no aparelho Bioanalyzer.	53
Figura 12. Teste de reprodutibilidade das réplicas técnicas sequenciadas. Comparação de duas réplicas técnicas de RNA-seq medidas em <i>reads</i> por quilobase de exon por milhões de sequências de <i>reads</i> mapeadas (RPKM). Pontos azul: representam os valores dos RPKMs; reta vermelha: ajuste linear dos dados com os respectivos valores descritos na figura.	55
Figura 13. Clusterização hierárquica, com método de acoplamento completo (<i>complete linkage</i>) e métrica de correlação (<i>similarity metric</i>) dos genes diferencialmente expressos das populações de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas e infectadas e não infectadas (BTU+, BTU-, NEO+, NEO-, respectivamente). (A) Clusterização foi realizada utilizando-se pelo menos uma observação de gene diferencialmente expresso nas comparações realizadas ou (B) no mínimo duas ocorrência simultâneas. As amostras BTU-(rep.b1) e BTU-(rep.b2) são réplicas biológicas e a amostra BTU-(rep.b1+rep.b2) é a união (<i>merge</i>) de ambas réplicas biológicas.	57
Figura 14. Repostas transcricionais das populações do <i>Aedes aegypti</i> ao DENV-4. A) Classificação funcional dos transcritomas modulados pelo DENV-4 nas populações de Botucatu (BTU) e Neópolis (NEO). Os gráficos representam a distribuição funcional dos genes diferencialmente expressos nos grupos BTU+ vs BTU-, NEO+ vs NEO-, NEO- vs BTU- e NEO+ vs BTU+. Os bancos de dados completos constam nas Tabelas suplementares S2-S5 em anexo. Abreviação dos grupos funcionais FDD, função desconhecida; TRP, transporte; R/T/T, replicação, transcrição, e tradução; R/E/M, redox, estresse e mitocôndria; PROT, proteólise;	

MET, metabolismo; IM, imunidade; DIG, digestão; DIV, funções diversas; RQS, recepção quimiosensorial; E/C, estrutural e citoesqueleto. B) Diagrama de Venn representando regulações gênicas únicas e compartilhadas pelas populações de BTU e NEO em resposta ao DENV-4. As regiões de sobreposição representam genes concomitantemente regulados pelas duas populações (Tabela S6 anexo). O sentido da regulação é representado pelas setas apontando para cima (indução) ou para baixo (repressão).....	59
Figura 15. Geração de bibliotecas de <i>amplicons</i> 16S rRNA. Reações de PCR realizadas em triplicata técnica utilizando cDNA dos mosquitos oralmente expostos ao DENV-4 das populações de Botucatu = BTU (A) e Neópolis = NEO (B). (A) BTU- rep.b1 (raias 1-3); BTU- rep.b2 (raias 4-6); BTU+ (raias 7-9). (B) NEO+ (raias 10-12); NEO- (raias 13-15); (-) controle negativo; (PM) marcador de peso molecular.....	67
Figura 16. Curva de rarefação para as amostras da população de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas infectadas e não infectadas (BTU+, BTU- (rep.b1) e BTU- (rep.b2), NEO+, NEO-, respectivamente). Curvas de rarefação comparando o número de <i>reads</i> com o número de OTUs encontrados após o processamento das sequências.	70
Figura 17. Composição bacteriana em nível de Filo das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de <i>reads</i> ; (B) Composição bacteriana em função da frequência de <i>reads</i> (%).	72
Figura 18. Composição bacteriana em nível de Classe das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de <i>reads</i> ; (B) Composição bacteriana em função da frequência de <i>reads</i> (%).	73
Figura 19. Composição bacteriana em nível de Ordem das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de <i>reads</i> ; (B) Composição bacteriana em função da frequência de <i>reads</i> (%).	74
Figura 20. Composição bacteriana em nível de Família das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de <i>reads</i> ; (B) Composição bacteriana em função da frequência de <i>reads</i> (%).	75
Figura 21. Composição bacteriana em nível de Gênero das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de <i>reads</i> ; (B) Composição bacteriana em função da frequência de <i>reads</i> (%).	76

Figura 22. Diagrama de Venn das OTUs presentes nas amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas por DENV-4 das populações de Botucatu-SP e Neópolis-SE (BTU+, BTU-, NEO+, NEO-, respectivamente).....	78
Figura 23. <i>Heatmap</i> da abundância relativa das 50 OTUs mais significativas.....	79
Figura 24. <i>Heatmap</i> das similaridades das amostras calculadas em função dos coeficientes de Jaccard e Yue & Clayton.	80
Figura 25. Representação da posição dos centroides das amostras BTU+ (triângulo preto), BTU- (triângulo vermelho), NEO+ (triângulo verde) e NEO- (triângulo azul) através da análise das componentes principais (PCA). Os pontos cinza, ciano e rosa são as projeções dos centróides respectivamente nos eixos 1-2, 2-3 e 1-3, respectivamente.	80
Figura S1. Composição bacteriana por Gram das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO +, NEO -, BTU +, BTU -, respectivamente). (A) Classificação bacteriana em função do número absoluto de <i>reads</i> ; (B) Classificação bacteriana em função da frequência de <i>reads</i> (%).....	144

Lista de Abreviaturas

AMP - *Antimicrobial peptide* (peptídeo antimicrobiano)

BTU - Botucatu

cDNA - DNA complementar

CE - Controle endógeno

C_T - *Threshold cycle* (limiar do ciclo)

DENV - Vírus dengue

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DIF - *Dorsal-related immunity factor*

DIG - Digestão

DIV - Funções diversas

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTN - Doença tropical negligenciada

DVHF - *Dengue virus host factors* (fatores do hospedeiro para dengue)

DVRF - *Dengue virus restriction factors* (fator de restrição do vírus dengue)

dpa - Dia pós alimentação

dpi - Dias pós infecção

DS - Dengue severa

dsDNA - DNA dupla fita

E/C - Estrutural e citoesqueleto

EUA - Estados Unidos da América

FA - Febre amarela

FDD - Função desconhecida

FD - Febre de dengue

FHD - Febre hemorrágica de dengue

IM - Imunidade

Imd - *Immune Deficiency pathway*

JAK-STAT - *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway*

kb - *kilobase*

MIB - Barreira de infecção do intestino médio

MEB - Barreira de escape do intestino médio

MET - Metabolismo

M.O.I. - *Multiplicity of infection* (Multiplicidade de infecção)

NEO - Neópolis

NGS - Sequenciamento de nova geração

NS - Não estrutural

OMS - Organização Mundial da Saúde

OTU - Unidade Taxonômica Operacional

PAMP - *Pathogen-associated molecular patterns* (padrões moleculares associados a patógenos)

PBS - Tampão Fosfato Salina

PC - Proteína cuticular

PCA - Análise de componentes principais

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PFU - *Plaque forming unit* (unidade formadora de placa)

PGRP - *Peptidoglycan recognition protein* (Proteína de reconhecimento peptidoglicano)

PIE - Período de incubação extrínseco

PRR - *Pattern recognition receptor* (receptores de reconhecimento de padrão)

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

QTLs - *Quantitative Trait Locus* (Locus de caracteres quantitativos)

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

R/E/M - Redox/ estresse/ mitocôndria

RIN - *RNA Integrity Number* (Número de integridade do RNA)

RNA - Ácido ribonucleico

RNAi - Ácido ribonucleico de interferente

RQS - Recepção quimiosensorial

rRNA - RNA ribossomal

R/T/T - Replicação/transcrição/tradução

SCD - Síndrome de choque de dengue

SFB - Soro fetal bovino

SNP - *Single nucleotide polymorphism* (Nucleotídeo de polimorfismo único)

T.A. - Temperatura ambiente

TB - Barreira de transmissão

TE - Tampão Tris EDTA

TRP - Transporte

WNV - *West Nile virus* (Vírus do Oeste do Nilo)

Sumário

1. Introdução	2
1.1. Doenças negligenciadas	2
1.2. Dengue	3
1.3. Epidemiologia	5
1.4. <i>Aedes aegypti</i>	7
1.4.1. Interação <i>Ae. aegypti</i> vírus dengue.....	10
1.4.2. Mecanismos de defesa contra o dengue	13
1.5. Medidas de Controle	18
2. Justificativa	25
3. Objetivos	27
4. Material e Métodos.....	29
4.1 Obtenção de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	29
4.2 Formação de colônias	29
4.3 Caracterização da susceptibilidade do <i>Ae. aegypti</i> ao DENV	30
4.3.1 Ensaios de infecção com DENV	30
4.3.2 Cepa Viral	30
4.3.3 Multiplicação Viral.....	31
4.3.4 Titulação Viral.....	31
4.3.5 Infecção oral	31
4.3.6 Processamento de mosquitos	32
4.3.7 Isolamento de RNA total	33
4.3.8 Quantificação RNA total	33
4.3.9 Tratamento com DNase	33
4.3.10 Síntese de cDNA	33
4.3.11 Quantificação relativa de DENV-4 por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) 34	
4.4 Análise da expressão gênica global de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> em resposta ao DENV	35
4.4.1. Sequenciamento de nova geração de RNA total (RNA-seq)	35
4.4.2 Amostras do estudo	35
4.4.3 Preparo das bibliotecas	36
4.4.4 Sequenciamento (RNA-seq)	39
4.4.5 Análise de dados de RNA-seq.....	39
4.5 Estudo da diversidade microbiana através do gene ribossomal 16S (16S rRNA)	40
4.5.1 Insetos do estudo	40

4.5.2 Amplificação do gene 16S rRNA para sequenciamento NGS Illumina	40
4.5.3 Purificação do DNA.....	43
4.5.4 Quantificação do DNA	43
4.5.5 Sequenciamento 16S rRNA por NGS Illumina	44
5. Resultados	47
5.1 Caracterização da susceptibilidade do <i>Ae. aegypti</i> ao DENV	47
5.1.1 Infecção oral de mosquitos - Avaliação das amostras	47
5.1.2 Quantificação relativa - DENV-4.....	48
5.2 Análise da expressão gênica global de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> em resposta ao DENV	50
5.2.1 Sequenciamento de nova geração de RNA total (RNA-seq)	50
5.2.2 Preparo de bibliotecas	50
5.2.3 Avaliação das respostas transcricional global.....	54
5.2.3.1 <i>Reads</i> obtidos e preparação para o mapeamento.....	54
5.3 Estudo da diversidade microbiana através do gene ribossomal 16S (16S rRNA)	66
5.3.1 Amplificação e sequenciamento de 16S rRNA	67
5.3.2 Análise das sequências do gene bacteriano 16S rRNA	68
5.3.3 Caracterização taxonômica do gene 16S rRNA	69
6. Conclusão	88
7. Referências.....	90
ANEXOS	109



1. Introdução

1. Introdução

1.1. Doenças negligenciadas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças negligenciadas são um conjunto de doenças com características distintas associadas à situação de pobreza, às precárias condições de vida e às iniquidades em saúde (WHO, 2013a). Neste sentido, são doenças que prevalecem em condições de pobreza, mas também são importantes fatores para a manutenção do quadro de desigualdade social, visto que contribuem para o atraso do desenvolvimento dos países afetados.

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) fazem parte dos maiores problemas em saúde pública no mundo. Causadas por agentes infecciosos ou parasitários, que em muitos casos necessitam de um vetor para transmissão, afetam normalmente regiões cuja população possui baixa renda, como países da África, Ásia e Américas, repercutindo diretamente em problemas sociais e econômicos pelas altas taxas de morbidade e mortalidade (LaBeaud, 2008). As dezessete DTNs priorizadas pela OMS, dentre as quais a dengue está incluída, afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo e são endêmicas em 149 países (WHO, 2013a).

Em relatório recente, a OMS registrou um avanço significativo no combate a doenças tropicais. Entretanto, os casos de dengue continuam progredindo, sendo considerada a arbovirose que mais cresceu nos últimos anos. As principais causas do aumento de casos de dengue resultam da combinação de diversos fatores, principalmente aqueles relacionados às mudanças climáticas e aos deslocamentos populacionais do mundo moderno (WHO, 2013b).

A denominação arbovírus deriva da expressão "*AR*thropod *Borne* *VIRUSES*", termo adotado em 1942 para designar um grupo de vírus capazes de se multiplicar em artrópodes e de serem transmitidos aos hospedeiros vertebrados através da picada desses (Karabatsos, 1985; WHO, 1997).

1.2. Dengue

O dengue é o principal vírus transmitido por artrópodes que afeta humanos e causa a arbovirose de maior relevância em saúde pública (Kyle & Harris, 2008), devido à sua expansão em áreas urbanas e semiurbanas. É transmitido entre humanos, majoritariamente pela picada do mosquito vetor *Ae. aegypti* e em menor escala pelo *Ae. albopictus*.

A OMS estima que cerca de 2,5 bilhões de pessoas habitem áreas de risco de infecção pelo vírus dengue (DENV) em países tropicais e subtropicais, sendo relatados entre 50 e 100 milhões de casos de infecção a cada ano (Halstead, 2007; Wikramaratna *et al.*, 2010). Entretanto, um estudo recente sugere que o número real de casos anuais possa ser de quase 390 milhões (Bhatt *et al.*, 2013). Aproximadamente 2 a 5% dos casos de dengue evoluem para dengue severa (DS) (previamente conhecida como dengue hemorrágica ou síndrome do choque da dengue), que pode levar à morte (2,5% dos afetados) se não tratada em tempo adequado (Halstead, 2007; WHO, 2014).

O DENV é atualmente como um arbovírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, que inclui oficialmente 4 sorotipos cocirculantes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (CDC, 2009; WHO, 2009). Dados de longa escala temporal revelam ciclos multianuais na prevalência da doença e troca sequencial do sorotipo dominante (Wikramaratna *et al.*, 2010).

Apesar de apenas 4 sorotipos serem oficialmente aceitos, em um surto na Malásia em 2007, foi coletada uma amostra de humano com sintomas da dengue que acreditava-se ser de DENV-4 que circula apenas entre primatas e o mosquito *Aedes nivalis* nas florestas do Sudeste asiático (Normile, 2013; Mustafa *et al.*, 2014). Entretanto, após o sequenciamento de seu genoma, foi verificado que ele era diferente filogeneticamente dos demais sorotipos de DENV-4 e que tinha algumas semelhanças com o DENV-2 (Normile, 2013). E com a realização de estudos com macacos Rhesus, foi verificado que os mesmos produziam anticorpos anti-DENV diferentes dos produzidos contra os demais sorotipos, comprovando-se assim o isolamento de um novo sorotipo do vírus (Normile, 2013; Mustafa *et al.*, 2014).

A co-circulação de vários sorotipos de dengue juntamente com o aumento da atividade humana aumenta a probabilidade de alterações genéticas, levando à diversidade das populações de vírus. Recombinações genéticas, seleção natural e gargalos genéticos, têm sido implicados como fatores que podem conduzir ao surgimento de novos sorotipos (Mustafa *et al.*, 2014).

O homem e outros primatas são os hospedeiros vertebrados do vírus dengue, mas somente o primeiro apresenta manifestação clínica da infecção e período de viremia. Nos demais primatas a viremia é baixa e de curta duração (Gubler, 1998a).

O vírus dengue é composto por RNA fita simples positiva, mede 40-50 nm de diâmetro, é envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico e recoberto por um envelope lipídico. Seu genoma, de aproximadamente 11.000 pares de bases (11 kb), codifica três proteínas estruturais: a proteína do capsídeo (C), a proteína precursora da membrana (prM) que é proteoliticamente clivada por uma protease celular para formar a proteína M em vírions maduros, e a proteína do envelope (E). Codifica também sete proteínas não estruturais (NS – *non-structural*) que são essenciais para a replicação viral: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Mackenzie *et al.*, 2004) (Fig. 1).

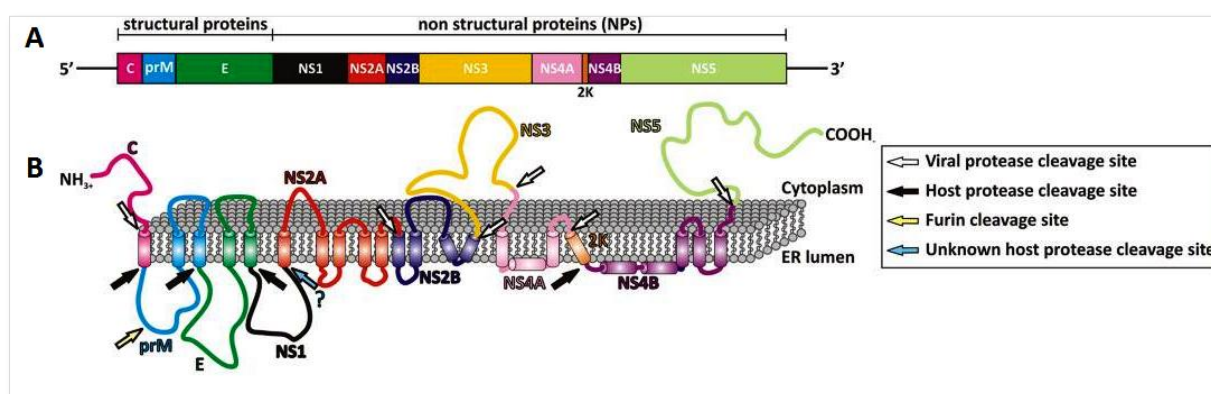


Figura 1. Diagrama esquemático da organização e processamento da poliproteína do DENV. A: Organização linear das proteínas estruturais (structural proteins) e não estruturais (non structural proteins, NPs) dentro da poliproteína. B: Esquema representativo da topologia da membrana da poliproteína predita de análises bioquímicas e celulares, as quais são processadas por diferentes proteases celulares e virais (sítio de clivagem de proteases virais, sítios de clivagem das proteases dos hospedeiros, sítio de clivagem das furinas; possível sítio de clivagem por hospedeiro desconhecido)(indicações das setas). (Adaptado de Assenberg *et al.*, 2009).

A transmissão de dengue normalmente depende de um ciclo que envolve um indivíduo infectado, um agente vetor e um indivíduo susceptível à infecção. O ciclo de transmissão é iniciado quando a fêmea do mosquito *Aedes*, durante sua alimentação, suga o sangue de um indivíduo em fase de viremia. Depois que o mosquito se alimenta com o sangue contendo o vírus, o primeiro alvo de infecção neste inseto é o epitélio do intestino-médio, onde se inicia a replicação viral. Em seguida o vírus rompe a barreira intestinal e, ao atingir a hemolinfa, se dissemina pelo corpo do vetor, período este denominado de período de incubação extrínseco (PIE) que varia de 7 a 14 dias, até que o vírus atinja e se multiplique nas glândulas salivares, podendo ser transmitido pela saliva para um hospedeiro humano suscetível durante o próximo repasto sanguíneo (Woodring *et al.*, 1996; Rigau-Pérez, 2001; Salazar *et al.*, 2007). Existem relatos de transmissões verticais de DENV, em que a fêmea infectada transmite os vírus diretamente aos ovos por passagem transovariana. Entretanto, isso ocorre em baixíssimas taxas tanto para *Aedes spp.* quanto para quase todos vetores de outras arboviroses e sua significância epidemiológica ainda não é claramente compreendida (Gunther *et al.*, 2007).

1.3. Epidemiologia

Dengue é uma doença global reemergente. Em 1779-1780 epidemias foram reportadas na Ásia, África e América do Norte. Esses dados indicam que mesmo no século 18, a febre de dengue já tinha se distribuído globalmente, possivelmente como consequência do comércio marítimo (Gubler, 2006).

Acredita-se que a dengue era originalmente uma doença silvestre, mas com a expansão humana e os desmatamentos para utilização das terras para cultivos, foi transmitida para os humanos pelo vetor *Ae. albopictus*, mosquito de comportamento promíscuo e peridoméstico (Gubler, 2006).

As manifestações clínicas da dengue no homem caracterizam-se por um amplo espectro clínico que variam de uma síndrome viral infectante, inespecífica e benigna (infecção assintomática), de febre indiferenciada ou febre por dengue (FD) conhecida como dengue clássica, até as graves formas de febre hemorrágica de dengue (FHD) e/ou síndrome de choque de dengue (SCD) denominadas como dengue severa (DS). A DS é caracterizada principalmente por eventos de hemorragia, trombocitopenia e hemoconcentração, que pode levar os pacientes acometidos à morte (Gubler, 1998b). São fatores de risco para casos graves: a cepa do sorotipo do vírus infectante, o estado imunológico e genético do paciente, a concomitância com outras doenças e a infecção prévia por outro sorotipo viral da doença (Figueiredo & Fonseca, 1966; Pinheiro & Travassos-da-Rosa, 1996). As taxas de mortalidade da DS variam em torno de 2,5 a 5%, mas podem ocorrer em até 20% dos casos quando não tratada de forma adequada (Wikramaratna *et al.*, 2010). Além da morbidade e mortalidade causadas por esta infecção, outros problemas surgem em decorrência de gastos com tratamento, hospitalização, controle dos vetores, abstenção ao trabalho e perdas com turismo (WHO, 1997; David *et al.*, 2013).

Os primeiros relatos de epidemias com quadro clínico compatíveis com essa enfermidade estão registrados em uma enciclopédia chinesa datada de 610 D.C. (Howe, 1977; Gubler, 1998b). Surto epidêmico de doença febril aguda no oeste da Índia Francesa, em 1635, e no Panamá, em 1699, têm sido relacionados à dengue, porém sem muito consenso quanto a ser por esse agente etiológico ou pelo vírus Chikungunya (Martinez-Torres, 1990).

Ao final do século XVII surgiram relatos de uma enfermidade semelhante à dengue. Estes foram descritos simultaneamente em 1779 em três distintos continentes: Batávia (Indonésia- Ásia), Cairo (Egito- África) e Filadélfia (Estados Unidos da América- Américas). Tais fatos indicam que tanto o DENV, quanto o mosquito vetor já apresentavam uma distribuição mundial na região dos trópicos há mais de duzentos anos (Henchal & Putnak, 1990).

Em meados dos anos 40, até os anos 60, a dengue foi praticamente eliminada de muitos países das Américas do Sul e Central, incluindo o Brasil, em virtude do combate ao vetor em escala continental (Soper, 1965). Contudo, devido à redução da vigilância e dos programas de controle, observou-se a reinfestação do *Ae. aegypti* em 1967, provavelmente originada dos países vizinhos que não obtiveram êxito em sua erradicação (Franco, 1976).

1.4. *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* é um mosquito (artrópode) pertencente à ordem Díptera, subordem Nematocera, família Culicidae, e subfamília Culicinae, que se destaca por ser o principal vetor de arboviroses, tal como a febre amarela urbana e dos vírus dengue sorotipos 1 - 4 (DENV 1 - 4) em humanos (Gluber, 1998a). Sua morfologia é facilmente determinada por ser um mosquito de coloração castanha com anelações prateadas no abdômen e pernas, e por marcações no tórax que formam um desenho com aspecto de “lira” (Neves, 2009) (Fig. 2).



Figura 2. Mosquito *Aedes aegypti* adulto, mostrando no lado dorsal do tórax a forma de "lira". (CDC/Howell & Collins, 2007).

Evidências sugerem que este culicídeo é originário do continente africano, especificamente do território onde hoje se situa a Etiópia. A partir desta localidade, o mosquito teria se dispersado pelo mundo ao longo das rotas comerciais durante os séculos XVII, XVIII e XIX, distribuindo-se amplamente nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, principalmente entre os

paralelos de 45°N e 30°S (Slosek, 1986). Acredita-se que este vetor tenha sido introduzido no continente americano em época precoce da colonização, graças ao tráfego comercial que se estabeleceu entre as Américas e as áreas de onde ele é natural (Forattini, 1965).

O habitat desta espécie está intimamente ligado às condições domiciliares ou peridomiciliares decorrentes da ação antrópica. Sua preferência pelos depósitos artificiais como locais de ovoposição faz com que a concentração populacional advinda com a urbanização, ao lado da larga utilização de recipientes artificiais, seja fator determinante na sua crescente proliferação nos centros urbanos das regiões tropicais e subtropicais do planeta. Como exemplo de criadouros artificiais pode-se citar: pneus, latas, caixas d'água e piscinas. Nesses criadouros, as fêmeas depositam seus ovos, isoladamente, em um substrato úmido, próximo à água ou em local inundável, os quais podem resistir à seca por mais de um ano, o que facilita a sobrevivência e dispersão, dificultando o controle do mosquito (Figueiredo & Fonseca, 1966). A oviposição pode ocorrer em até 10 criadouros diferentes, com uma variação de 1 a 50 ovos por criadouro. O ciclo de desenvolvimento do *Ae. aegypti* compreende quatro estádios: ovo, larva (4 estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto (Fig. 3). O desenvolvimento deste ciclo geralmente ocorre em um curto espaço de tempo, podendo variar entre 10 e 15 dias, o que contribui para o rápido aumento da densidade populacional da espécie (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

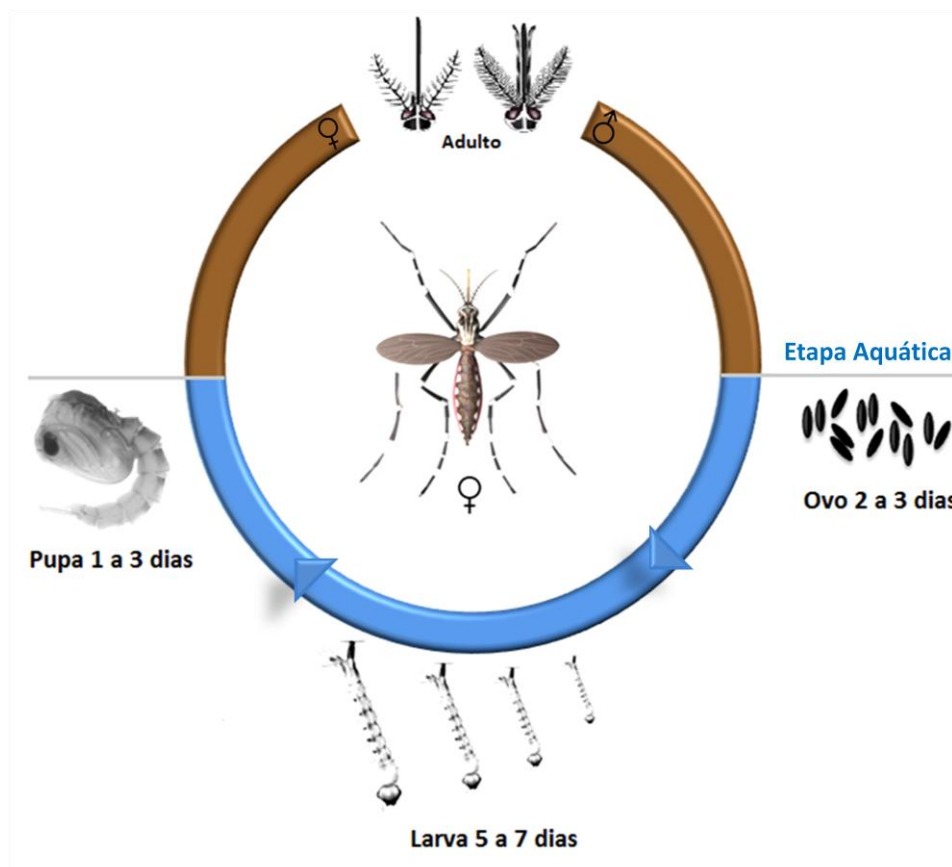


Figura 3. Ilustração do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Adaptado de Martinho (2013).

Os mosquitos adultos desta espécie podem viver por várias semanas ou meses, dependendo das condições ambientais, tais como, umidade (Beeuwkes *et al*, 1933; Shannon & Putnam, 1934) e temperatura (Bacot, 1916; Johnson, 1919; Davis, 1932).

A alimentação do mosquito adulto (machos e fêmeas) é baseada em néctar de frutas. No entanto, além de néctar de frutas as fêmeas se alimentam de sangue, necessário para a maturação dos ovos. De hábito diurno, este mosquito é considerado hematófago voraz, sendo muito eclético quanto ao hospedeiro, sugando o sangue de uma grande variedade de animais e apresentando predileção pelo homem (antropofilia) (Mattingly, 1957; Scott *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 2000). Características como voos rápidos, escapes durante o repasto sanguíneo a qualquer movimento do hospedeiro e a alternância deste hospedeiro com outros são favoráveis à sobrevivência do mosquito e conferem uma melhor eficiência na disseminação de vírus quando o mosquito está infectado (Neves, 2009).

1.4.1. Interação *Ae. aegypti* vírus dengue

A transmissão do DENV pelo mosquito vetor está diretamente relacionada com sua capacidade e competência vetorial. A capacidade vetorial é a propriedade de uma população de vetores em disseminar um agente etiológico à indivíduos susceptíveis de uma determinada área em condições naturais. Parâmetros ecológicos, biológicos e comportamentais do mosquito fornecem importantes características ao estudo de capacidade vetorial, mas ainda são os aspectos referentes à infecção e susceptibilidade do vetor, tais quais a competência vetorial, média de picadas infectantes por hospedeiro e duração do período de incubação extrínseco (período de desenvolvimento do vírus no organismo do vetor - PIE), os principais fatores determinantes (Forattini, 1992; Lourenço-de-Oliveira, 2005).

A competência vetorial, como um componente da capacidade vetorial, é a habilidade intrínseca de um vetor tornar-se infectado, propiciar a multiplicação do agente infeccioso e de transmitir o vírus a um hospedeiro vertebrado. É regida por diversos fatores incluindo o próprio vírus, fatores intrínsecos (genéticos), preferência alimentar, suscetibilidade ao patógeno infeccioso, concentração viral no hospedeiro vertebrado infectado, fatores ambientais e climáticos, barreiras fisiológicas do mosquito vetor, dentre outros ainda não bem compreendidos (Calisher, 1998; Bennett *et al.*, 2002).

Um a dois dias pós-infecção (dpi), as partículas virais invadem o epitélio do intestino médio e iniciam sua replicação. A infecção do epitélio intestinal do mosquito ocorre pela via endossomal, que leva à internalização do vírus pelas células através de receptores dependentes de clatrina (EMR) (Cherry & Perrimon, 2004; Acosta *et al.*, 2008). O baixo pH do endossomo induz o desenvolvimento e liberação do RNA viral (vRNA) no citoplasma (Krishnan *et al.*, 2007; van der Schaar *et al.*, 2008). A tradução do vRNA ocorre em associação ao retículo endoplasmático (RE), gerando uma poliproteína de cadeia única, que é então processada para dar origem a todas as proteínas virais estruturais e não estruturais. Durante o processo de tradução e dobramento das proteínas individuais, as proteínas NS

iniciam a replicação em larga escala do genoma viral e as novas moléculas de vRNA são então envoltas pela proteína C, formando o nucleocapsídeo, e acopladas às proteínas prM e E (Clyde *et al.*, 2006; Rodhnuis-Zybert *et al.*, 2010). As partículas virais são então maturadas no complexo de Golgi e externalizadas da célula através da via secretória do hospedeiro (Fields *et al.*, 2001). Cerca de 7 a 10 dpi é atingido o pico máximo de vírus no intestino do mosquito. Através do sistema traqueal do inseto, os vírus se espalham por todo o corpo. As glândulas salivares são infectadas a partir de 7 dpi e a concentração máxima de vírus nelas pode ser encontrada de 12 a 18 dpi. O mosquito infectado finaliza o ciclo de transmissão ao inocular sua saliva, contendo qualquer um dos quatro sorotipos do vírus dengue, em um indivíduo susceptível à infecção (Salazar *et al.*, 2007).

Barreiras anatômicas próprias do inseto podem determinar a eficiência da infecção no vetor, que inclui a susceptibilidade à infecção, isto é, o desenvolvimento do patógeno, duração do período de PIE e eficiência da transmissão do patógeno, afetando consideravelmente a competência vetorial (Beerntsen *et al.*, 2000). Dentre essas barreiras se destacam: a barreira de infecção do intestino médio (MIB), a barreira de escape do intestino médio (MEB) e a barreira da glândula salivar (Barreira de Transmissão - TB) (Bennett *et al.*; 2002, Black *et al.*, 2002) (Fig. 4). Estas barreiras podem ou não funcionar para proteger o vetor do desenvolvimento do patógeno em seu interior, pois requer a interação do vírus com os vários tecidos e seus respectivos processos fisiológicos de proteção contra patógenos que, ao serem burlados, permitem uma infecção persistente e duradoura no inseto.

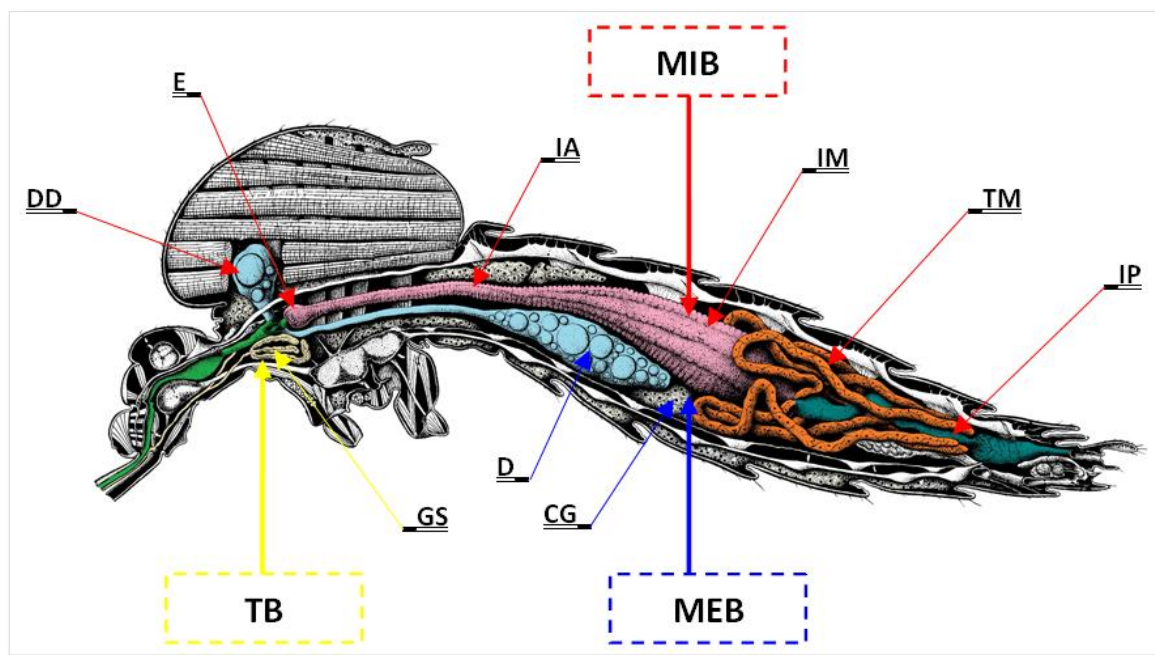


Figura 4. Esquema anatômico do mosquito *Aedes aegypti*. Barreiras anatômicas que determinam a infecção de artrópodes por arbovírus. MIB - barreira de infecção no intestino; MEB - barreira de escape do intestino; TB - barreira de transmissão. CG: Corpo gorduroso; D: Divertículo; DD: Divertículo dorsal; E: Estômago; GS: Glândula salivar; IA: Intestino anterior; IM: Intestino médio; IP: Intestino posterior; TM: Túbulos de Malpighi. Modificado de Jobling (1987).

Populações deste culicídeo exibem variabilidade genética considerável na competência vetorial para flavivírus, inclusive para o vírus dengue-2 (Gubler *et al.*, 1979; Bosio *et al.*, 1998; Black *et al.*, 2002; Severson *et al.*, 2004, Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002). Estudos em laboratório certificam que grandes variações na infecção oral dos vetores ocorre não só entre diferentes espécies como também entre diferentes populações geográficas da mesma espécie (Gubler & Rosen, 1976; Rocco *et al.*, 2001). Entre os fenótipos encontrados, são observados mosquitos em que os vírus não conseguem estabelecer infecção no intestino médio, ou que não são disseminados para outros tecidos, ou que não são encontrados na saliva. Estes fenótipos são associados, respectivamente, com as barreiras MIB, MEB e TB (Cox *et al.*, 2011). Múltiplos QTLs (*Quantitative Trait Locus*) são associados à MIB e MEB, no entanto, apesar de alguns genes serem associados a estas regiões, como é o caso das tripsinas digestivas, até o momento não foi determinada a identidade de genes específicos responsáveis pela competência vetorial de uma espécie, o que se deve provavelmente ao

fato de ser uma característica multifatorial bastante complexa (Bosio *et al.*, 1998. Bosio *et al.*, 2000; Black *et al.*, 2002; Bennett, *et al.*, 2005). Diferenças na intensidade de infecção (medidas pelos picos de titulação) e a duração do PIE também podem ser observadas entre as amostras de mosquitos de diferentes populações (Salazar *et al.*, 2007). Esta variabilidade é fortemente influenciada por fatores genéticos, devido à ação de genes que controlam a competência vetorial (Severson *et al.*, 2001; Black *et al.*, 2002) os quais podem determinar o sucesso da relação mosquito-patógeno específico (Beerntsen *et al.*, 2000; Black *et al.*, 2002; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004).

A interação biológica vírus-vetor é resultado de um processo 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).

1.4.2. Mecanismos de defesa contra o dengue

A permissividade do vetor a um dado patógeno humano e, consequentemente, a disseminação de uma doença é amplamente dependente da compatibilidade das interações celulares e moleculares entre os dois organismos e da habilidade do sistema imune do inseto em reconhecer e eliminar o patógeno (Sinden, 2002; Christophides, 2004). Para lidar com o risco de infecção causada pela exposição aos mais diversos micróbios, os insetos desenvolveram um sistema imune composto de uma variedade de mecanismos de defesa funcionando em sinergia. Embora menos complexo que a imunidade adaptativa dos vertebrados, devido à ausência de anticorpos e memória do tipo linfócitos B, o sistema imune dos insetos é rapidamente ativado após uma infecção e apresenta, inclusive, certo grau de especificidade a diferentes classes de micróbios (Dimopoulos, 2003).

As respostas imunes dos insetos envolvem mecanismos de defesas celulares e humorais, que são desencadeados pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRR, *pattern recognition receptor*), capazes de se ligar especificamente a padrões moleculares associados a patógenos (PAMP,

pathogen-associated molecular patterns) (Medzhitov & Janeway Jr., 2002). Os PRRs podem mediar diretamente a eliminação do micróbio através de fagocitose, ou indiretamente, através do desencadeamento de cascatas de proteases serínicas, que subsequentemente acionam reações de defesa como a encapsulação melanótica; ou a ativação das vias imunes intracelulares, que regulam a transcrição de peptídeos antimicrobianos (AMP, *antimicrobial peptides*) e outros genes efetores de imunidade (Hoffmann *et al.*, 1999; Hoffmann & Reichhart, 2002; Lemaitre & Hoffmann, 2007).

A disponibilização da sequência do genoma do mosquito *Ae. aegypti* (Nene *et al.*, 2007), em combinação com metodologias de análise de expressão gênica de alta vazão e genética reversa, tem gerado novas oportunidades para o estudo das respostas imunes deste mosquito contra diversos patógenos (Xi *et al.*, 2008; Souza-Neto *et al.*, 2009; Zou & Souza-Neto *et al.*, 2011). Estudos envolvendo microarranjos de DNA revelaram que a infecção do mosquito com o DENV resulta em uma ativação massiva de genes do sistema imune do inseto, incluindo fatores associados às vias Toll e JAK-STAT (Xi *et al.*, 2008). Além disso, ensaios funcionais de silenciamento gênico mediado por RNAi demonstraram que é possível alterar a susceptibilidade do *Ae. aegypti* ao DENV através da supressão ou ativação ectópica das vias Toll (Xi *et al.*, 2008) e JAK-STAT (Souza-Neto *et al.*, 2009), sugerindo que estas vias desempenham um papel fundamental na defesa anti-DENV e influenciam diretamente a competência vetorial do mosquito.

Em drosófilas, as vias Toll e Imd regulam a imunidade sistêmica contra bactérias e fungos. Quando da infecção por bactérias gram-positivas ou fungos, a via Toll é ativada por dois sistemas sensíveis a patógenos. Primeiramente os receptores de reconhecimento fazem a detecção de proteínas específicas dos patógenos e, em seguida, a atividade proteolítica que acompanha a invasão microbiana da hemolinfa é detectada (Gottar *et al.*, 2006; El Chamy *et al.*, 2008). Ambos os processos iniciam uma cascata de sinalização extracelular que leva à clivagem do pro-Spätzle em uma citocina ativa que se liga ao receptor Toll na membrana. Subsequentemente, uma via de sinalização intracelular leva à translocação de fatores de transcrição DIF (*Dorsal-related immunity factor*, em

adultos) e Dorsal (em larvas e adultos) ao núcleo. Os fatores de transcrição (DIF e Dorsal) se ligam aos elementos regulatórios em cis de resposta NF- κ B, induzindo a expressão de vários genes, incluindo uma gama específica de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como Drosomycina e Defensina (Merkling & Van Rij, 2012).

Bactérias gram-negativas ativam a via Imd pela detecção de peptidoglicanos pelos receptores PGRP-LC e PGRP-LE. Esses receptores acionam uma via intracelular e ativam outro fator (*Relish*). Uma vez ativado, o domínio *Rel* do *Relish* é translocado ao núcleo e induz a transcrição de outro conjunto de genes imunes e AMPs, como Diptericina e Cecropina (Merkling & Van Rij, 2012).

Conjuntamente, as vias Toll e Imd induzem fatores que participam na eliminação de micróbios, fagocitose (Lemaitre & Hoffmann, 2007), e outras cascatas através da secreção de AMPs, que individualmente, apresentam concentrações e dinâmicas diferentes (Bulet *et al.*, 1999). Embora as vias Toll e Imd ativem diferentes genes, a indução da expressão de AMP é tradicionalmente usada como caracterização para ativação de Toll e Imd (De Gregorio *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 2001; De Gregorio *et al.*, 2002; Boutros *et al.*, 2002).

Uma terceira via conservada evolutivamente, Jak-Stat (*Janus Kinase – Signal Transducers and Activators of Transcription*), foi originalmente estudada pelo seu papel no desenvolvimento da *Drosophila*. Entretanto, recentemente foi demonstrado seu papel imune, antimicrobiano e antiviral, através da ligação de uma citoquina (*Upd*) ao receptor *Domeless*. As *Drosophilas* codificam apenas uma quinase *Jak* e um fator de transcrição *Stat* (*Stat92E*), que dimeriza e transloca para o núcleo para coordenar transcrição de genes com os sítios de ligação *Stat* em suas regiões promotoras (Merkling & Van Rij, 2012) (Fig. 5).

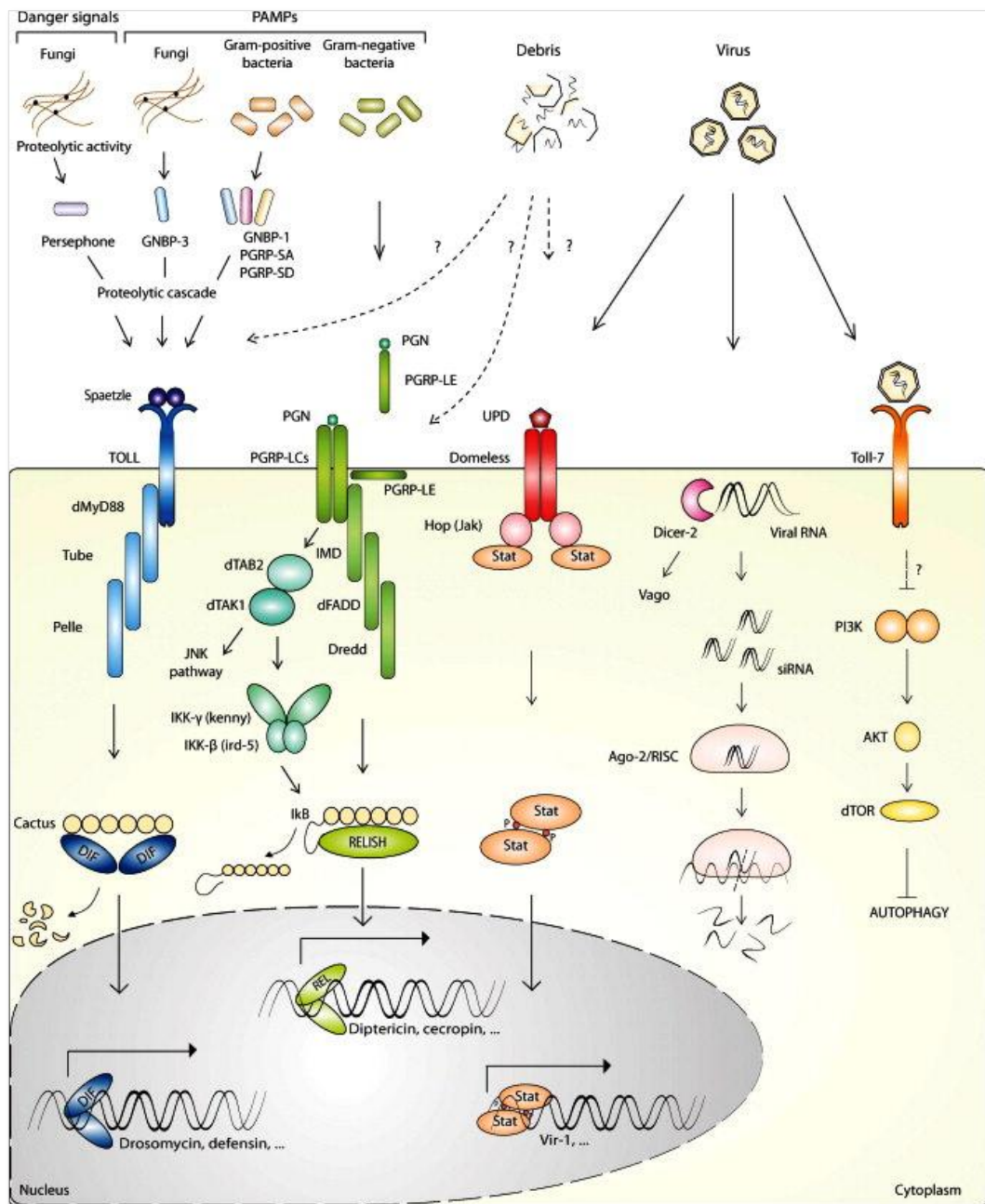


Figura 5. Vias imunes em *Drosophila*. Via Toll: detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou de sinal de perigo que ativa uma cascata proteolítica que cliva o precursor da citocina Spätzle. Esta se liga ao receptor Toll da membrana, induz sua dimerização e leva a ligação de proteínas que fazem a fosforilação do cactus. Os fatores de imunidade são levados ao núcleo, induzindo transcrição de genes imunes e peptídeos antimicrobianos. Via Imd: ligação de peptideoglicanos de bactérias gram- a seus receptores que recrutam moléculas da Imd, o que leva a ativação proteica ativando proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de Relish. Os subprodutos destas reações são levados ao núcleo, induzindo transcrição de genes imunes. Via JAK-STAT: após a infecção viral a via é ativada pela ligação de uma citocina ao receptor domeless. Após uma sequência de ligações e fosforilações a Stat92E fosforilada e dimerizada é translocada ao núcleo e induz transcrição de genes que contém sítios de ligação em seus promotores como o RNA-1 induzido por vírus (Merkling & van Rij, 2013).

O estudo das respostas transcricionais (Xi *et al.*, 2008; Souza-Neto *et al.*, 2009; Bonizzoni *et al.*, 2012), assim como de QTLs (Bosio *et al.*, 2000; Gomez-Machorro *et al.*; 2004; Bennett *et al.*, 2005) tem facilitado a elucidação dos fatores genéticos relacionados à competência vetorial do *Ae. aegypti* ao DENV, explicando, em parte, a grande variação na susceptibilidade de diferentes populações do mosquito ao vírus. No entanto, a grande variabilidade da carga viral entre mosquitos de uma mesma população (geneticamente semelhantes) indica que fatores ambientais, como por exemplo, a microbiota intestinal também exerça um papel importante na regulação deste fenômeno.

Os mosquitos, assim como os demais insetos, têm seu intestino-médio colonizado por uma microbiota simbiote que é necessária para o seu desenvolvimento (Dillon & Dillon, 2004), e para o funcionamento de diversos processos fisiológicos como digestão, nutrição, reprodução (Gaio *et al.*, 2011), maturação do sistema imune (Weiss *et al.*, 2011), bem como proteção contra patógenos (Hurst & Hutchence, 2010). Neste sentido, a influência que tais relações exercem sobre os insetos é uma forte justificativa para investigações do uso da microbiota para o controle das doenças transmitidas por vetores (Cirimotich *et al.*, 2011).

Estudos recentes indicam que a microbiota intestinal é um fator determinante na competência vetorial dos mosquitos. A remoção destes micróbios do intestino dos mosquitos vetores através de um tratamento com antibióticos resulta em níveis mais altos de infecção por *Plasmodium falciparum* em *Anopheles gambiae* e DENV em *Ae. aegypti* (Xi *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2009), sugerindo que tais bactérias protegem os insetos contra infecções por vírus e protozoários. Embora este mecanismo seja pouco conhecido, a hipótese mais aceita é a de que a microbiota promova uma estimulação basal do sistema imune dos mosquitos, o que resulta em um aumento na produção de moléculas efetoras que defendem os insetos contra infecções com patógenos humanos como o *P. falciparum* e o DENV (Cirimotich *et al.*, 2011).

Além da evidente ação indireta, através da ativação do sistema imune do mosquito, as bactérias podem apresentar diversos mecanismos de ação direta contra o patógeno. A lise de

tripanosomas (Castro *et al.*, 2007) e leishmanias (Moraes *et al.*, 2008) pela bactéria *Serraria sp.*, isolada de triatomíneos, foi observada após a formação de biofilme na superfície dos parasitas. Além disso, uma bactéria do gênero *Enterobacter* com potencial anti-*Plasmodium spp.* foi isolada do intestino-médio de anofelinos selvagens capturados na Zâmbia. Esta cepa de bactéria produz espécies reativas de oxigênio que matam o *Plasmodium* no intestino do mosquito, tornando os mosquitos refratários ao parasita (Cirimotich *et al.*, 2011). Além disso, um estudo recente demonstrou que a incubação do vírus *La Crosse* (família Bunyaviridae) com bactérias isoladas de mosquitos *Ae. albopictus* coletados na natureza causa uma redução na capacidade infectiva do vírus em experimentos *in vitro*, na ausência de fatores do vetor (Joyce *et al.*, 2011). Isso sugere que as bactérias podem interferir diretamente nos processos de reconhecimento, internalização e/ou replicação viral. Também foi demonstrado que um isolado de *Chromobacterium sp.* exerce função anti-*plasmodium* e anti-dengue quando cultivada em biofilmes. Como este tipo de bactéria coloniza o intestino de mosquitos, ela pode bloquear a infecção por DENV, além de poder servir como agente de biocontrole uma vez que possui atividade entomopatogênica contra mosquitos na fase larval e na fase adulta (Ramirez *et al.*, 2014).

Juntos, tais estudos não deixam dúvida de que a microbiota intestinal, provavelmente em sinergia com os fatores genéticos do vetor, influencia diretamente a susceptibilidade do mosquito ao vírus dengue. Desta forma, a caracterização da microbiota intestinal em população de mosquitos com diferentes níveis de suscetibilidade ao DENV pode revelar informações importantes de como a flora microbiana atua neste processo.

1.5. Medidas de Controle

Após a descoberta de que a dengue e a febre amarela eram transmitidas por mosquitos, medidas de controle do vetor foram adotadas. Elas se baseavam principalmente no controle do vetor no peridomicílio das residências, local onde ocorre a maioria das transmissões. Estes métodos

incluíam: redução dos locais de reprodução do mosquito, melhoria no manejo dos resíduos sólidos, organização do ambiente urbano, maiores investimentos e efetividade nos programas de educação da rede pública (Malavige *et al.*, 2004). Análises laboratoriais também são indispensáveis para a prevenção, pois o diagnóstico correto e o tratamento imediato possuem um papel importante para a saúde da pessoa acometida pela dengue (Gubler, 1998b; Donalísio & Glasser, 2002). Também foram usados por muito tempo vários inseticidas químicos, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), o qual quase erradicou o *Ae. aegypti* das Américas (Gubler, 2004). Entretanto o número de casos de dengue e dengue severa aumentou aproximadamente 500 vezes nas últimas décadas e continua progredindo (Kyle & Harris, 2008; Brady *et al.*; 2012).

Com o desuso de algumas medidas de controle, somado à resistência do vetor aos inseticidas nos últimos anos, o *Ae. aegypti* se expandiu amplamente e está presente em todas as áreas tropicais do globo terrestre (CDC, 2009). Em 2014, foram notificados aproximadamente 1,2 milhões de casos de dengue somente nas Américas, dos quais 16.044 progrediram para DS (WHO, 2014). Há várias explicações para o aumento na incidência de dengue e DS, principalmente em países em desenvolvimento. Destacam-se a expansão populacional humana, urbanização não controlada e as más condições sanitárias, falta de um controle efetivo do vetor, evolução do vírus, mudanças climáticas e grandes deslocamentos populacionais (Igarashi, 1997; Gubler, 2004; Kyle & Harris, 2008; Wilder-Smith & Gubler, 2008; WHO, 2014). Neste ano, somente no Brasil já foram notificados 224.101 casos de dengue, um aumento de 57% em relação ao ano anterior onde a região Sudeste apresenta o maior número de casos notificados em relação ao total do país (145.020 casos; 64,7%) (SVE, 2015).

Deve-se ressaltar, porém, que países desenvolvidos não estão livres das epidemias de dengue. Em Singapura, por exemplo, programas de controle do vetor têm sido adotados desde 1970 e apesar de um declínio no número de casos da doença nos primeiros 20 anos do programa, foi relatado um aumento desde os anos 90 (Ooi, 2006).

O desenvolvimento de uma vacina para combater globalmente a doença tem se mostrado um complexo desafio (Hatch *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a imunidade de um indivíduo após a infecção por um dos sorotipos DENV é duradoura (Ooi *et al.*, 2006), entretanto, após um curto período (2-9 meses) o indivíduo se torna susceptível à infecção pelos outros sorotipos de DENV (Wearing & Rohani, 2006), sendo que a reinfeção com outro sorotipo é altamente correlacionada com casos severos da doença (Halstead *et al.*, 1970; Thein *et al.*, 1997; Guzmán, 2005). Tem sido postulado que esta severa reação secundária é decorrente de níveis subneutralizantes de anticorpos específicos da infecção primária, os quais se ligam ao vírus da infecção secundária criando complexos, que são direcionados a fagócitos mononucleares, alvo preferencial para infecção por dengue (Kou *et al.*, 2008). Foi descrito um modelo no qual se credita a severidade da doença à proporção de fagócitos infectados (Halstead, 1988). Estudos *in vitro* têm mostrado que a replicação do DENV para maiores titulações em culturas de monócitos humanos na presença de níveis subneutralizados de anticorpos DENV suportam esse modelo (Kou *et al.*, 2008). Este modelo também foi demonstrado em primatas, quando macacos *rhesus* foram infectados com qualquer um dos 4 sorotipos DENV e reinfectados com outro sorotipo diferente, o principal pico de viremia foi significativamente maior que na infecção primária (Halstead, 1988).

Dada a circulação de todos os sorotipos da DENV, a imunização contra apenas um deles pode ser mais perigosa que a não imunização. Consequentemente, as pesquisas atuais são focadas no desenvolvimento de vacinas tetravalentes, as quais podem imunizar contra os 4 sorotipos simultaneamente. Entretanto, encontrar o correto balanço de imunógenos para essa vacina tem sido um grande desafio. Milhões de dólares têm sido gastos no desenvolvimento de vacinas; uma delas, trivalente, gerou resultados positivos em estudos clínicos em adultos e crianças (Sanofi-Aventis, 2009). Entretanto, estudos mais recentes relatam que os resultados da fase 2 de uma vacina tetravalente apresentaram apenas 30% de eficácia para os DENVs-1, 3 e 4, não protegendo contra o DENV-2, que é o principal sorotipo circulante na região onde foram realizados os testes (Sabchareon *et al.*, 2012).

No Brasil, o Instituto Butantan, órgão da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, em parceria com os Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos (NIH - *National Institutes of Health*) desenvolveu uma vacina (vírus atenuados) contra a dengue. A vacina será preventiva e tetravalente, protegendo contra os quatro sorotipos do vírus. Os testes realizados no Brasil correspondem à fase II do estudo (fase clínica), que está dividida em duas partes e também conta com a participação do Instituto Central e Instituto da Criança, ambos do HC da FMUSP, e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP). O objetivo destes testes (fase II), segundo Alexander Precioso (diretor da Divisão de Ensaios Clínicos e Farmacovigilância do Instituto Butantan), é demonstrar o perfil de segurança da vacina, ou seja, identificar possíveis efeitos adversos tanto no local de aplicação como os efeitos sistêmicos, e verificar se ela é capaz de levar à produção do anticorpo (Padmanabhan, 2014; Felix, 2014). Outros estudos também buscam um melhor entendimento de como os vírus interagem com seus hospedeiros para que novas terapias com antivirais específicos sejam desenvolvidos.

Com isso, atualmente o controle de transmissão da dengue é restrita à eliminação do mosquito vetor, sendo o uso de inseticidas químicos que atuam no sistema nervoso do mosquito, o método mais empregado. No entanto sua eficiência tem sido diminuída pelo aparecimento de mecanismos de resistência no inseto para todas as classes de inseticidas empregados atualmente (Braga *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2012).

Uma vez que resistência aos inseticidas tenha sido detectada, o conhecimento sobre a estruturação genética e a dinâmica populacional do *Ae. aegypti* se torna de grande valia já que populações geneticamente distintas podem apresentar diferenças quanto à sua capacidade e competência vetorial (Black *et al.*, 2002; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004). Estudos populacionais do mosquito tem sido realizados pelo uso de ferramentas moleculares como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990; Paduan *et al.*, 2006), microsatélites (Chambers *et al.*,

2007), sequências de genes do DNA mitocondrial (Bosio *et al.*, 2005; Paduan *et al.*, 2008) e SNPs (Polimorfismos de Único Nucleotídeo) (Paduan & Ribolla, 2009).

Com o surgimento de outras ferramentas, como o sequenciamento de nova geração (NGS), novas estratégias vem sendo adotadas para desvendar os mecanismos envolvidos na susceptibilidade do vetor aos patógenos, tal como o estudo da expressão gênica global do mosquito *Ae. aegypti*. Quando estes são infectados por arbovírus, seu transcriptoma e proteoma sofrem alterações. Por isso, diversos estudos têm perfilado sua expressão gênica e respostas do sistema imune durante o curso da infecção por flavivírus, na busca de identificar possíveis genes ou mutações envolvidos neste fenótipo (Behura *et al.*, 2011; Colpitts *et al.*, 2011; Luplertlop *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011; Bonizzoni *et al.*, 2012; Sim *et al.*, 2013; Bonizzoni *et al.*, 2013).

Além dos fatores genéticos, a caracterização das interações entre microbiota-mosquito-dengue oferecem uma nova oportunidade para o desenvolvimento de estratégias promissoras para o controle da dengue. Por exemplo, a identificação de bactérias simbiotes nativas da microbiota intestinal do mosquito pode facilitar a geração de linhagens de mosquitos com uma elevada prevalência da bactéria comensal com ação inibitória ao patógeno. Por outro lado, a identificação e isolamento de moléculas de origem bacteriana com propriedades antivirais teria um grande apelo farmacêutico para o tratamento da dengue. Para isso, será de fundamental importância examinar detalhadamente a microbiota nativa e seu impacto natural na susceptibilidade do mosquito ao vírus.

Desta forma, o conhecimento aprofundado sobre os fatores genéticos que controlam a interação entre vetor e vírus, em especial a competência vetorial/susceptibilidade de populações brasileiras do mosquito *Ae. aegypti*, é crucial, uma vez que populações diferentes podem apresentar diferenças quanto a sua capacidade e competência vetorial. Portanto, torna-se necessário obter avanços nas pesquisas envolvendo a interação vetor-patógeno, no conhecimento dos mecanismos de infecção no mosquito vetor, bem como, no entendimento dos elementos ambientais e genéticos que conferem variados graus de competência vetorial a diferentes populações do mosquito vetor. Neste

sentido, o estudo dos processos que governam a interação do vírus com o mosquito vetor gerará informações valiosas para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle da dengue.

2. Justificativa

2. Justificativa

Dentre as doenças transmitidas pelo *Ae. aegypti*, a dengue é a de maior relevância no âmbito da saúde pública. Cerca de dois bilhões de pessoas vivem em áreas onde é possível a sua transmissão. O impacto desta arbovirose sobre a população humana é notado tanto pelos sintomas que causa, como pela ocorrência de óbitos. Como não existem vacinas nem tratamento específico disponível à população, a prevenção e o controle da doença ainda dependem completamente de medidas profiláticas e da eliminação dos vetores.

No Brasil, há relatos oficiais da circulação dos quatro sorotipos do DENV, fato que, somado à alta densidade vetorial, favorece o surgimento de casos graves da doença.

Desta forma, o conhecimento aprofundado sobre os fatores genéticos que controlam a interação entre vetor e vírus, em especial a competência vetorial/susceptibilidade de populações brasileiras do mosquito *Ae. aegypti* é crucial, uma vez que populações distintas podem apresentar diferenças quanto a sua capacidade e competência vetorial. Portanto, torna-se necessário obter avanços nas pesquisas envolvendo a interação vetor-patógeno, no conhecimento dos mecanismos de infecção no mosquito vetor, bem como, no entendimento dos elementos ambientais e genéticos que conferem variados graus de competência vetorial a diferentes populações do mosquito vetor. Neste sentido, o estudo dos processos que governam a interação do vírus com o mosquito vetor gerará informações valiosas para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle da dengue.

3. Objetivos

3. Objetivos

Avaliar comparativamente os fatores genéticos e microbianos possivelmente relacionados a eventuais diferenças na susceptibilidade de populações naturais do mosquito *Ae. aegypti* ao vírus dengue. Para tal, foram adotados os objetivos específicos a seguir:

1. Análise comparativa da susceptibilidade de populações naturais de *Ae. aegypti* de diferentes localidades do Brasil à infecção por DENV-4.
2. Analisar as respostas transcricionais globais de populações naturais de *Ae. aegypti* com diferentes níveis de susceptibilidade ao DENV-4, através do sequenciamento de nova geração (NGS).
3. Realizar estudo da diversidade microbiana de *Ae. aegypti* através do sequenciamento do gene bacteriano 16S rRNA por sequenciamento NGS.

4. Materiais e Métodos

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção de mosquitos *Aedes aegypti*

No presente estudo foram utilizadas duas populações de campo de *Ae. aegypti*. Recebemos ovos das populações de Botucatu/SP e Neópolis/SE em colaboração, respectivamente, com a Secretaria de Vigilância Epidemiológica de Botucatu e com o Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella da UFS - Universidade Federal de Sergipe. As coletas foram realizadas pelas equipes de cada uma das cidades selecionadas utilizando-se ovitrampas (Fig. 6) (Fay & Eliason, 1966).



Figura 6. Esquema representativo de uma ovitrampa utilizada para captura de ovos do mosquito *Aedes aegypti*. (Comunicação / Instituto Oswaldo Cruz, 2014).

4.2 Formação de colônias

No insetário do Departamento de Parasitologia (IBB, UNESP) cada linhagem foi mantida até o estágio adulto em condições controladas (temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $80\% \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12h). Para a população de Botucatu foi necessária a realização de triagem dos mosquitos, pois recebemos os ovos em ovitrampas. A triagem consiste em separar as pupas em copo plástico com água e acondicioná-las individualmente em gaiolas de triagem para a identificação individual dos insetos adultos emergidos. Com isso, foram formadas colônias somente de *Ae. aegypti*, uma vez que ovos de *Ae. albopictus* também

poderiam estar na ovitrampa. Para a população de Neópolis este procedimento não foi necessário, pois os mosquitos já haviam sido triados por nossos colaboradores. Exemplares, fêmeas e machos de *Ae. aegypti* destas populações foram transferidos para a gaiola de formação da colônia. Por fim, formamos colônias da geração F₁ para as duas populações. Cada colônia foi mantida com alimentação energética constante (solução sacarose 10%, disposta em flaconetes de algodão) e repasto sanguíneo (camundongo imobilizado) a cada três dias. Em cada gaiola ficou disponível um sítio para postura dos ovos (copo plástico contendo água, revestido de papel filtro para fixação dos ovos). Os papéis filtro contendo ovos foram coletados e secos à temperatura ambiente (T.A.). Parte dos ovos postos (geração F₂) foi enviada ao Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz Minas Gerais para realização dos ensaios de infecção e o restante foi armazenado nas mesmas condições de temperatura e umidade das colônias para mantê-los viáveis para posterior utilização em outros experimentos.

4.3 Caracterização da susceptibilidade do *Ae. aegypti* ao DENV

4.3.1 Ensaios de infecção com DENV

Todos os procedimentos de multiplicação viral, titulação e infecção oral dos mosquitos foram realizados em parceria com a equipe do professor Dr. João Tindade Marques da Universidade Federal de Minas Gerais e em colaboração com o grupo do Pesquisador Dr. Luciano Andrade Moreira do Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz Minas Gerais, onde as etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas dentro das normas internacionais de biossegurança e bioproteção.

4.3.2 Cepa Viral

A cepa viral utilizada nestes experimentos foi a DENV-4, isolada em 1981 na cidade de Boa Vista-RR, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Trindade Marques (IBC/UFMG).

4.3.3 Multiplicação Viral

Para a multiplicação foram empregadas garrafas de cultura de células C6/36, contendo 3×10^5 células/mL, em meio L-15 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após a formação da confluência da monocamada de células (90-95%), o meio de cultura foi retirado e 1 mL de solução contendo meio L-15 sem soro e os vírus na multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 10^{-4} foram inoculados. Após 1 hora (período de adsorção), foram adicionados às garrafas 4 mL de meio L-15 suplementado com 2% SFB. As células foram colocadas em estufa B.O.D. a 28°C e observadas diariamente por 5 dias para avaliar o efeito citopático. Após este período o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 2.000 $\times g$ por 10 minutos a 4°C e armazenado a -70°C.

4.3.4 Titulação Viral

Para determinar o título dos vírus, foram utilizadas placas de 6 câmaras com meio DMEM e 5% de SFB, contendo células BHK-21 (5×10^5 células/câmara). Na monocamada de células confluentes foram inoculados 400 μ L de uma série de diluições contendo o vírus, sendo utilizada como controle uma câmara com células não infectadas. Após a incubação, o meio foi desprezado e as células lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado o meio DMEM contendo 1,5% de carboximetilcelulose e as placas incubadas a 37°C por 5 dias em estufa com 5% de CO₂. O número de placas de lise foi contado após coloração com solução de 1% de cristal violeta em PBS 1X para a determinação do título viral por unidade formadora de placa (PFU/mL).

4.3.5 Infecção oral

O procedimento de infecção foi realizado de acordo com Moreira e colaboradores (2009), sendo a alimentação com sangue realizada utilizando fêmeas adultas de *Ae. aegypti* com 3 a 5 dias da emergência da pupa. Um total de 120 fêmeas de mosquitos de cada população, cuja alimentação com solução de sacarose 10% foi retirada 24 horas antes da

infecção oral, foram alimentadas por aproximadamente 60 minutos com uma mistura de suspensão de vírus em células C6/36 e sangue humano (hemácias lavadas e o estoque de vírus (1:1) com adição de 10% de concentração final de soro humano inativado). O título viral (PFU/mL) utilizado em nosso experimento foi 1×10^7 . Esta mistura foi mantida a 37°C em um alimentador artificial (Fig. 7).

Após a alimentação sanguínea, os mosquitos foram anestesiados com CO₂ para separação das fêmeas ingurgitadas, as quais foram mantidas a 28°C com umidade de 70-80%, e alimentadas com solução de sacarose 10%.



Figura 7. Exemplo de alimentador artificial para alimentação sanguínea de fêmeas de *Ae. aegypti*. Retirado de <http://vosshall.rockefeller.edu/research>.

4.3.6 Processamento de mosquitos

Todos os mosquitos ingurgitados das duas populações foram coletados no quarto dia após alimentação (dpa) com DENV-4, e estocados individualmente em microtubos de 1,5 mL com tampa de rosca contendo duas microesferas de vidro (2 mm) e 200 µL de TRIzol (Invitrogen), os quais foram homogeneizados em agitador *Mini-BeadBeater-16* (Biospec) e armazenados a -80°C até o momento do isolamento do RNA total.

4.3.7 Isolamento de RNA total

Após homogeneização dos mosquitos macerados em reagente TRIzol e incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, foi adicionado ao microtubo 40 µL de clorofórmio. A mistura foi novamente homogeneizada e incubada em T.A. por 10 minutos e centrifugada a 13.200 rpm (rotações por minuto) por 15 minutos a 4°C. A parte aquosa foi transferida para um novo microtubo e neste foi adicionado 100 µL de isopropanol gelado e incubado em T.A. por 10 minutos. Na sequência, o microtubo foi novamente centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado com cuidado para não descartar o sedimento de RNA. O sedimento foi lavado com 200 µL de etanol 75% e, depois de centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C, o etanol foi descartado e o microtubo deixado aberto para secagem do sedimento. O RNA foi homogeneizado em 20 µL de água livre de RNases e estocado em freezer -80°C até a sua utilização.

4.3.8 Quantificação RNA total

A quantificação das amostras de RNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). A concentração foi mensurada em ng/µL, sendo convertida em µg/µL para ser utilizada na preparação do cDNA de cada amostra.

4.3.9 Tratamento com DNase

Em microtubos de 0,2 mL foram adicionados: 1 µg do RNA total, 1 µL de tampão de reação 10X para DNase e 1 µL de DNase e colocados a 37°C. Após 30 minutos de incubação, adicionou-se 1 µL de EDTA 25 mM, e em seguida o tubo foi mantido a 65°C por 10 minutos e imediatamente resfriado em gelo.

4.3.10 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). As reações foram preparadas com os mosquitos individuais ingurgitados provenientes dos ensaios de infecção, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante

contendo: 1 µg de RNA total tratado com DNase, 1 µL de *random primer*, 4 µl do tampão 5X, 1 µL de *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/µL), 2 µL de dNTP mix (10 mM), 1 µL de *RevertAid M-MuLV RT* (200 U/µL) e H₂O para completar o volume final de 20 µL. A ciclagem aplicada para a síntese do cDNA foi uma incubação à 25°C por 5 minutos seguida de uma incubação à 42°C por 60 minutos e uma incubação final à 70°C por 5 minutos. Após a síntese do cDNA, as amostras foram armazenadas à -80°C até o momento do uso para quantificação viral e análise de expressão gênica.

4.3.11 Quantificação relativa de DENV-4 por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para a quantificação relativa da carga viral empregamos a técnica de qRT-PCR utilizando o equipamento StepOne PLus™ *Real Time PCR System* (Applied Biosystems), no qual um par de iniciadores foi desenhado para amplificar parte da região 5'UTR do DENV-4 e outro para amplificar parte da proteína ribossomal (Rp49/L32) (gene constitutivo de *Aedes aegypti*) utilizada como controle endógeno (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências de iniciadores utilizados para quantificação viral.

Produto gênico	Iniciadores (5'-3')		Referência
	<i>Sense</i>	<i>Antisense</i>	
DENV-4 5' UTR	TCGGAAGCTTGCTTAACACA	TTCGTTGGTTCATTTTCCAG	*
Proteína Ribossomal (Rp49/L32) AAEL003396	ACAAGCTTGCCCCCAACT	CCGTAACCGATGTTTGGC	Bonizzoni <i>et al.</i> , 2011

* Sequências de iniciadores cedidas pela equipe do Prof. Dr. João Trindade Marques da Universidade Federal de Minas Gerais.

As reações foram realizadas utilizando 7,5 µL de *Master Mix* (2X) do kit comercial *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix* (Thermo Scientific), 0,75 µL de cada iniciador (0,5 µM), 1 µL de cDNA e H₂O para completar o volume final de 15 µL. Os ciclos de amplificação seguiram

o programa padrão: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos com 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, acrescido do passo do cálculo da temperatura de *melting* (T_m).

Para a análise dos dados aplicamos o método $2^{-\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) utilizando o gene constitutivo Rp49/L32 como normalizador. Para comparação da expressão de DENV-4 entre as populações do estudo utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney com indicativo de significância estatística os valores de $p < 0.05$.

4.4 Análise da expressão gênica global de mosquitos *Ae. aegypti* em resposta ao DENV

4.4.1. Sequenciamento de nova geração de RNA total (RNA-seq)

Utilizamos o sequenciamento de RNA total pela técnica de RNA-seq em plataforma HiScan™SQ (Illumina) para analisar a expressão gênica diferencial entre as amostras do estudo submetidas a infecção por DENV-4.

4.4.2 Amostras do estudo

O RNA total foi extraído com TRIzol (Invitrogen Life Technologies) conforme descrito no item 4.3.7. Cada amostra foi formada por um *pool* de 10 mosquitos, todos alimentados com suspensão de vírus em células C6/36 e sangue humano, onde o RNA dos mosquitos individuais foram combinados em igual concentração para o preparo de bibliotecas *paired-end*, totalizando 5 *pools* como descrito na Tabela 2. O critério utilizado para a formação dos *pools* foi a infectividade dos mosquitos individuais, os quais foram divididos em grupos (*pools*) de mosquitos ingurgitados-positivos e ingurgitados-negativos para DENV-4, determinados através da quantificação por qPCR. Os *pools* das amostras ingurgitadas-positivas foram selecionados pelo menor valor de *threshold cycle* (C_T) na quantificação por qPCR para DENV-4, enquanto para os *pools* das amostras ingurgitadas-negativas foram selecionadas amostras com C_T acima de 34, (pois a partir deste valor de C_T as amostras eram consideradas negativas para DENV-4) para ambas as populações do estudo. Depois de quantificados em NanoDrop® 2000c (Thermo

Scientific), os *pools* foram enviados ao Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da UNESP de Jaboticabal/SP, onde foram realizadas as demais etapas de processamento das amostras e sequenciamento utilizando a plataforma HiScan™SQ (Illumina).

Tabela 2. Caracterização dos *pools* de mosquitos utilizados na plataforma HiScan™SQ (Illumina).

Identificação da amostra	População	No. de amostras/ <i>pool</i>
BTU+	Botucatu/SP	10
BTU- (rep.b1)	Botucatu/SP	10
BTU- (rep.b2)	Botucatu/SP	10
NEO+	Neópolis/SE	10
NEO-	Neópolis/SE	10

BTU: *Ae. aegypti* da população coletada na cidade de Botucatu-SP; BTU- (rep.b1): Réplica biológica 1 da população de Botucatu-SP; BTU- (rep.b2): Réplica biológica 2 da população de Botucatu-SP; NEO: *Ae. aegypti* coletados na cidade de Neópolis-SE; (+): amostras positivas para DENV-4; (-): amostras negativas para DENV-4.

4.4.3 Preparo das bibliotecas

Para o preparo das bibliotecas foi utilizado o kit *TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation* de acordo com instruções do fabricante (Illumina), sendo as etapas descritas brevemente abaixo.

4.4.3.1 Quantificação

Antes de iniciarmos o processo de preparo das bibliotecas e a síntese de cDNA, os *pools* de RNA foram analisados quantitativamente e qualitativamente por NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific), Qubit® (Life Technologies), e Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Este passo é importante para determinar a quantidade de RNA total inicial para síntese de cDNA que deve estar entre 0,1-1 µg, bem como para verificar a qualidade de cada *pool*, através do valor de RIN (*RNA Integrity Number*) (Schroeder *et al.*, 2006).

4.4.3.2 Purificação e Fragmentação

O primeiro passo para o preparo das bibliotecas envolve a remoção do RNA ribossomal (rRNA), e fragmentação das amostras através do kit *Ribo-Zero rRNA* (Illumina) seguindo instruções do fabricante. Para a remoção do rRNA foram utilizados iniciadores biotinilados específicos combinados com esferas magnéticas. Após a remoção do rRNA, o RNA purificado foi fragmentado em pequenos pedaços utilizando cátions bivalentes sob alta temperatura, isto resultou em bibliotecas com fragmentos variando de 120-200 pares de base (pb), com um tamanho médio de 150 pb.

4.4.3.3 Síntese de cDNA

Os fragmentos de RNA clivados foram utilizados para a síntese da primeira fita de cDNA utilizando transcriptase reversa e iniciadores randômicos. Neste processo há também a adição de actinomicina D (*First Stand Synthesis Act D mix - FSA*), que impede a síntese de cadeia DNA-dependente, permitindo a síntese somente de cadeia RNA-dependente, melhorando a especificidade da amplificação.

Em seguida foi realizada a síntese da segunda fita de cDNA utilizando uma DNA polimerase I e RNase H. Este processo remove o RNA molde e sintetiza uma cadeia de substituição, incorporando dUTP no lugar de dTTP para gerar ds cDNA. A incorporação de dUTP destrói a segunda cadeia durante a amplificação, pois a polimerase não incorpora após este nucleotídeo. Esferas magnéticas *AMPure XP* foram utilizadas para separar o ds cDNA a partir da reação da segunda fita. No final deste processo obtivemos cDNA *blunt-ended* (DNA sem pontas sobressalentes).

4.4.3.4 Adenilação, Ligação e Enriquecimento

Para dar prosseguimento ao preparo das bibliotecas foi realizada a adenilação (adição de uma única adenina "A") das extremidades 3' dos fragmentos *blunt-ended* para impedir a ligação um ao outro durante a reação de ligação dos adaptadores. Assim um nucleotídeo 'T' na

extremidade 3', correspondente único do adaptador, fornece uma saliência complementar para a ligação do adaptador ao fragmento. Essa estratégia garante uma baixa taxa de formação de quimera (modelo concatenado).

Com os fragmentos adenilados, foi realizada a ligação dos adaptadores de indexação nas extremidades dos ds cDNA, preparando-os para a hibridização na *flow cell*.

O enriquecimento dos fragmentos foi realizado por PCR, utilizando *PCR primer cocktail*, que anela com as extremidades dos adaptadores, enriquecendo seletivamente fragmentos que possuem moléculas adaptadoras ligadas em ambas as extremidades, amplificando assim a biblioteca de DNA. Fragmentos com apenas um ou sem adaptadores nas suas extremidades são subprodutos da reação de ligação. Nenhum destes fragmentos pode ser utilizado para formar *clusters*. Fragmentos sem quaisquer adaptadores, não podem hibridar com iniciadores ligados à superfície da *flow cell*. Os fragmentos com um adaptador em apenas uma extremidade pode hibridizar aos iniciadores ligados à superfície da *flow cell*, mas não podem formar *clusters*.

4.4.3.5 Validação, Quantificação e Normalização

Após a confecção das bibliotecas foi realizada a validação das mesmas pelo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). A validação consiste na aferição da qualidade e na quantidade de DNA.

Para obtenção de dados com alta qualidade é importante criar uma densidade de *clusters* ótimos através de cada ciclo da *flow cell*. Otimizar as densidades de *clusters* requer uma quantificação precisa dos *templates* da biblioteca de DNA. Para isso foi realizada a quantificação das bibliotecas por qPCR utilizando o kit de quantificação *Kapa* (Kapa Biosystem) para determinar a concentração equimolar de cada biblioteca de acordo com instruções do fabricante.

As bibliotecas de DNA indexados foram normalizadas a 10 nM e depois agrupadas (*pool*) em volumes iguais na placa para subsequente utilização no sequenciamento *paired-end* 2x100 bases em equipamento HiScan™SQ (Illumina).

4.4.4 Sequenciamento (RNA-seq)

O sequenciamento foi realizado em equipamento HiScan™SQ (Illumina) aplicando uma corrida de 200 ciclos com duração de aproximadamente 8 dias. O resultado foi enviado pelo Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da UNESP de Jaboticabal/SP através do BaseSpace (ambiente computacional em nuvem (*cloud computing environment*) da Illumina, que projeta dados de sequenciamento de nova geração, onde é possível armazenar, analisar e compartilhar dados genéticos) em arquivo formato FASTQ, o qual foi utilizado na análise dos dados.

4.4.5 Análise de dados de RNA-seq

A análise dos dados foi realizada na plataforma *CLC Genomics Workbench* versão 7.5 (<http://www.clcbio.com>) (Qiagen). Brevemente, as *tags* foram mapeadas utilizando-se como referência a anotação genômica da cepa Liverpool do *Ae. aegypti* (versão AaegL1.3, 02/04/2012), impondo-se o tamanho do fragmento em 20 nucleotídeos. Foi assumido que o nível de acúmulo dos RNAs poli-adenilados reflete as mudanças na atividade transcricional do gene correspondente e estimados em termos de *reads per kilobase per million mapped reads* (RPKM) (Mortazavi *et al.*, 2008). A expressão diferencial de genes entre as diferentes condições testadas foi determinada pelos testes de proporções com o valor *p* de 0,05 e *false discovery rate* (FDR) de 0,1% (Benjamini & Hochberg, 1995). A descrição da função das sequências dos transcritos foi baseada no banco de dados de Xi e colaboradores (2008). As análises de clusterização hierárquica foram realizadas e os diagramas analisados respectivamente nos *softwares* Cluster 3.0 e Java Treeview.

4.5 Estudo da diversidade microbiana através do gene ribossomal 16S (16S rRNA)

4.5.1 Insetos do estudo

Neste estudo utilizamos *pools* formados pelas mesmas amostras enviadas para o sequenciamento do RNA total como descrito na Tabela 2, porém neste caso foram utilizados *pools* de cDNA, como descrito no item 4.3.10.

4.5.2 Amplificação do gene 16S rRNA para sequenciamento NGS Illumina

Todos os ensaios para a amplificação do gene 16S rRNA de bactéria dos *pools* de mosquito foram realizados em triplicata, de acordo com Caporaso e colaboradores (2012). Cada reação continha 1 µL de cDNA molde (diluído 100x), 2,5 µL de tampão de reação 10X *Taq Platinum* (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies), 1,5 mM de MgCl₂, 0,28 mM de dNTPs (GE Healthcare), 2 U de *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen Life Technologies), 1 µL de cada iniciador *sense* e *antisense* (posições 515-806 da região variável V4 16S rRNA,) numa concentração final de 0,4 µM e H₂O para completar um volume final de 25 µL.

O iniciador *sense* utilizado para a amplificação foi comum para todos os *pools* de mosquitos enquanto o iniciador *antisense* foi diferente para cada *pool* de amostra. Este apresenta uma sequência adaptadora complementar de pareamento 3' com as sequências contidas na plataforma Illumina, uma sequência estabilizadora, uma sequência específica para pareamento com o gene 16S rRNA, e uma sequência código de barra (*index*) que varia de um iniciador *antisense* para outro (Tabela 3).

Todas as reações foram realizadas em termociclador *Mastercycler Nexus GX2* (Eppendorf) nas seguintes condições: 1 ciclo inicial de 95°C por 5 minutos (desnaturação), seguidos por 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 52°C por 45 segundos (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão), e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

Quatro microlitros do produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *GeRed* 0,5 µg/mL segundo recomendação do fabricante (Biotium). Os fragmentos amplificados foram comparados com o *DNA Ladder GeneRuler 1Kb Plus* (Invitrogen). O restante dos produtos de PCR foi utilizado para o sequenciamento na plataforma Illumina.

Tabela 3. Sequências de iniciadores utilizados para o estudo da diversidade microbiana de *Ae. aegypti* para a plataforma Illumina.

Amostras	Adaptador	Index	Estabilizadores	Específica 16S rRNA
Sequência do iniciador <i>sense</i>				
Todas	5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC		TATGGTAATT GT	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA ^{3'}
Sequencia dos iniciadores <i>antisense</i>				
BTU+	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	CCACAGATCGAT	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT ^{3'}
BTU- (rep.b1)	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	TATCGACACAAG	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT ^{3'}
BTU- (rep.b2)	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GATTCCGGCTCA	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT ^{3'}
NEO+	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	CGTAATTGCCGC	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT ^{3'}
NEO-	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	GGTGACTAGTTC	AGTCAGTCAG CC	GGACTACHVGGGTWTCTAAT ^{3'}

4.5.3 Purificação do DNA

Para a purificação dos produtos amplificados, as triplicatas de cada amostra foram misturadas em poços individuais em placa de PCR de 96 poços e então purificadas utilizando microesferas magnéticas (*AMPureXPgenecourt*). A cada amostra foi adicionado um volume de microesferas de 1,8X a quantidade de produto de PCR (volume total), e então homogeneizada e incubada à T.A. por 5 minutos. A placa contendo a amostra juntamente com as microesferas foi colocada em um suporte magnético *Ambion RNA* (Life Technologies) e incubada por 3 minutos à T.A. Ainda no suporte magnético todo o líquido foi pipetado e descartado. Posteriormente, a cada poço foi adicionado 200 µL de etanol 70%, incubado por 30 segundos à T.A. e em seguida o sobrenadante foi descartado (este passo foi repetido 2 vezes). Após este passo a placa foi retirada do suporte magnético e a cada poço foi adicionado 42 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) sobre o *pellet* de microesferas para liberar o DNA. A placa foi colocada novamente no suporte magnético e incubada por 1 minuto. Ao final, 40 µL da solução de DNA eluído foi transferido para um novo tubo.

4.5.4 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada em equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR* (Applied Biosystems), utilizando-se o kit *KAPA Library Quantification* (KapaBiosystems). Seis padrões (dsDNA) foram aplicados em placa de 96 poços, em triplicata, para a formação de uma curva de referência (20 pM, 2 pM, 0,2 pM, 0,02 pM, 0,002 pM, 0,0002 pM), que delimita os valores esperados da quantificação. As amostras amplificadas e purificadas foram diluídas em série (1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000) em tampão de diluição (solução Tris-HCl (10 mM) pH 8,0 + Tween 20 (0,05%)). Estas foram distribuídas em triplicatas em poços individuais contendo 4,0 µL do DNA diluído, 12 µL de *master mix Kapa*, 0,4 µL de *rox high* e H₂O para completar um volume final de 20 µL. Como controle negativo, foi adicionado apenas mix da solução e H₂O. Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos com 95°C por 30 segundos e 60°C por 45 segundos.

4.5.5 Sequenciamento 16S rRNA por NGS Illumina

Após a quantificação, as amostras foram diluídas para concentração de 2,0 nM, como recomendado pelo fabricante. Com todas as amostras na mesma concentração, o DNA hibrida corretamente às sondas do sequenciador e os clusters de leitura identificam precisamente as bases nucleotídicas das amostras.

Para a montagem do cartucho (*Nano flow cell*) de sequenciamento, todas as amostras foram agrupadas em um único *pool* (5,0 µL de cada amostra com concentração de 2,0 nM) e um controle positivo (amostra que já havia sido testada anteriormente). Após homogeneizar a mistura, 5 µL deste *pool* de amostras foi misturado à 5 µL de uma solução NaOH (0,2N), seguida de uma incubação à T.A. por 5 min. Após este passo, adicionamos 990 µL da solução tampão *Hyb* (Miseq Reagent Nano Kit v2, Illumina), responsável pela denaturação do DNA, formando uma biblioteca de DNA a 10 pM. Três iniciadores (*sense* (3,4 µL), *Index Sequence* (3,4 µL) e *antisense* (3,4 µL)) foram adicionados em um poço do cartucho Illumina e 600 µL da biblioteca de DNA foi adicionada a um compartimento diferente.

Antes de iniciar o sequenciamento unidirecional no equipamento MiSeq Personal Sequencer (Illumina) do Departamento de Genética/IBB/Botucatu, foi anexada uma planilha (*Sample Sheet*) com as seguintes informações: identificação do lote do cartucho, amostras e os iniciadores *antisense* utilizados. Dessa forma, o programa Illumina *Experiment Manager* é orientado a associar cada *read* identificada com sua amostra correspondente.

4.5.6 Processamento de dados - 16S rRNA e análise estatística

Os dados obtidos pelo sequenciamento foram processados no *software* Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Os arquivos que continham as amostras *forward* e *reverse* foram concatenados, gerando as sequências *paired end*, que foram alinhadas. As sequências obtidas foram processadas sendo retiradas as que possuíam tamanho, bases ambíguas fora dos padrões e que não alinharam com a região correta. A detecção de possíveis quimeras foi

realizado de acordo com Edgar *et al.* (2011), sendo estas sequências também retiradas do grupo a ser analisado. Após alinhamento das sequências restantes com o banco de dados SILVA (www.arb-silva.de) (Quast *et al.*, 2013), sequências de cloroplastos, Archeae, Eucariotos foram removidas.

As sequências foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (operational taxon units, OTUs) com níveis de similaridade mínima de 97%. Foram feitas subamostras com o intuito de normalizar o número de sequências usadas nas análises subsequentes. A cobertura foi calculada utilizando-se o método de Good (Good, 1953), a diversidade bacteriana foi calculada pelo inverso do índice de Simpson (Magurran, 2004) e do coeficiente de Chao (Chao, 1984).

A comparação da população microbiana das diferentes populações foi feita pelo método da Parsimônia e de componentes principais (PCA). Também foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) para comparar os grupos.

5. Resultados e Discussão

5. Resultados

5.1 Caracterização da susceptibilidade do *Ae. aegypti* ao DENV

5.1.1 Infecção oral de mosquitos - Avaliação das amostras

Dos 240 mosquitos alimentados (120 de cada população) conforme o item 4.3.5, foram separadas somente as fêmeas ingurgitadas, sendo 43 mosquitos de Botucatu-SP e 60 de Neópolis-SE. Quatro dias pós-alimentação, o RNA total foi extraído de mosquitos individuais e inteiros pelo método TRIzol e quantificado em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Os valores desta quantificação foram utilizados para analisar possíveis variações na concentração do RNA isolado (Fig. 8). Deste modo verificamos que este tipo de extração foi eficiente, pois a variação na concentração do RNA não foi estatisticamente significativa dentre as populações (*t-Student*, $p > 0.05$).

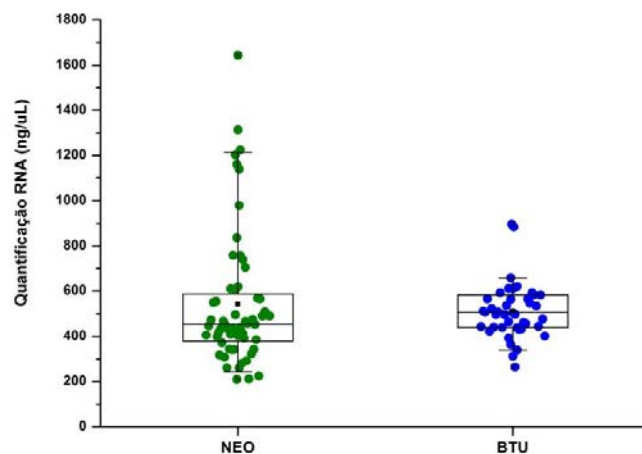


Figura 8. *Box plot* em que cada ponto representa a medida da quantificação do RNA total (ng/μL) de mosquitos individuais das populações de Neópolis-SE (NEO) e Botucatu-SP (BTU).

Para verificarmos a qualidade do RNA após a síntese de cDNA, analisamos as variações nos C_{Ts} do CE Rp49/L32 para cada amostra (Fig. 9). Observou-se discreta variação dos C_{Ts} , com uma média de C_T 18 nas duas populações, indicativo de boa qualidade do RNA isolado.

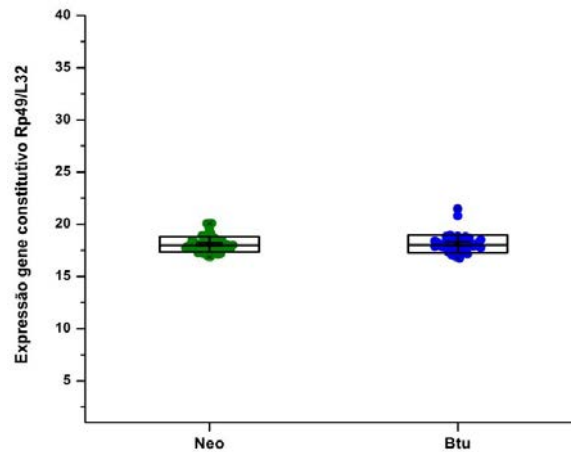


Figura 9. Box plot em que cada círculo representa a medida do C_T do CE Rp49/L32 de mosquitos individuais das populações de Neópolis-SE (NEO) e Botucatu-SP (BTU) obtida através de PCR em tempo real.

5.1.2 Quantificação relativa - DENV-4

A quantificação relativa de DENV-4 foi realizada nas 103 amostras ingurgitadas. A população de Neópolis apresentou prevalência de mosquitos infectados por alimentação artificial (mosquitos ingurgitados-infectados/mosquitos ingurgitados-não infectados) de 73%, enquanto para Botucatu foi de 27% (Fig. 10A). Uma vez que o procedimento de alimentação e determinação da concentração viral foi o mesmo entre as populações, fica clara a diferença na prevalência de mosquitos infectados da população de Neópolis em relação à população de Botucatu (Mann-Whitney, $p=0,0019$).

Para determinar a carga viral das amostras dos mosquitos em relação à expressão do CE Rp49/L32, utilizamos a equação $2^{-\Delta CT}$ (Schmittgen & Livak, 2008) (Fig. 10B). Para as amostras positivas foram obtidos valores variando entre 0,35 e 3×10^{-6} , enquanto para as amostras negativas a variação foi entre 10^{-6} e 10^{-7} (Tabela 4). A análise estatística mostrou diferença significativa (Mann-Whitney, $p=0,0019$) na carga viral entre as populações de Neópolis e Botucatu. Com isso, podemos inferir que a população de Neópolis-SE é mais susceptível ao vírus em relação à de Botucatu-SP, e devido a esta diferença na susceptibilidade, estas populações foram usadas nos estudos descritos a seguir.

Tabela 4. Dados gerais obtidos através dos experimentos de quantificação viral nas populações de Neópolis e Botucatu, após a infecção oral dos mosquitos.

População	Neópolis	Botucatu
No. Total	60	43
Variação	$1,09 \times 10^{-7}$ - 0,115	$1,11 \times 10^{-7}$ - 0,35
Prevalência (%)	73	27
Média	0,0061	0,0136
Mediana	$2,12 \times 10^{-5}$	$2,64 \times 10^{-7}$

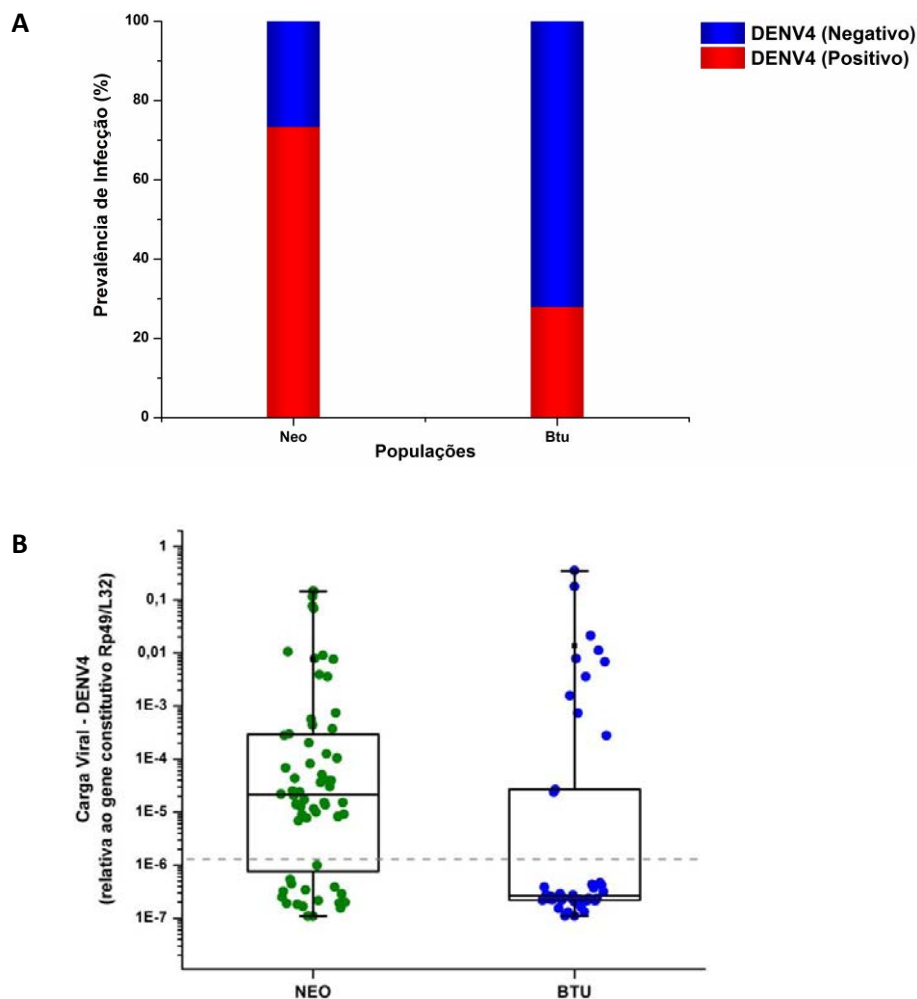


Figura 10. Ensaio da suscetibilidade das populações de *Ae. aegypti* oriundos de Botucatu e Neópolis. (A) Prevalência da infectividade ao DENV-4 entre as populações do estudo. (B) *Box plot* da quantificação relativa da carga viral de DENV-4 em relação ao CE Rp49/L32 pelo método de $2^{-\Delta CT}$. Os círculos representam os valores da quantificação dos mosquitos individuais das populações Neópolis-SE (NEO) e Botucatu-SP (BTU). Os círculos abaixo da barra pontilhada representam os valores abaixo do limite de detecção da técnica (C_T 40 - amostras não infectadas) para as respectivas populações.

5.2 Análise da expressão gênica global de mosquitos *Ae. aegypti* em resposta ao DENV

A disponibilização da sequência do genoma do mosquito *Ae. aegypti* (Nene *et al.*, 2007), em combinação com metodologias de análise de expressão gênica de alta vazão e genética reversa, tem gerado oportunidade para o estudo das respostas imunes deste mosquito contra diversos patógenos (Xi *et al.*, 2008; Souza-Neto *et al.*, 2009; Zou & Souza-Neto *et al.*, 2011, Bonizzoni *et al.*, 2012). No entanto, a maioria destes estudos foram realizados com populações de laboratório e nem sempre reproduzem as peculiaridades dos mosquitos no campo, que estão normalmente expostos a uma diversidade maior de patógenos (Sim *et al.*, 2013). Com o intuito de dissecar os mecanismos que controlam a suscetibilidade das populações naturais de *Ae. aegypti* ao DENV-4, realizamos uma avaliação transcricional global, através de RNA-seq Illumina, em mosquitos oralmente expostos ao vírus.

5.2.1 Sequenciamento de nova geração de RNA total (RNA-seq)

Para a análise da expressão gênica global nas amostras de *Ae. aegypti* das populações de Botucatu e Neópolis, foi utilizada a técnica de RNA-seq. Utilizou-se esta metodologia pois ela possibilita uma faixa de detecção muito maior quando comparada à técnica de microarranjo de DNA (9.000 vs. 100 vezes, respectivamente) (Marioni *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Em virtude da cobertura necessária para os estudos de RNA-seq e do alto custo da metodologia, foram analisadas as sequências dos transcritos e a expressão gênica global dos indivíduos das populações de Neópolis e Botucatu (populações consideradas suscetível e resistente, respectivamente) que apresentaram os fenótipos mais extremos ao DENV4 (ingurgitadas positivas e ingurgitadas negativas para DENV).

5.2.2 Preparo de bibliotecas

Após a identificação das amostras positivas e negativas pela quantificação relativa por qRT-PCR, utilizamos *pools* de RNA destas amostras como descrito no item 4.4.2 (Tabela 2), para o sequenciamento NGS do RNA total. Para isto, todos os *pools* foram quantificados em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) (Tabela 5) previamente ao envio das amostras para o Laboratório

Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da UNESP de Jaboticabal/SP, onde as bibliotecas foram confeccionadas e o sequenciamento realizado.

Tabela 5. Quantificação do RNA total (ng/μL) dos *pools* de amostras realizada por NanoDrop.

ID da amostra	População	ng/μL	Razão 260/280	μg total	Volume total (μL)
BTU+	Botucatu/SP	444,1	1,92	9,16	20,63
*BTU- (rep.b1)	Botucatu/SP	494,8	1,93	8,98	18,14
*BTU- (rep.b2)	Botucatu/SP	511,4	1,93	9,07	17,74
NEO+	Neópolis/SE	472,9	1,92	9,93	21
NEO-	Neópolis/SE	390,2	1,9	9,29	23,81

* Representam dois grupos de amostras de uma réplica biológica das amostras BTU- da população de Botucatu-SP.

Uma vez que se deve saber com precisão a concentração dos *pools* de amostras, estas foram quantificadas através do espectrofotômetro Qubit (Life Technologies) (Tabela 6). Nesta metodologia, mais precisa que a realizada com Nanodrop, a concentração da amostra é proporcional à emissão de fluorescência por sondas que emitem luz apenas quando se ligam ao alvo desejado, em nosso caso RNA, diminuindo assim os efeitos de possíveis contaminantes da amostra, como DNA, por exemplo.

Tabela 6. Quantificação do RNA total (ng/μL) dos *pools* de amostras realizada por Qubit.

ID da amostra	População	ng/μL
BTU+	Botucatu-SP	100
*BTU- (rep1)	Botucatu-SP	120
*BTU- (rep2)	Botucatu-SP	98
NEO+	Neópolis-SE	88
NEO-	Neópolis-SE	140

* Representam dois grupos de amostras de uma réplica biológica das amostras BTU- da população de Botucatu-SP.

A integridade do RNA dos *pools* de amostras foi verificada pela plataforma Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), que utiliza ensaios de fluorescência em conjunto com separação por eletroforese para avaliar qualitativamente as amostras. Foram analisados os eletroferogramas

(gráfico de intensidade de fluorescência vs. tempo), e uma imagem do gel gerada pelo *software* de análise do equipamento, juntamente com o índice de *RIN* (*RNA Integrity Numbers*) (Schroeder *et al.*, 2006) (Fig. 11, Tabela 7).

Tabela 7. Identificação das amostras e quantificação de RNA total (ng/μL) e determinação do *RNA Integrity Number* (RIN) dos *pools* de amostras através da plataforma Bioanalyzer (Agilent Technologies).

ID da amostra	População	Quantificação (ng/μL)
BTU+	Botucatu/SP	474
*BTU+ (rep.t1)	Botucatu/SP	474
**BTU- (rep.b1)	Botucatu/SP	547
**BTU- (rep.b2)	Botucatu/SP	591
NEO+	Neópolis/SE	382
NEO-	Neópolis/SE	371

* Representa uma réplica técnica da amostra BTU+; ** Representam réplicas biológicas da amostra BTU-, ambas da população de Botucatu-SP.

Nos eletroferogramas (Fig. 11) verificou-se que as bandas relativas ao 28S rRNA apresentaram-se deslocadas à esquerda na escala temporal, o que pode ser atribuído à extração do RNA utilizando-se TRIzol (Krebs *et al.*, 2009). Esse deslocamento fez com que outro parâmetro de determinação de qualidade, a razão 28S/18S rRNA (Schroeder *et al.*, 2006), não pudesse ser calculada.

O parâmetro de integridade do RNA (*RIN*) também se mostrou abaixo do limiar considerado ideal (ideal, *RIN*>8), sugerindo degradação do RNA. Entretanto, como a determinação deste parâmetro também pode ser afetado pelo deslocamento do pico relativo ao gene 28S, e como outros estudos relatavam que para fragmentos de até 400 pb pode-se utilizar amostras com *RIN*>5 (Fleige & Pfaffl, 2006), decidiu-se por utilizar as amostras na preparação das bibliotecas do RNA-seq. Para tal, as amostras tiveram suas concentrações ajustadas e foi utilizado o kit *TrueSeq Stranded Total RNA Sample Preparation* de acordo com as indicações do fabricante (Illumina).

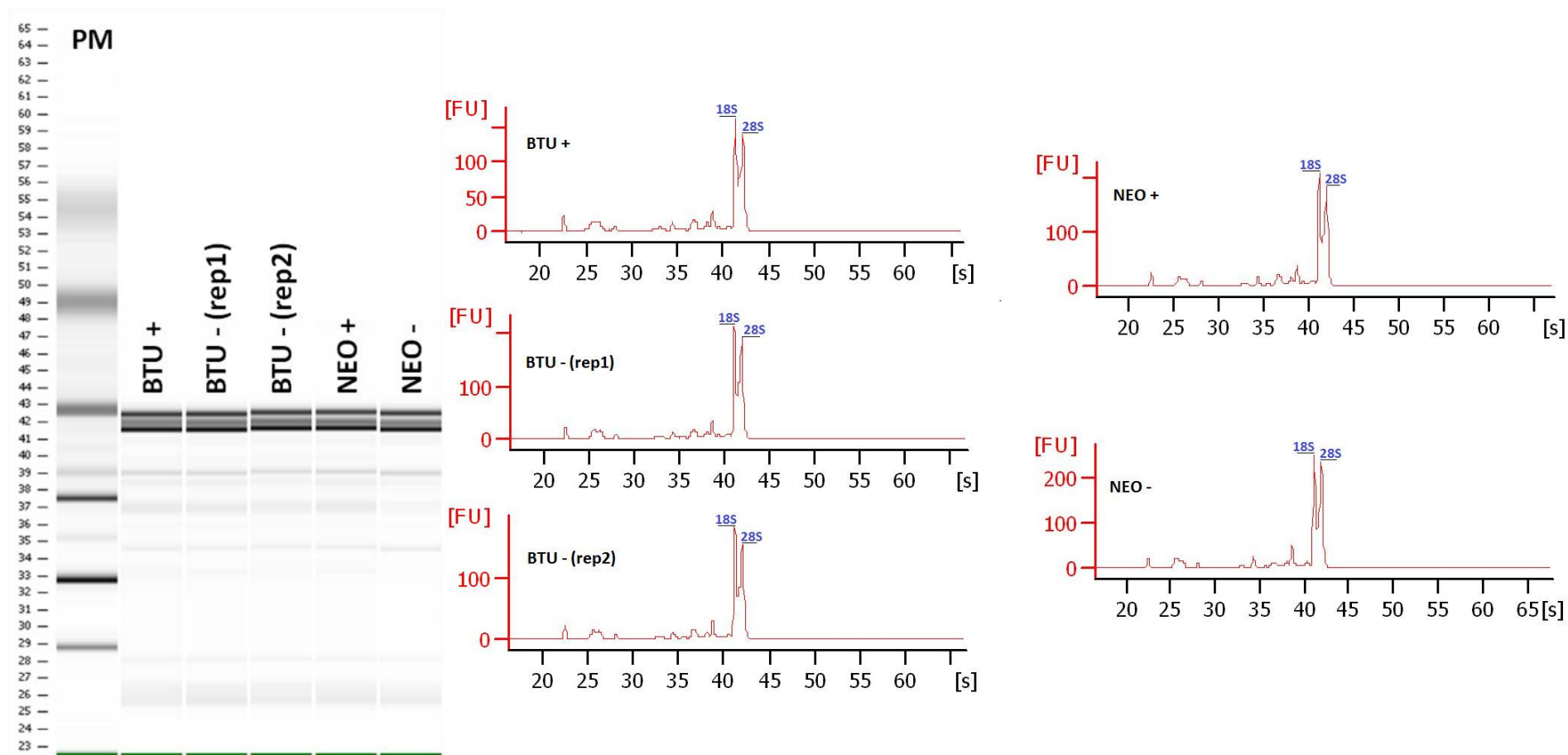


Figura 11. Eletroferograma das amostras (*pools*) de RNA utilizadas no preparo das bibliotecas para RNA-seq em sequenciamento Illumina. Os resultados foram obtidos no aparelho Bioanalyzer.

5.2.3 Avaliação das respostas transcricional global

5.2.3.1 Reads obtidos e preparação para o mapeamento

No total foram confeccionadas 6 bibliotecas de RNA-seq, as quais foram sequenciadas e os arquivos de saída do sequenciador foram analisados no *software CLC Genomics Workbench* (Qiagen).

Na plataforma CLC foi realizada a pré-análise dos dados, através da eliminação dos adaptadores dos kits do sistema Illumina, eliminação das bases da cauda Poli-A e exclusão de fragmentos de baixa qualidade. No *software* também foi realizado o alinhamento dos *reads* remanescentes utilizando-se como referência o genoma da cepa Liverpool do mosquito *Ae. aegypti* (*Aedes aegypti* Liverpool Transcripts, versão AaegL3.3), obtida no banco de dados VectorBase (www.vectorbase.org). Somente os *reads* que alinharam com o transcriptoma de referência foram utilizados nas análises de expressão gênica (Tabela 8).

Tabela 8. Total de reads obtidos no NGS, pareamento, número absoluto e percentual dos reads mapeados e reads não mapeados utilizando-se como referência o transcriptoma da cepa Liverpool do mosquito *Aedes aegypti* (*Aedes aegypti* Liverpool Transcripts, AaegL3.3) (No. de reads, Pareado, reads mapeados e reads não mapeados, respectivamente) obtidos utilizando-se a plataforma CLC Genomics Workbench (Qiagen).

Amostra	No. de reads	Pareado	Reads mapeados	Reads não mapeados
BTU+	47.326.404	Sim	34.182.526 (72,23%)	9.849.429 (20,81%)
*BTU+ (rep.t1)	25.001.082	Sim	19.395.470 (77,58%)	3.986.107 (15,94%)
**BTU– (rep.b1)	41.937.850	Sim	32.301.264 (77,02%)	7.079.518 (16,88%)
**BTU– (rep.b2)	54.195.614	Sim	41.836.072 (77,19%)	9.149.037 (16,88%)
NEO+	32.365.100	Sim	23.923.482 (73,92%)	5.397.481 (16,68%)
NEO–	67.088.316	Sim	52.242.758 (77,87%)	10.636.566 (15,85%)

*Representa uma réplica técnica da amostra BTU+; **Representam réplicas biológicas da amostra BTU–, ambas da população de Botucatu-SP.

O nível de expressão de cada unidade de RNA é determinado pelo número de *reads* de sequência mapeados aos transcritos de referência, sendo assim esperada a correlação direta com seu nível de abundância. Na técnica de RNA-seq, os níveis de expressão de um transcrito são limitados pela profundidade do sequenciamento e dependentes dos níveis de expressão de outros transcritos (Rapaport *et al.*, 2013). Por isso, após o mapeamento das *reads* é de fundamental importância a normalização dos dados, para se obter os níveis corretos de expressão gênica diferencial entre as amostras. Em nosso estudo, os dados foram normalizados pelo RPKM (*reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) (Mortazavi *et al.*, 2008).

Como medidas de controle experimentais, foram sequenciadas ambas as réplicas biológicas (amostra BTU-) e técnicas (amostra BTU+). A réplica técnica mostrou níveis de abundância de transcritos reproduzíveis (Fig. 12) (Mortazavi *et al.*, 2008), uma vez que a inclinação da reta foi de $1,0598 \pm 0,0002$ e seu ajuste aos dados (R^2) de 0,99, indicando que todos os processos anteriores e no decorrer do sequenciamento ocorreram de forma correta.

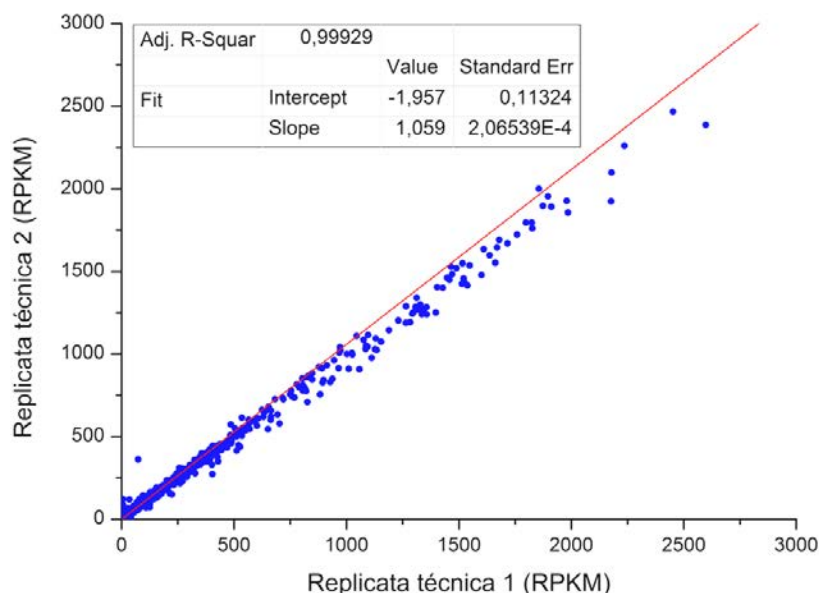


Figura 12. Teste de reprodutibilidade das réplicas técnicas sequenciadas. Comparação de duas réplicas técnicas de RNA-seq medidas em *reads* por quilobase de exon por milhões de sequências de *reads* mapeadas (RPKM). Pontos azul: representam os valores dos RPKMs; reta vermelha: ajuste linear dos dados com os respectivos valores descritos na figura.

A comparação das réplicas biológicas serve também como controle do processo de sequenciamento, mas principalmente para verificar a variação dos níveis de expressão gênica intrapopulacional. A análise das amostras da réplica biológica da população de Botucatu ingurgitadas e não infectadas (BTU-) gerou o repertório de transcritos diferencialmente expressos descritos na Tabela S1 em anexo. Uma vez que poucos genes foram diferencialmente expressos entre estas amostras e que o padrão de expressão diferencial de ambas estão fortemente correlacionados (coeficiente de correlação de Pearson de 0,901), fez-se a análise de clusterização hierárquica (Fig. 13) utilizando-se o *software* Gene Cluster 3.0. Foi utilizado o método de clusterização de acoplamento completo (*complete linkage*) e métricas de similaridade (*similarity metric*) de correlação. Como variável, foram utilizados os genes diferencialmente expressos pelo menos uma vez em uma das populações ou os genes diferencialmente expressos em pelo menos duas ocorrências. Nota-se que, em ambos os casos, as amostras das réplicas biológicas (BTU-(rep.b1) e BTU-(rep.b2)) estão sempre agrupadas nos mesmos ramos, confirmando mais uma vez que as amostras apresentam grande similaridade (acima de, no mínimo, 90%). O mesmo padrão de clusterização foi visto quando foi realizada a consolidação (*merge*) das duas amostras, resultando na amostra denominada BTU-(rep.b1+rep.b2).

Com base nesses resultados, e visando aumentar a robustez das análises, em todas as análises posteriores foi utilizada a amostra resultante da união das réplicas biológicas.

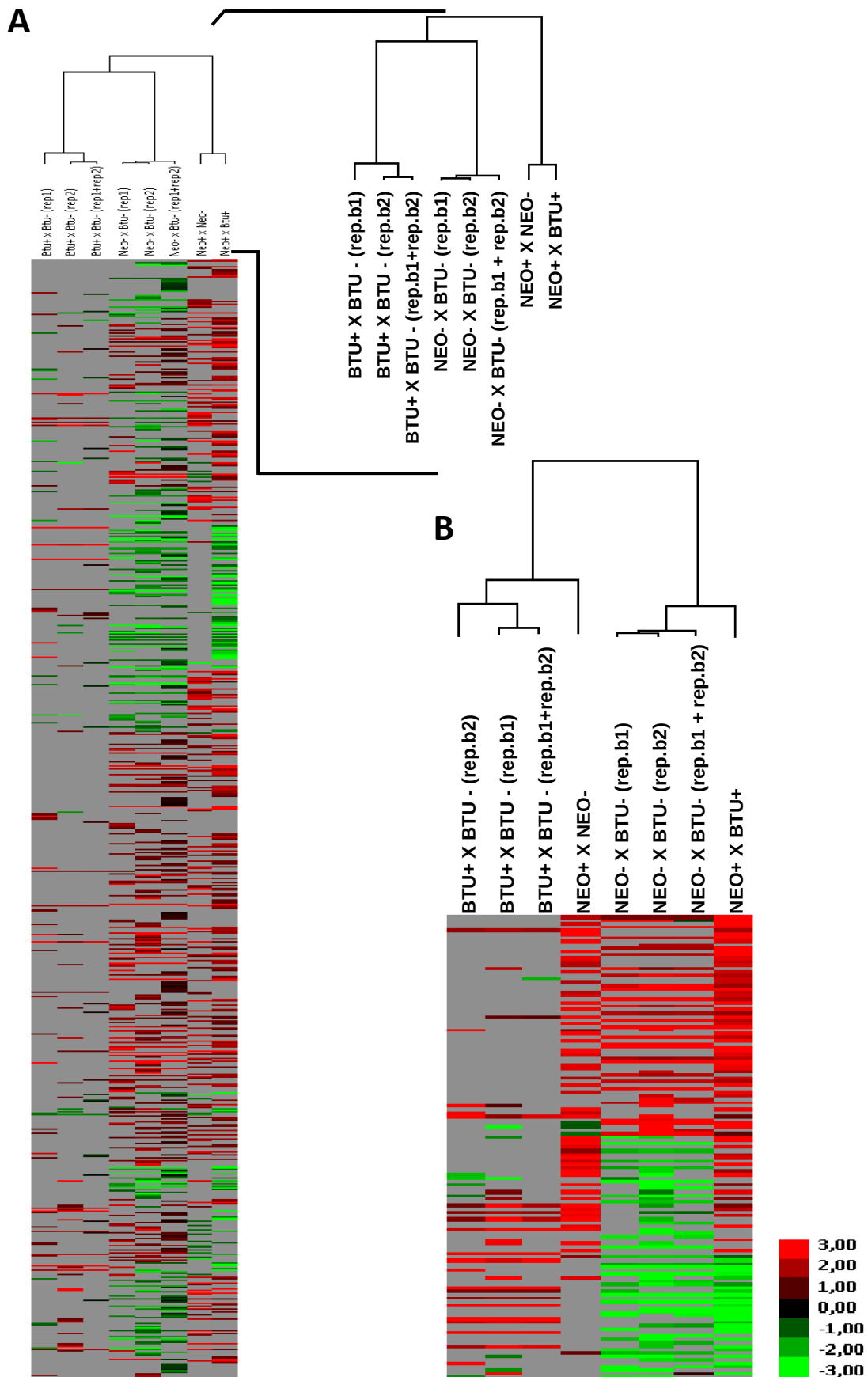


Figura 13. Clusterização hierárquica, com método de acoplamento completo (*complete linkage*) e métrica de correlação (*similarity metric*) dos genes diferencialmente expressos das populações de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas e infectadas e não infectadas (BTU+, BTU-, NEO+, NEO-,

respectivamente). (A) Clusterização foi realizada utilizando-se pelo menos uma observação de gene diferencialmente expresso nas comparações realizadas ou (B) no mínimo duas ocorrência simultâneas. As amostras BTU-(rep.b1) e BTU-(rep.b2) são réplicas biológicas e a amostra BTU-(rep.b1+rep.b2) é a união (*merge*) de ambas réplicas biológicas.

Após a união das réplicas biológicas foram verificados os genes diferencialmente expressos entre as populações do estudo (NEO- vs BTU- e NEO+ vs BTU+) e entre os subgrupos de cada população (BTU+ vs BTU- e NEO+ vs NEO-) (Tabela S2-S5 Anexo).

Nossa análise mostrou que a grande maioria dos genes está sendo induzida ou reprimida entre valores de $5 > \log_2 (fold\ change) > -5$, com poucos genes fora desse intervalo de expressão. A comparação das amostras ingurgitadas e infectadas com DENV-4 da população de Botucatu em relação à amostra não infectada da mesma população revelou apenas 22 genes induzidos e 2 reprimidos. Com base nesses números podemos afirmar que a população de Botucatu sofre pouca modulação com a infecção por DENV-4. Já a comparação entre as amostras da população de Neópolis revelou que os mosquitos desta localidade são fortemente modulados, apresentando 189 genes diferencialmente expressos, sendo destes 23 reprimidos e 166 induzidos. Estes dados sugerem que a intensidade da resposta e repertório de genes modulados pelo DENV varia grandemente de acordo à população e possivelmente ao seu grau de suscetibilidade ao vírus.

Tomando-se como base o banco de dados das anotações funcionais dos genes diferencialmente expressos, foi confeccionado o gráfico abaixo (Fig. 14A), que relaciona os genes diferencialmente expressos entre as amostras estudadas e suas respectivas funções.

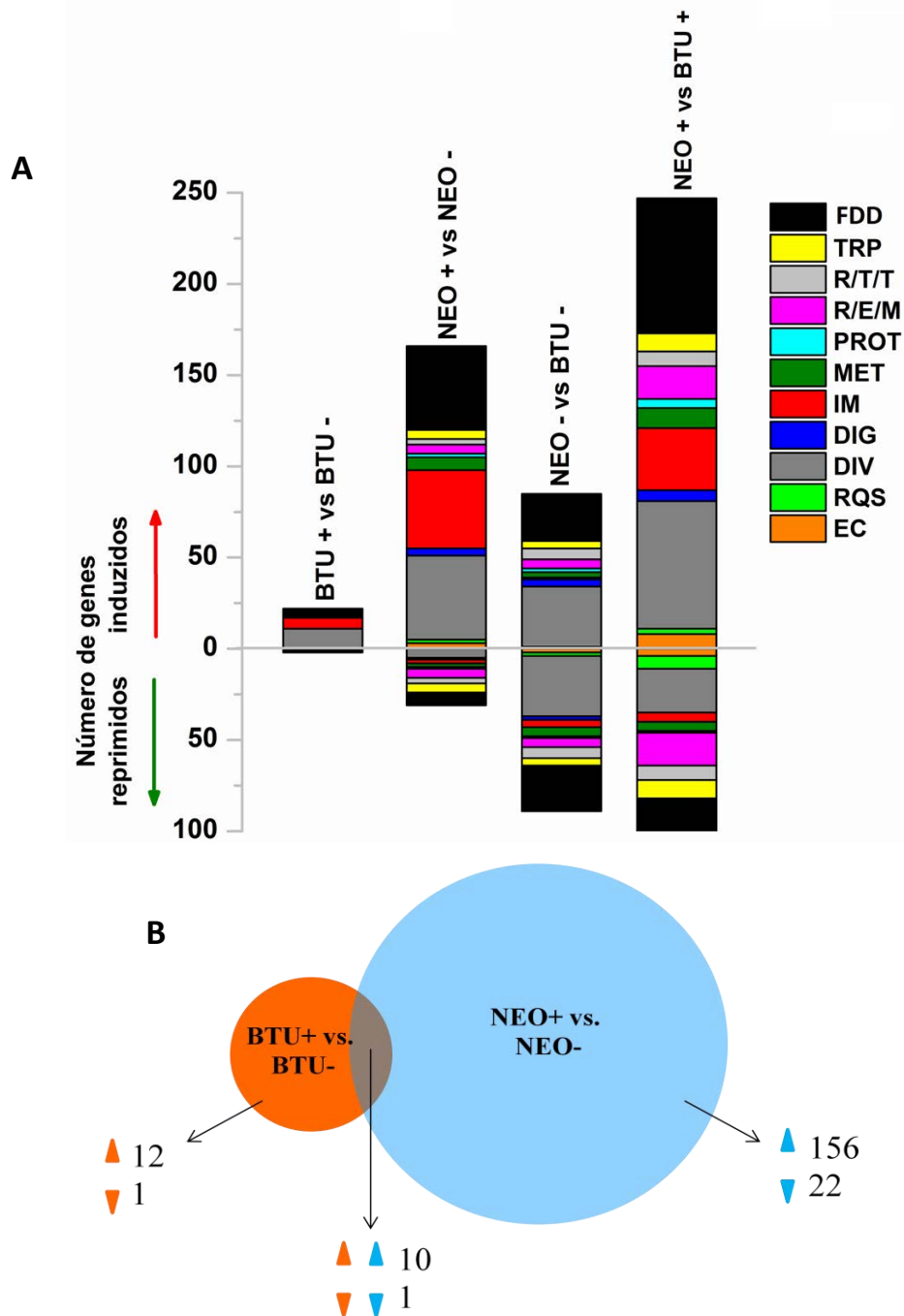


Figura 14. Repostas transcricionais das populações do *Aedes aegypti* ao DENV-4. A) Classificação funcional dos transcritomas modulados pelo DENV-4 nas populações de Botucatu (BTU) e Neópolis (NEO). Os gráficos representam a distribuição funcional dos genes diferencialmente expressos nos grupos BTU+ vs BTU-, NEO+ vs NEO-, NEO- vs BTU- e NEO+ vs BTU+. Os bancos de dados completos constam nas Tabelas suplementares S2-S5 em anexo. Abreviação dos grupos funcionais FDD, função desconhecida; TRP, transporte; R/T/T, replicação, transcrição, e tradução; R/E/M, redox, estresse e mitocôndria; PROT, proteólise; MET, metabolismo; IM, imunidade; DIG, digestão; DIV, funções diversas; RQS, recepção quimiosensorial; E/C, estrutural e citoesqueleto. B) Diagrama de Venn representando regulações gênicas únicas e compartilhadas pelas populações de BTU e NEO em resposta ao DENV-4. As regiões de sobreposição representam genes concomitantemente regulados pelas duas populações (Tabela S6 anexo). O sentido da regulação é representado pelas setas apontando para cima (indução) ou para baixo (repressão).

Grande parte dos genes modulados entre as comparações avaliadas, possuem função desconhecida (25 - 28,6%), função imune (3,4 - 25,5%) e funções múltiplas ou diferente (27 - 46%) das já relacionadas relacionadas. Verificamos ainda que além da modesta resposta transcricional na população de Botucatu, chama a atenção o fato que apenas 6 genes do sistema imune, duas *cecropinas* (AAEL015515, AAEL000621), três *defensinas* (AAEL003832, AAEL003841, AAEL003857) e uma proteína hipotética conservada (AAEL010848) sejam induzidos nos mosquitos BTU+ em relação aos BTU-. É importante ressaltar que membros destas famílias gênicas já foram previamente relacionados à resposta anti-dengue em *Aedes aegypti* (Xi *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2012).

Em contra partida nos mosquitos da população de Neópolis, a infecção com o DENV-4 leva a uma notável ativação imunológica, sendo que 43 dos genes induzidos (25,9% do total de genes induzidos nesta população) possuem função imune (Fig. 14A e Tabela S3 anexo). O repertório de genes imunes diferencialmente expressos nos mosquitos NEO+ em relação aos NEO- é composto de genes codificadores de diversos peptídeos antimicrobianos, uma *atacina* (AAEL003389), cinco *cecropinas* (AAEL000627, AAEL015515, AAEL000611, AAEL000621 e AAEL017211) e duas *defensinas* (AAEL003857 AAEL003841). Além desta última *defensina* mencionada (AAEL003841), outros três genes induzidos nos mosquitos NEO+ também foram previamente associados ao controle da suscetibilidade de populações naturais de *Ae. aegypti* ao DENV: a *protease serínica* AAEL002610, e duas *transferrinas* (AAEL015639 e AAEL015458) (Sim *et al.*, 2013). Chama a atenção ainda a enorme quantidade de genes modulados pelo DENV-4 com função biológica ainda desconhecida (FDD, 46 induzidos e 5 reprimidos). Isto confirma achados anteriores e ressalta que a realização de ensaios funcionais com genes desta categoria são fundamentais para um melhor entendimento das interações entre o vírus e o vetor, podendo levar à identificação de novas proteínas antivirais como em Souza-Neto *et al.* (2009). Uma análise comparativa do repertório de genes diferencialmente expressos pelos mosquitos de BTU e NEO revela que apenas 11 genes são coregulados por NEO e BTU em resposta ao vírus, sendo que, destes, seis são genes do sistema imune, incluindo *cecropinas* e *defensinas* já citadas acima (Tabela S6 anexo).

Dos 23 genes reprimidos nos indivíduos da população de Neópolis em resposta à infecção viral, apenas três são do sistema imune. Nesta população, o gene com maior nível de repressão nos mosquitos NEO+ comparados aos NEO- codifica uma helicase DExD/H-box (AAEL010787). Este gene pertence à mesma família do gene Dicer-2 (AAEL006794), que exerce um papel fundamental no controle de infecções virais em mosquitos através da via de RNAi (Sánchez-Vargas *et al.*, 2009). Além disso, o domínio amino-terminal helicase DExD/H-box da Dicer-2 é responsável pela ativação RNAi independente do efector antiviral Vago em *Drosophila* e *Culex* (Deddouche *et al.*, 2008; Paradkar *et al.*, 2012). Ademais, a presença de polimorfismos nestes genes foi recentemente relacionada à resistência a isolados específicos do vírus em *Ae. aegypti* (Lambrechts *et al.*, 2013).

Dado o papel comprovado destes genes na resposta antiviral, é possível que a repressão desta helicase DExD/H-box nos indivíduos DENV+ da população mais suscetível ao vírus esteja diretamente relacionada ao sucesso de estabelecimento da infecção viral. Juntos, estes achados sugerem que quanto mais resistente a população ao DENV, menor parece ser sua resposta transcricional à infecção. Além disso, os mosquitos infectados da população mais suscetível (NEO+) apresentam resposta imune mais exacerbada que aqueles da população mais resistente (BTU+). Todavia, esta resposta parece não estar relacionada ao mecanismo de defesa antiviral, pois é insuficiente para lhes prover proteção contra o vírus. A indução de apenas um discreto número de genes do sistema imune nos indivíduos BTU+ em comparação aos BTU-, frente aqueles induzidos em NEO+ com relação a NEO- (6 e 43 genes, respectivamente) leva à hipótese de que o nível de expressão basal de genes do sistema imune seja mais alto nos indivíduos BTU- do que nos NEO-. Isto poderia, ao menos em parte, explicar a diferença entre os transcriptomas destas duas populações. Para elucidar tal hipótese, foram analisadas as abundâncias relativas de transcritos dos indivíduos DENV+ ou DENV- da população de NEO em referência à população de BTU, respectivamente: 1) NEO- vs BTU- e 2) NEO+ vs BTU+ (Fig. 14A e Tabelas suplementares S4 e S5). Estas análises sugerem que, ao contrário da hipótese levantada acima, não há uma diferença na abundância basal de transcritos imunes entre os mosquitos NEO- e BTU-, visto que apenas 6 dos 177 genes diferencialmente

expressos nestes dois grupos DENV possuem função imune. Infelizmente nossos dados não permitem ainda inferir em que patamar, alto ou baixo, ocorre esta equalização da abundância de transcritos dos indivíduos NEO- e BTU-, que foram expostos mas não se infectaram com o DENV-4. Esta pergunta poderia ser respondida a partir da inclusão de grupos de mosquitos com caracterização da suscetibilidade definida (através colônias puras de mosquitos sabidamente suscetíveis e resistentes) não exposto ao vírus (alimentados apenas com sangue). Esta comparação será importante para que se possa entender porque tão poucos genes são modulados nos indivíduos BTU+, por exemplo.

Estudos prévios envolvendo microarranjos de DNA revelaram que a infecção do mosquito com o DENV resulta em uma ativação massiva de genes do sistema imune do inseto, incluindo fatores associados às vias Toll e JAK-STAT (Xi *et al.*, 2008). Com o intuito de identificar uma eventual ativação de vias do sistema imune em resposta à infecção com o DENV-4 nas populações de Neópolis e Botucatu, os transcritomas responsivos à infecção do DENV destes mosquitos foram comparados com o repertório de genes modulados pelas vias Toll, Imd (Xi *et al.*, 2008; Zou & Souza-Neto *et al.*, 2011) e JAK-STAT (Souza-Neto *et al.*, 2009). A comparação destes dados com nosso estudo sugere correlação entre os genes modulados pelo DENV-4 na população de Neópolis e os regulados pelas vias NF- κ B, em especial a via Toll (CAC Toll), o que indica ativação da via Toll nos mosquitos NEO+ (Tabela S7 anexo).

A análise comparativa dos genes diferencialmente expressos nestas duas situações expôs 29 genes que são modulados pelo DENV-4 na população de Neópolis infectada, provavelmente sob controle da via Toll. Destes, 23 genes são induzidos durante a infecção viral, sendo que mais da metade (19 genes) exerce função imune. A via Toll é um dos principais mecanismos de defesa do mosquito contra o DENV (Xi *et al.*, 2008) e sua ativação ectópica através do silenciamento do inibidor Cactus resulta em uma menor carga viral do DENV-2 na população de laboratório Rockefeller do *Ae. aegypti*. Desta forma, por mais óbvio que pareça a ativação da via Toll nos mosquitos NEO+, é intrigante o fato de que esta via aparentemente não seja ativada também nos mosquitos BTU+, que

pertencem a uma população mais resistente ao DENV. No entanto Sim e colaboradores (2013) revelam que o comprometimento das vias Toll, IMD e JAK-STAT mediados por RNAi em uma cepa refratária ao DENV (Bangkok - BKK), apenas resultou num aumento não significativo de DENV, sugerindo que a ação dos fatores de restrição de BKK espécie-específico ao DENV agem de forma independente destas vias. Deste modo deve-se investigar se este padrão de expressão gênica e ativação imunológica ocorre em outras populações de mosquitos com níveis distintos de suscetibilidade ao DENV. Contudo, é surpreendente que a mais expressiva indução de fatores imunes ocorra nos indivíduos DENV+ da população mais suscetível ao vírus, e não o inverso.

Estes dados reforçam a hipótese de que os genes transcricionalmente modulados nos indivíduos DENV4+ não necessariamente atuam no processo de proteção dos mosquitos à infecção pelo vírus. A indução principalmente de genes imune parece estar relacionada com a resposta do mosquito à infecção viral porém esta não é suficiente para protegê-lo da mesma, uma vez que está mais fortemente induzida nos indivíduos DENV+. No entanto parece estar relacionada a proteção destes insetos para que a infecção não leve os mesmos a morte. Este fato deve ser considerado, visto a ocorrência de grande mortalidade dos insetos da população de Botucatu durante o processo de infecção, logo após a alimentação com DENV, sugerindo que a menor resposta imune possa levar o inseto à morte logo no início do processo de infecção. Possivelmente, os principais fatores que garantem a resistência de uma determinada população ao DENV estão sendo modulados nos mosquitos expostos mas que não se infectaram com o vírus (ex.: NEO- e BTU-).

Neste sentido verificamos que a maior indução na amostra BTU- ocorre para o gene TEP2 (AAEL014755) quando comparada à NEO-, este mesmo gene também está induzido na amostra BTU+ porém com indução inferior à BTU-(Tabela S4 e S5 anexo). Proteínas da superfamília TEP (*Thioester containing protein*) são principais constituintes do sistema imunológico dos vertebrados e invertebrados e são geralmente divididas em três subfamílias distintas: complemento C3 / C4 / C5, A2Ms e iTEPs. Estudos anteriores sugerem que vários genes iTEPs encontrados em *Drosophila* e *Anopheles* desempenham um papel na eliminação microbiana (Moita *et al.*, 2005; Stroschein-

Stevenson *et al.*, 2006). Em *Ae. aegypti* foi demonstrado que o silenciamento de um homólogo de TEP (AAEL012267 conhecida como *AeTEP1*) aumenta significativamente as infecções flavivirais (Cheng *et al.*, 2011), indicando um potencial papel das iTEPs no combate das infecções virais em insetos. Isto já foi comprovado por Xiao e colaboradores (2014) quando realizaram o silenciamento de *AeTEP1*, redesignada neste mesmo estudo como *AeMCR* (subfamília de iTEPs) de *Ae. aegypti*, obtendo assim um aumento significativo dos níveis de transcritos de DENV1-4 e do vírus da febre amarela, confirmando sua função antiviral em mosquitos. Blandin e colaboradores (2004) demonstraram que TEP1 em *Anopheles* elimina oocinetos de *P. berghei* por ligação às suas proteínas de superfície. Sim e colaboradores (2013) também identificaram TEP2 induzida na população de *Ae. aegypti* refratária ao DENV.

Cabe ressaltar também que além do gene imune TEP2, genes ligados ao processo digestório, em especial os ligados à expressão de tripsina (AAEL008097, AAEL013623, AAEL007818, AAEL008093, AAEL006425, AAEL013703, AAEL013628), foram modulados em resposta ao DENV-4 nos mosquitos XXX . Estas enzimas são de suma importância pois, em dípteros hematófagos, fazem parte do processo de digestão do sangue (Soares *et al.*, 2011).

Já foi relatado que em fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue que continha inibidor de tripsina de soja houve uma drástica diminuição no número de cópias de RNA do DENV-2 (Molina-Cruz *et al.*, 2005). Também foi demonstrado que inibidores de tripsina resultaram em uma menor taxa de replicação no intestino, menor expressão de proteína de envelope do vírus dengue e diminuição da disseminação do vírus no tórax do mosquito. Há relatos que tanto tripsina quanto alterações metabólicas parecem ser necessárias para o DENV-2 atingir níveis ótimos de infecção, replicação e disseminação no intestino (Molina-Cruz *et al.*, 2005).

Em nosso estudo há indícios de que as tripsinas podem estar de fato desempenhando um papel importante na infecção dos mosquitos, uma vez que já foi relacionada aos fenótipos de infecção de intestino, glândula salivar ou disseminação de modo geral da infecção por DENV-2 em *Ae. aegypti* (Bosio *et al.*, 2000). Além disso, QTLs estudados por Black IV e colaboradores (2002) a

tripsina está fortemente correlacionada com QTLs ligados às barreiras de infecção do intestino (MIB e MEB). Também foi verificando que alelos do QTL do cromossomo II que são relacionados à tripsina parecem ter efeito aditivo na barreira de infecção do intestino. Com isso, e com os dados de expressão gênica que mostram indução dos genes ligados à tripsina nos mosquitos de Botucatu, sugerimos que estes genes estão diretamente ligados à menor susceptibilidade desta população ao DENV-4.

Nossos dados mostram que genes codificantes de tripsinas e outras proteínas de função digestória estão em sua grande maioria induzidos nas comparações entre as amostras infectadas e não infectadas (BTU+ vs. BTU-: nenhum significativo; NEO+ vs. NEO-: 2 induzidos, 1 reprimido; NEO+ vs. BTU+: 2 induzidos, 0 reprimidos). Também há uma tendência de indução mesmo na comparação entre as amostras não infectadas de ambas populações (NEO- vs BTU-: 3 induzidos, 1 reprimido). Como já demonstrado na literatura, tripsinas possuem um papel importante na replicação viral e em função de os genes codificantes destas enzimas apresentarem maior expressão na população com maior susceptibilidade, é lógico inferir que ela pode desempenhar um papel importante na infecção dos mosquitos NEO e BTU.

Apesar de haver alguns trabalhos comparando a expressão diferencial de mosquitos *Ae. aegypti* alimentados com açúcar em relação aos alimentados com sangue (Bonizzoni *et al.*, 2011;) ou de mosquitos alimentados com sangue infectado com DENV comparado aqueles alimentados somente com sangue (Bonizzoni *et al.*, 2012;), a comparação destes resultados com os nossos é um tanto quanto complexa. Tendo como base que estes estudos não fazem o controle da infecção dos mosquitos (identificação de mosquitos realmente infectados e não infectados do grupo alimentando com DENV), separando-os apenas em alimentados com DENV ou não alimentados, a heterogeneidade da expressão diferencial pode ser grande dentro do grupo, como visto por nós na comparação das amostras NEO+ vs. NEO-. Acreditamos que a análise envolvendo os subgrupos de mosquitos sabidamente infectados ou não infectados separadamente, pode ser mais precisa na

identificação de alvos do processo de interação vírus-vetor, o que pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias de bloqueio de transmissão da dengue.

5.3 Estudo da diversidade microbiana através do gene ribossomal 16S (16S rRNA)

O rápido avanço da metagenômica tem causado um aumento no interesse sobre os estudos das interações entre hospedeiro e microbiota intestinal simbiótica (Warnecke *et al.*, 2007; Tartar *et al.*, 2009; Suen *et al.*, 2010). A recente implementação de tecnologias de sequenciamento de DNA de nova geração tem proporcionado oportunidades para explorar a diversidade microbiana de ambientes complexos (Metzker, 2010), bem como para investigar fatores genéticos relacionados à susceptibilidade a doenças e à relação hospedeiro-bactérias-patógeno (DuPont & DuPont, 2011; Ridaura *et al.*, 2013; Boissière *et al.*, 2012)

Ao longo dos últimos anos vários estudos têm investigado a microbiota intestinal de culicídeos, principalmente relacionados a mosquitos do gênero *Anopheles* e *Aedes*. É cada vez mais claro que o microbioma intestinal influencia uma grande variedade de características do hospedeiro, como metabolismo, fecundidade, imunidade e *fitness* (Dillon & Dillon, 2004; Rani *et al.*, 2009; Rosengaus *et al.*, 2011). A microbiota intestinal de mosquitos pode apresentar variação na diversidade bacteriana em seus diferentes estádios de desenvolvimento, pois durante sua metamorfose, na transição de larva para adulto, a microflora associada às larvas é "eliminada" e os mosquitos adultos recém-emergidos mantêm poucas ou nenhuma bactéria remanecente do estágio anterior (Moll *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 2011). Isto explica a menor diversidade bacteriana em insetos adultos quando comparado ao estágio larval, e indica que grande parte dos micróbios desta fase são adquiridos através do sítio de emergência (transmissão horizontal) e pela dieta (Wang *et al.*, 2011; Boissière *et al.*, 2012). A compreensão da estrutura e diversidade microbiana bem como sua dinâmica no mosquito é um pré-requisito para entender a relação simbiótica entre o mosquito e o microbioma residente em seu intestino (Wang *et al.*, 2011), pois em mosquitos vetores, as

bactérias intestinais podem afetar a capacidade destes insetos em transmitir patógenos (Xi *et al.*, 2008; Joyce *et al.*, 2011; Cirimotich *et al.*, 2011; Manguin *et al.*, 2013; Bahia *et al.*, 2014).

No presente estudo foram utilizados os mosquitos provenientes dos ensaios de infecção (ingurgitados-positivos e ingurgitado-negativos, de Botucatu/SP e Neópolis/SE) para comparar os fatores genéticos (intrínsecos ao vetor) e microbianos relacionados à populações com diferentes graus de suscetibilidade ao DENV. Estas comparações são de grande valia uma vez que há relatos afirmando que a microbiota é capaz de modular a infectividade do mosquito *Ae. aegypti* pelo DENV (Xi *et al.*, 2008; Ramirez *et al.*, 2012).

5.3.1 Amplificação e sequenciamento de 16S rRNA

Para o levantamento da diversidade microbiana, a região variável (V4) do gene 16S rRNA (posições 515-806) foi amplificada por PCR em triplicatas à partir das 5 bibliotecas de *amplicons* 16S rRNA (Fig. 15). Estas foram preparadas utilizando cDNA das mesmas amostras enviadas para o ensaio de RNA-seq (BTU+, BTU- (rep.b1), BTU- (rep.b2), NEO+ e NEO-) e posteriormente sequenciadas através da plataforma Illumina Miseq.

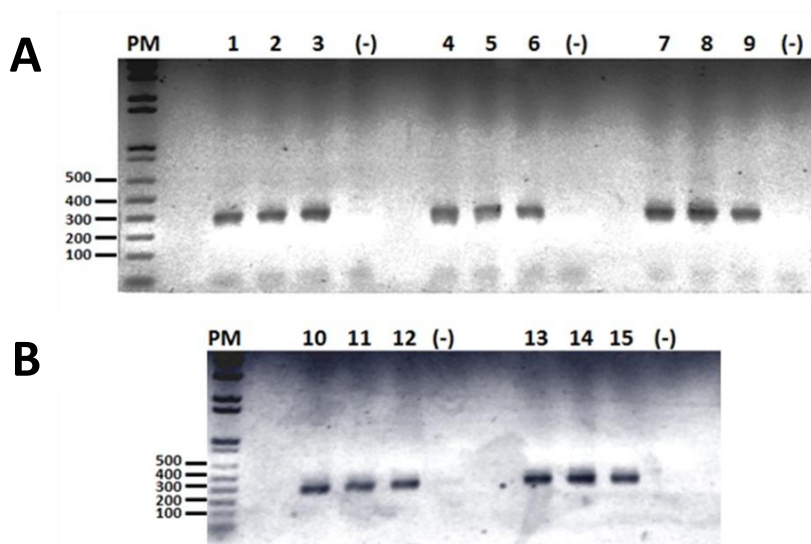


Figura 15. Geração de bibliotecas de *amplicons* 16S rRNA. Reações de PCR realizadas em triplicata técnica utilizando cDNA dos mosquitos oralmente expostos ao DENV-4 das populações de Botucatu = BTU (A) e Neópolis = NEO (B). (A) BTU- rep.b1 (raias 1-3); BTU- rep.b2 (raias 4-6); BTU+ (raias 7-9). (B) NEO+ (raias 10-12); NEO- (raias 13-15); (-) controle negativo; (PM) marcador de peso molecular.

5.3.2 Análise das sequências do gene bacteriano 16S rRNA

A análise das sequências através do *software* Mothur gerou 349.805 *reads* pareadas a partir das 5 bibliotecas deste estudo, com tamanho de fragmentos de aproximadamente 250 pb. Após o processamento, com a remoção de sequências menores que 250 pb e maiores que 275 pb e de potenciais quimeras, um total de 269.806 sequências de alta qualidade foram obtidas. (Tabela 9).

Tabela 9. Número de reads obtidos pelo sequenciamento do gene 16S rRNA das amostras das populações de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas e consideradas positivas e negativas para DENV-4 (BTU+, BTU-, NEO+ e NEO-, respectivamente). As amostras BTU- (rep.b1) e BTU- (rep.b2) são réplicas biológicas da amostra de Botucatu - SP ingurgitada e não infectada.

Amostras	No. <i>reads</i> pré processamento	No. <i>reads</i> pós-processamento
BTU+	60.580	44.965
BTU- (rep. b1)	62.025	46.348
BTU- (rep. b2)	69.279	54.868
NEO+	68.326	51.011
NEO-	89.595	72.614

Do total de 269.806 *reads*, foram identificadas 108.715 sequências únicas. Estas foram alinhadas contra o banco de dados SILVA para a determinação das unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Assim como em diversos outros trabalhos (Jünemann *et al.*, 2012; Milani *et al.*, 2013; Vezzuli *et al.*, 2013), para o alinhamento foi atribuído o valor mínimo de 97% de identidade de nucleotídeos. Alguns trabalhos consideram este índice de identidade suficiente para classificação em nível de espécie (Shahinas *et al.*, 2012), entretanto, outros estudos consideram que tal classificação só poderia ser atribuída a espécie se fossem alinhadas com identidade superior a 98% de identidade nucleotídica (Stackebrandt & Ebers, 2006; Meier-Kolthoff *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). Por isso, em nosso estudo, as análises foram realizadas em nível de gênero.

Após o alinhamento com o banco de dados SILVA, foram removidos possíveis sequências contaminantes (cloroplasto, mitocôndria, Archaea e Eucarioto), resultando num total de 269.037 sequências. Destas, as que apresentavam diferenças menores que 2 pb foram consolidadas (*merged*) resultando num total de 52.251 sequências únicas.

5.3.3 Caracterização taxonômica do gene 16S rRNA

O número total de OTUs foi calculado levando em consideração subamostras (*subsampling*) contendo 2.440 sequências (5% do número de *reads* da amostra com menor número de sequências). O número total de OTUs foi de 12.101, distribuídos nas amostras de acordo com a Tabela 10. A análise de cobertura de Good (Good, 1953), que estima a porcentagem de OTUs presentes em cada amostra (Tabela 10), sugere que a maioria da diversidade bacteriana das populações utilizadas em nosso estudo foi elucidada. Tal fato foi comprovado, pois uma vez que era aumentado o número de sequências nos subgrupos utilizados para determinação das OTUs, os novos cálculos de cobertura mostraram que esta passou a ser de no mínimo 95% (amostra BTU+).

Tabela 10. Números de OTUs calculados utilizando-se subgrupos com 2.440 sequências e respectiva cobertura percentual das amostras de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas e infectadas ou não infectadas com DENV-4 (BTU+, BTU- (rep.b1) e BTU- (rep.b2), NEO+ e NEO-, respectivamente).

Amostra	No. OTUs	Cobertura (%)
BTU+	3556	91
BTU- (rep.b1)	2648	93
BTU- (rep.b2)	2308	95
NEO+	2339	95
NEO-	2311	96

A complexidade microbiana pode ser analisada pela curva de rarefação (Fig. 16).

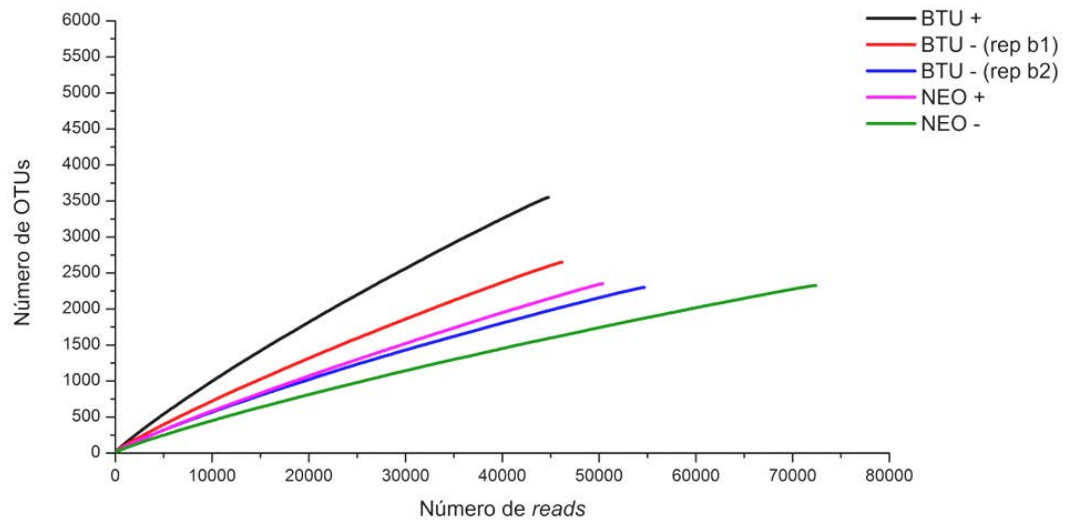


Figura 16. Curva de rarefação para as amostras da população de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas infectadas e não infectadas (BTU+, BTU- (rep.b1) e BTU- (rep.b2), NEO+, NEO-, respectivamente). Curvas de rarefação comparando o número de *reads* com o número de OTUs encontrados após o processamento das sequências.

Através das análises das curvas de rarefação, podemos inferir que a diversidade de bactérias é maior nas amostras ingurgitadas e infectadas com DENV-4 da população de Botucatu-SP (BTU+), e menos complexa nas amostras ingurgitadas e não infectadas de Botucatu-SP (BTU- (rep.b1) e (rep.b2)) e na população ingurgitada e infectada de Neópolis-SE (NEO+). O grupo não infectado de Neópolis (NEO-) apresentou a menor diversidade bacteriana. Também foi medida a diversidade bacteriana usando a diversidade das OTUs e os gêneros classificados pelas sequências, através do recíproco do coeficiente de Simpson (Magurran, 2004) e do índice de Chao (Chao, 1984) (Tabela 11). Tais dados também sugerem uma maior diversidade para as amostras do grupo BTU+, enquanto a amostra NEO- apresentou menor diversidade. Diferentemente dos valores do índice de Chao, para as amostras BTU- (rep.b1 e rep.b2) e NEO+, os valores do inverso do índice de Simpson não foram proporcionalmente condizentes com a diversidade mostrada por suas curvas de rarefação, possivelmente devido à diferença no número de *reads* obtidos pelo sequenciamento e à não uniformidade da distribuição das OTUs que representam toda a amostra (Schloss *et al.*, 2011).

Tabela 11. Coeficiente de diversidade de Chao e inverso de Simpson das amostras da população de Botucatu-SP e Neópolis-SE ingurgitadas e infectadas e não infectadas com DENV (BTU+, BTU- (rep.b1) e BTU- (rep.b2), NEO+, NEO-, respectivamente).

Amostra	Chao	Simpson ⁻¹
BTU+	3556	4.51 (4.35:4.69)
BTU- (rep.b1)	2306	3.58 (3.40:3.79)
BTU- (rep.b2)	1595	3.36 (3.24: 3.49)
NEO+	1958	1.49 (1.44:1.55)
NEO-	1454	1.37 (1.33:1.41)

Através das curvas de rarefação também foi possível inferir que se mais sequências tivessem sido obtidas, um maior número de OTUs seria obtido, apesar da alta cobertura de nossos ensaios. Entretanto, mesmo com a possível descoberta de novas OTUs, a diversidade microbiana não seria substancialmente alterada, e os resultados aqui demonstrados não sofreriam grandes variações nos principais gêneros descritos.

Para a caracterização taxonômica das amostras, as réplicas biológicas foram consolidadas (*merged*). Após o alinhamento e comparação das amostras com o banco de dados SILVA, foram identificadas bactérias pertencentes a 9 filos, 17 classes, 37 ordens, 73 famílias e 136 gêneros, sendo a maioria composta por bactérias gram negativas (> 95%), corroborando o estudo realizado por Boissière e colaboradores (2012) (Fig. S1 anexo). Entretanto, em nossos gráficos estão destacadas apenas as mais significativas (com número de *reads* maior que 2% do número total de *reads* de cada amostra), sendo as demais agrupadas como “Outras”. As amostras foram divididas nas classes taxonômicas de acordo com as Figuras 17 a 21.

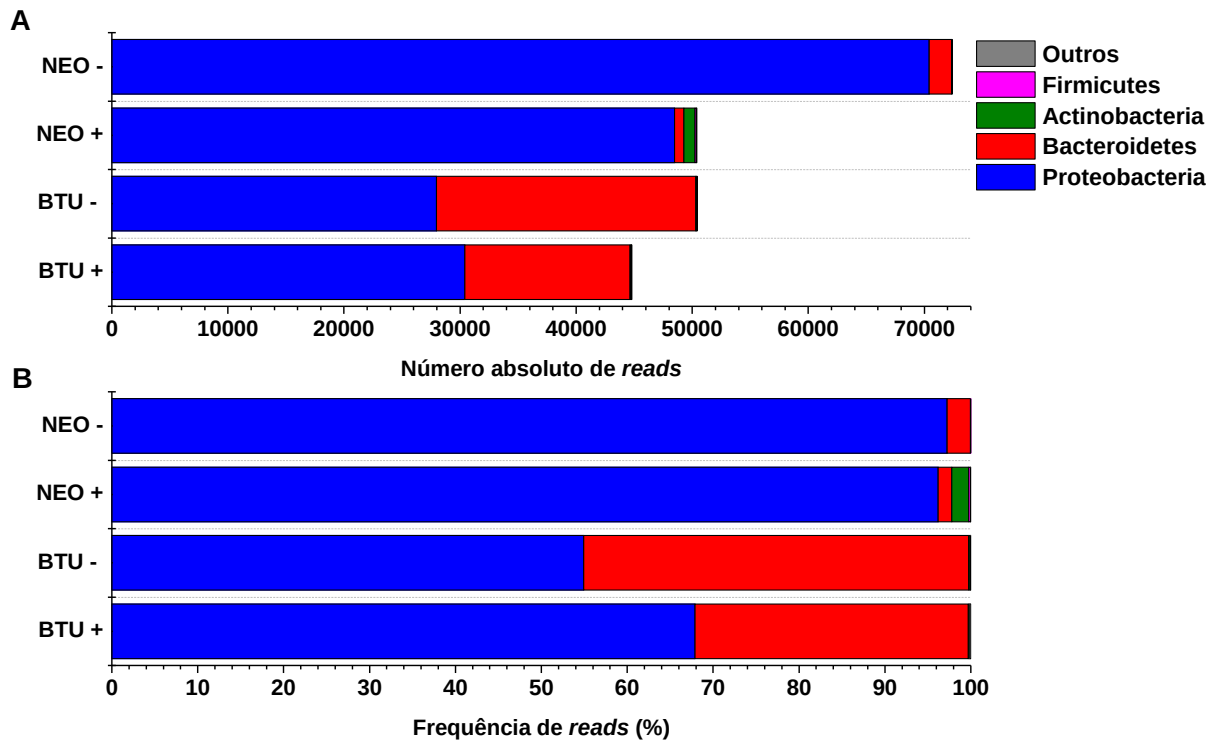


Figura 17. Composição bacteriana em nível de Filo das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de *reads*; (B) Composição bacteriana em função da frequência de *reads* (%).

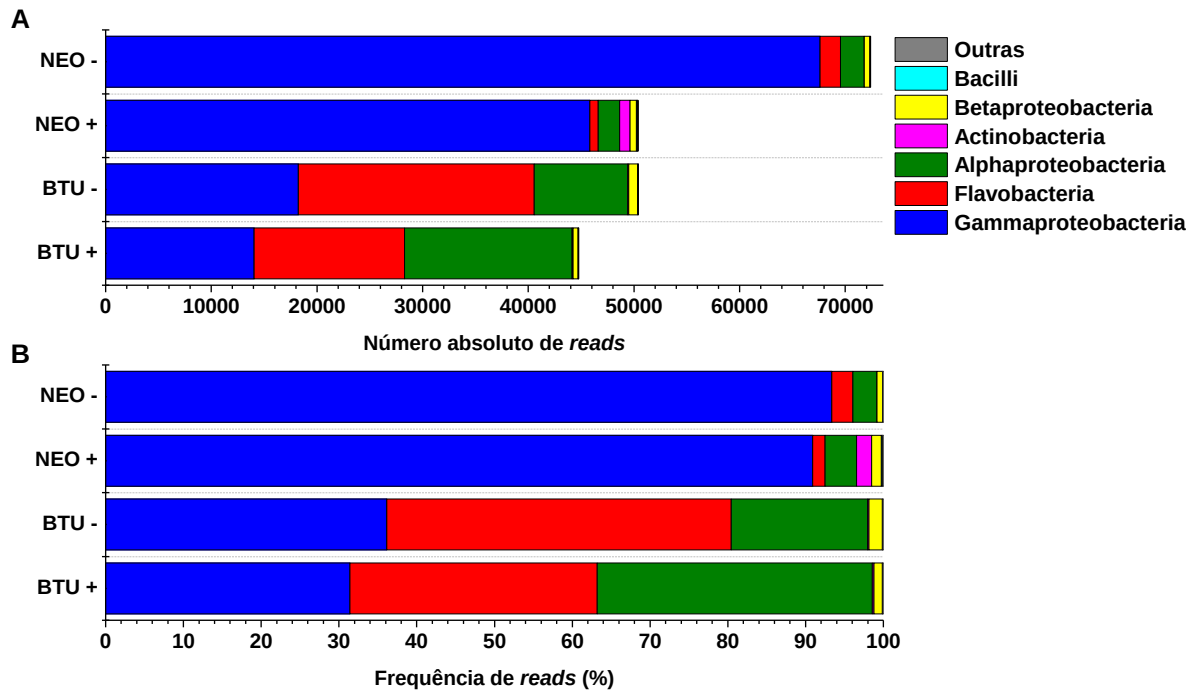


Figura 18. Composição bacteriana em nível de Classe das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de *reads*; (B) Composição bacteriana em função da frequência de *reads* (%).

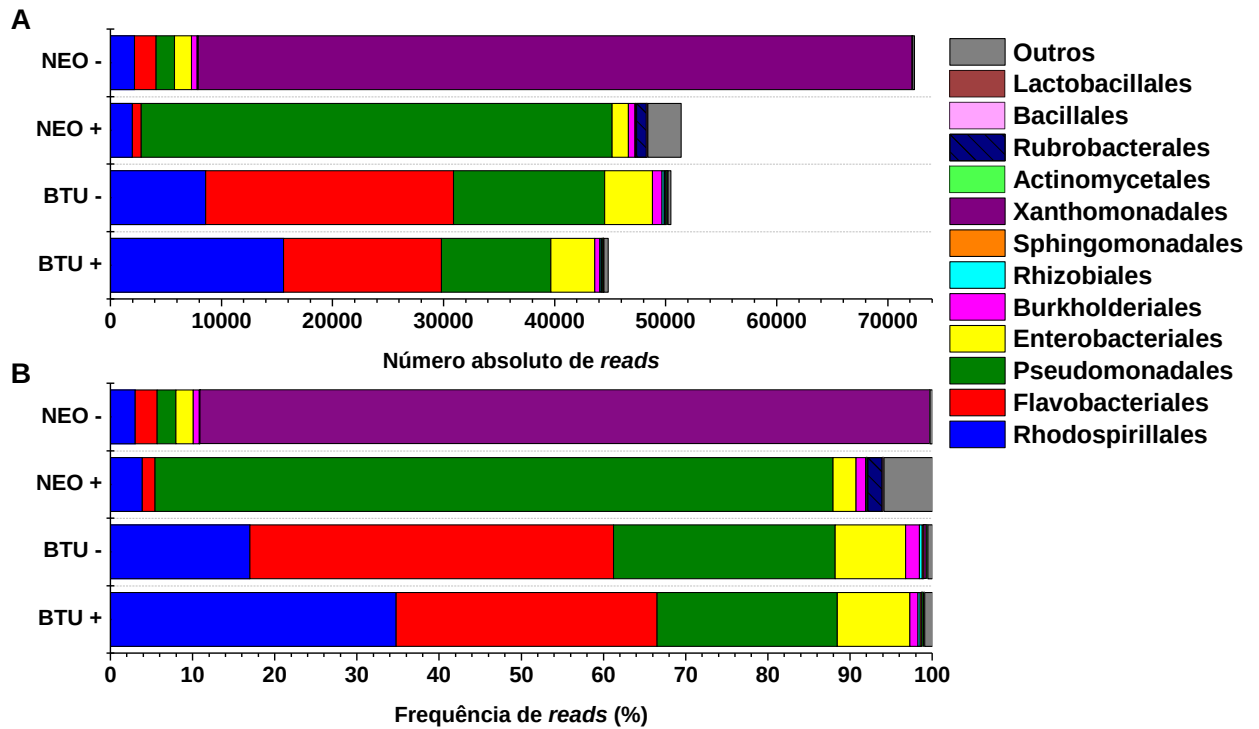


Figura 19. Composição bacteriana em nível de Ordem das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de *reads*; (B) Composição bacteriana em função da frequência de *reads* (%).

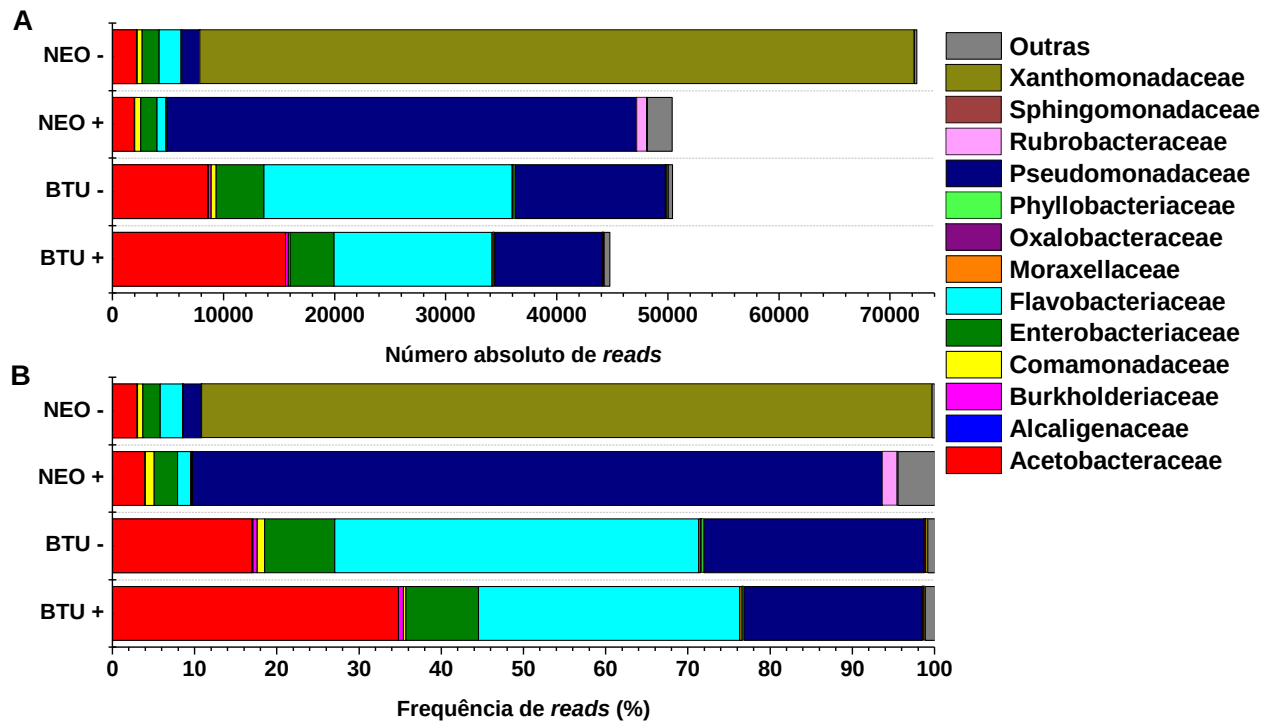


Figura 20. Composição bacteriana em nível de Família das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de *reads*; (B) Composição bacteriana em função da frequência de *reads* (%).

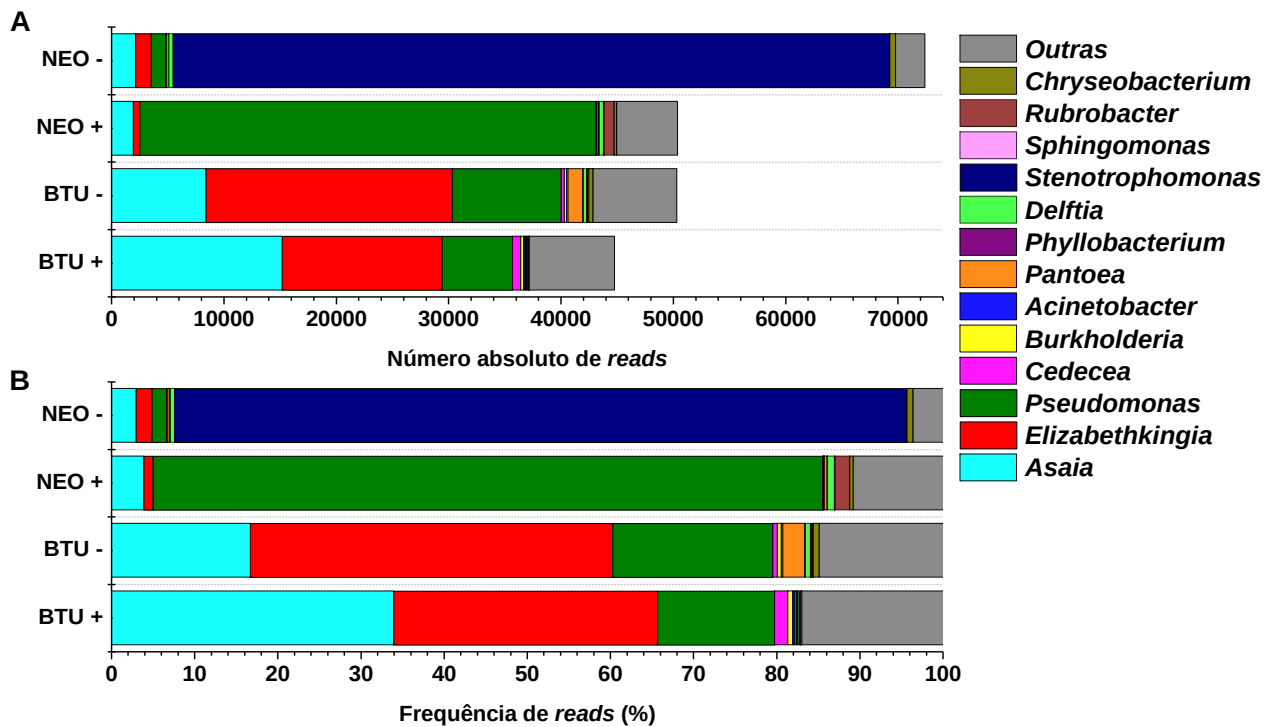


Figura 21. Composição bacteriana em nível de Gênero das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO+, NEO-, BTU+, BTU-, respectivamente). (A) Composição bacteriana em função do número absoluto de *reads*; (B) Composição bacteriana em função da frequência de *reads* (%).

A partir das figuras 17 a 21, podemos observar que houve alta prevalência dos filos Bacteroidetes e Proteobacteria (BTU+:31,8%, 67,9%; BTU-:44,8%, 54,9%; NEO+: 1,6%, 96,2%; NEO-: 2,7%, 97,2%, respectivamente). As classes predominantes foram Gammaproteobacteria (BTU+: 31,3%; BTU-: 36,1%; NEO+: 90,0%; NEO-: 93,3%), Flavobacteria (BTU+:31,8%; BTU-:44,2%; NEO+: 1,6%; NEO-: 2,7%) e principalmente nas amostras da população de Botucatu verificamos sequências de Alphaproteobacteria (BTU+: 35,4%; BTU-: 17,6%). Na avaliação em nível de Ordem bacteriana, houve maior abundância de Xanthomonadales na amostra NEO- (88,8%), enquanto na amostra NEO+ houve prevalência de Pseudomonadales (82,5%). Nas amostras BTU+ e BTU- houve prevalência de 3 ordens: Rhodospirillales, Flavobacteriales e Pseudomonadales (BTU+: 34,8%, 31,8%, 22,0%; BTU-: 17,0%, 44,2%, 27,8%, respectivamente). Nas análises por famílias, o *pool* de NEO-

apresentou maior prevalência de Xanthomonadaceae (NEO-: 88,8%) enquanto na amostra NEO+ a predominante foi Pseudomonadaceae (NEO+: 83,9%). Nas amostras de Botucatu (BTU- e BTU+) as amostras foram segregadas entre Acetobacteraceae (17,0% e 34,8%, respectivamente), Flavobacteriaceae (44,3% e 31,8%, respectivamente) e Pseudomonadaceae (26,8% e 21,7%, respectivamente). No nível de gênero, a microbiota de NEO- é predominantemente composta por *Stenotrophomonas* (88,1%) enquanto em NEO+ o gênero mais prevalente foi de *Pseudomonas* (80,6%). Praticamente os mesmos gêneros foram identificados nas amostras BTU- e BTU+ contudo em diferentes proporções: *Elizabethkingia* (BTU-: 43,6%; BTU+: 31,8%), *Asaia* (BTU-: 16,7%; BTU+: 33,9%) e *Pseudomonas* (BTU-: 19,3%; BTU+: 14,0%).

Tomando como base somente o número de unidades taxonômicas determinadas (filos, classes, ordens, famílias e gêneros), estas tiveram uma menor diversidade quando comparadas às determinadas em outros estudos envolvendo microbiomas de insetos (Wang *et al.*, 2011; Osei-Poku *et al.*, 2012). Entretanto, estes estudos utilizaram outras espécies de mosquitos e outras metodologias de sequenciamento, que gerou maior quantidade de *reads* e com fragmentos maiores (340–400 bp utilizados na análise final), permitindo com isso obter maior cobertura e diversidade microbiana.

Após a caracterização das amostras, foram realizadas análises para verificar quais as diferenças entre elas e quais os gêneros de bactérias seriam determinantes para a sua diferenciação. Em uma primeira análise um diagrama de Venn foi gerado, utilizando-se as OTUs calculadas das subamostras (*subsampling*) como variáveis (Fig. 22). Pode-se observar no diagrama de Venn que várias OTUs foram calculadas para cada amostra, entretanto a grande maioria é de OTUs raras, reproduzindo as observações de Osei-Poku e colaboradores (2012).

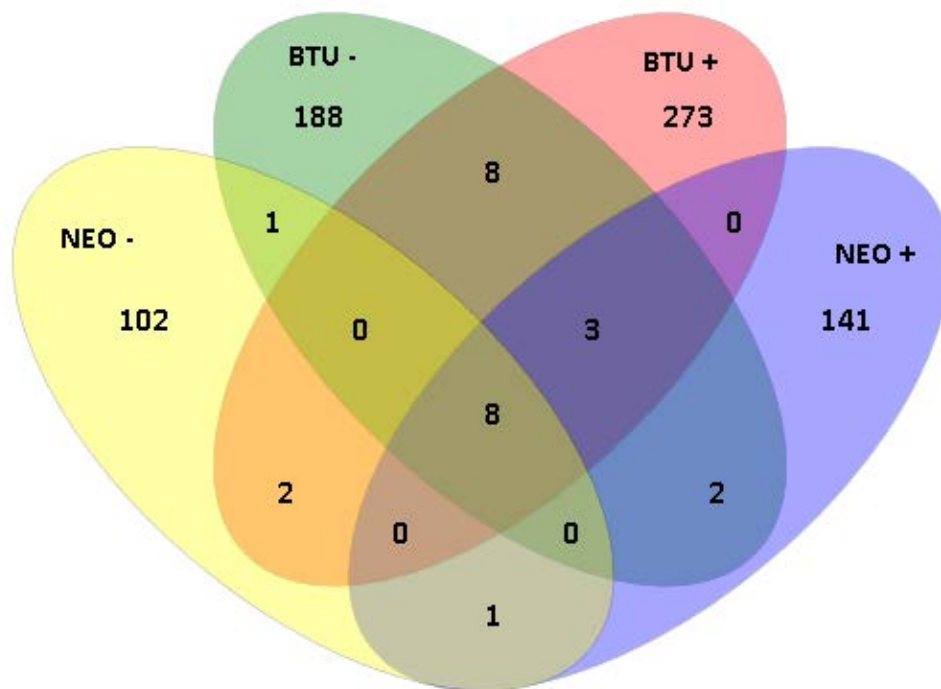


Figura 22. Diagrama de Venn das OTUs presentes nas amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectas por DENV-4 das populações de Botucatu-SP e Neópolis-SE (BTU+, BTU-, NEO+, NEO-, respectivamente).

A fim de comparar a associação e a estrutura das amostras pela abordagem das OTUs, foram selecionadas as 50 mais representativas do estudo (Fig. 23). Através da análise de *heatmap* das 50 OTUs mais significativas e pelos cálculos dos índices de Jaccard (Jaccard, 1912) e de Yue & Clayton (Yue & Clayton, 2005) para a diferenciação das amostras, pode-se afirmar que são necessárias apenas 8 OTUs para diferenciar as amostras, as quais estão representadas em ordem de representatividade na Figura 23 e Tabela S8 anexo.

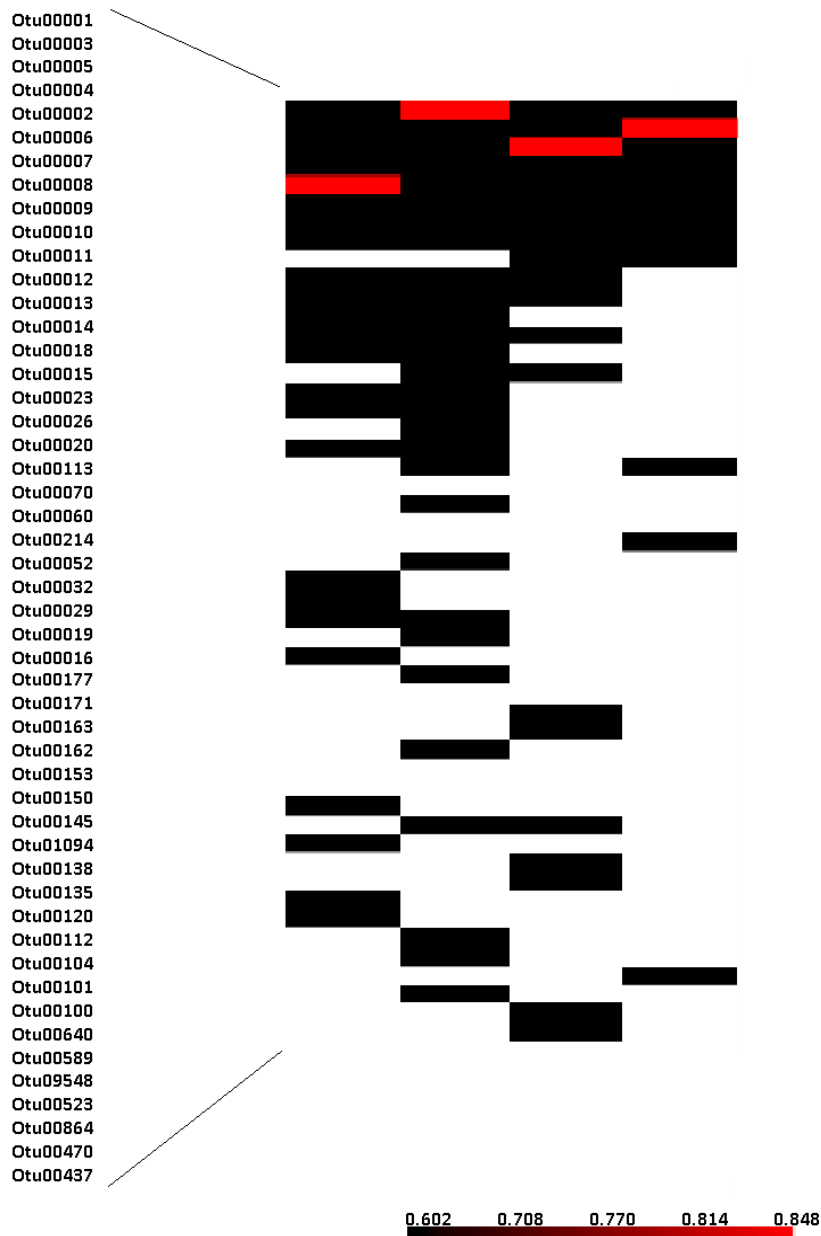


Figura 23. *Heatmap* da abundância relativa das 50 OTUs mais significativas.

Apesar da estruturação das amostras em função das OTUs parecerem bastante similares (Fig. 23 e 24), quando é estudada a estruturação populacional em função das 50 OTUs mais comuns através da análise das componentes principais (PCA), a determinação dos centróides de cada amostra confirma a diferença entre elas (PCA, $p < 0.001$) (Fig. 25). A análise das PCAs foi também realizada com as réplicas biológicas da população de Botucatu, sendo obtido o mesmo resultado de

diferenciação estrutural entre as amostras, sendo apenas os centróides das amostras BTU- (rep.b1) e BTU- (rep.b2) iguais (desvios de posições inferiores a 7%).

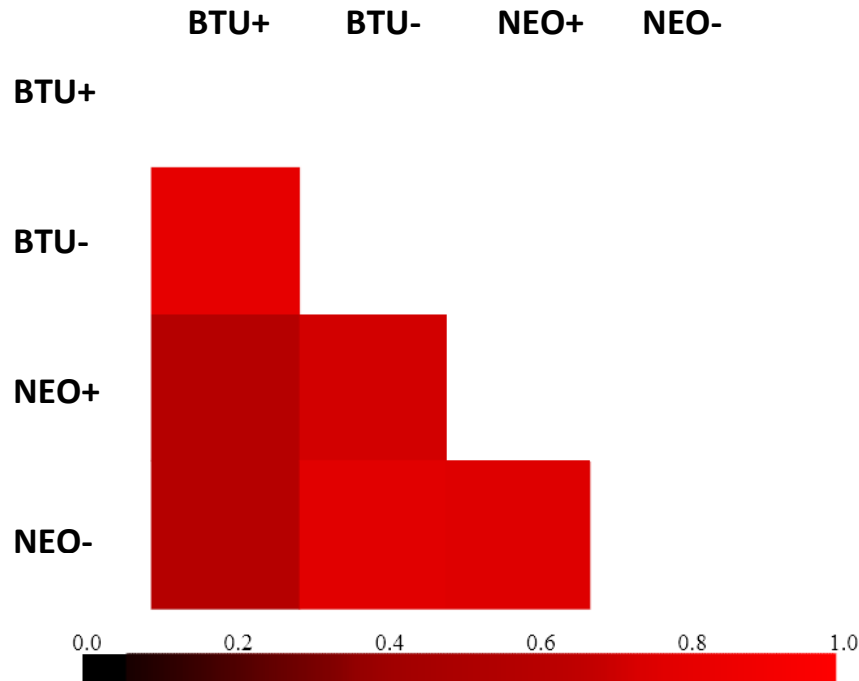


Figura 24. *Heatmap* das similaridades das amostras calculadas em função dos coeficientes de Jaccard e Yue & Clayton.

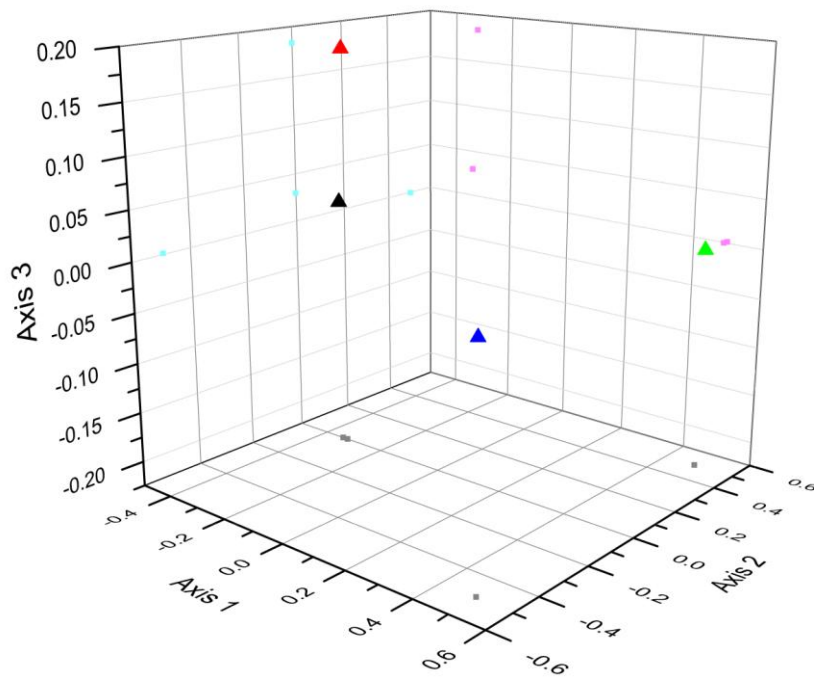


Figura 25. Representação da posição dos centróides das amostras BTU+ (triângulo preto), BTU- (triângulo vermelho), NEO+ (triângulo verde) e NEO- (triângulo azul) através da análise das componentes principais (PCA). Os pontos cinza, ciano e rosa são as projeções dos centróides respectivamente nos eixos 1-2, 2-3 e 1-3, respectivamente.

Com base nas análises das componentes principais (PCA) e nos índices de Jaccard e Yue & Clayton, foram determinados os gêneros de bactérias em ordem decrescente de representatividade em nossos resultados: *Elizabethkingia*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Asaia*, *Pantoea* e *Delftia*.

Nossos resultados relacionados à diversidade bacteriana estão de acordo com os demais apresentados na literatura que utilizaram insetos coletados no campo e com cepas mantidas em laboratório, sendo os gêneros mais representativos: *Elizabethkingia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Cedecea*, *Pantoea*, *Aeromonas*, e *Asaia* (Lindh *et al.*, 2005; Lindh *et al.*, 2008; Rani *et al.*, 2009; Zouache *et al.*, 2011; Dinparast *et al.*, 2011; Chavshin *et al.*, 2012; Osei-Poku *et al.*, 2012; Boissière *et al.*, 2012; Ngwa *et al.*, 2013). No entanto, para cepas de mosquitos *Anopheles* criados em laboratório tem sido reportado uma menor diversidade bacteriana e a dominância dos gêneros *Serratia* e *Elizabethkingia* (Lindh *et al.*, 2008; Boissière *et al.*, 2012; Ngwa *et al.*, 2013). Boissière e colaboradores (2012) relatam que 90% das bactérias intestinais obtidas a partir de mosquitos coletados em criadouros naturais em Camarões pertencem ao filo Proteobacteria, enquanto em mosquitos criados em laboratório, 95% das bactérias pertencem ao gênero *Elizabethkingia* (filo Bacteroidetes). Estes mesmos autores sugerem que a grande diferença na composição das bactérias intestinais entre cepas de laboratório e mosquitos coletados no campo, bem como entre mosquitos provenientes de locais de reprodução distintos, advém de bactérias comensalmente adquiridas a partir do ambiente (através de fonte aquática dos criadouros). Sugerem também que a predominância de *Elizabethkingia* spp. no intestino médio dos mosquitos criados em insetário reflete que esta bactéria encontrou um nicho favorável neste ambiente, onde a concorrência com outras espécies bacterianas é limitada.

Elizabethkingia, gênero anteriormente conhecido como *Chryseobacterium* ou *Flavobacterium* (King, 1959), é um gênero de bactérias gram-negativa em forma de haste, encontrada tanto na água quanto no solo (Steinberg & Burd, 2010). Estas geralmente são multirresistentes aos antibióticos tipicamente utilizados para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas, incluindo os de

amplo espectro (Lin *et al.*, 2004, Hung *et al.*, 2008). Alguns estudos demonstram que *Elizabethkingia* é transmitida entre as gerações de mosquitos via transmissão trans-estadial (transmissão a partir de uma fase da vida para a próxima) ou horizontal, e a sua predominância no intestino médio não é alterada pela dieta nem pela presença do parasita da malária (*P. falciparum* ou *P. berghei*) (Favia *et al.*, 2007; Damiani *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Ngwa *et al.*, 2013). Em mosquitos do gênero *Aedes*, não foi encontrado nenhum estudo relacionado à sua interação com o DENV.

Elizabethkingia spp. tem sido repetidamente detectada no intestino de *Anopheles gambiae* (Lindh *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011), *An. stephensi* (Rani *et al.*, 2009; Ngwa *et al.*, 2013) e *Aedes aegypti* (Terenius *et al.*, 2012), tanto em insetos de laboratório quando selvagem, bem como em todos os estádios de desenvolvimento do inseto (Lindh *et al.*, 2008; Rani *et al.*, 2009; Kajla *et al.*, 2010; Ngwa *et al.*, 2013; Coon *et al.* 2014). Com base nas observações acima, é muito provável que algumas espécies de *Elizabethkingia* sejam simbiossiontes destes mosquitos. Segundo Dong e colaboradores (2009), bactérias deste gênero são capazes de suprimir o crescimento de outras bactérias no intestino médio de *An. gambiae* criados em laboratório, indicando que *Elizabethkingia* produz substâncias com atividades antimicrobiana que podem ser responsáveis pela sua dominância no intestino médio do mosquito. Entretanto, em nossos resultados mostramos que apesar da dominância do gênero *Elizabethkingia* nas amostras da população de Botucatu, estas apresentaram maior diversidade que as amostras da população de Neópolis, o que sugere que as bactérias do gênero *Elizabethkingia* não estão afetando a diversidade microbiana nesta população.

Ngwa e colaboradores (2013) demonstraram que extratos de *Elizabethkingia meningoseptica* tem efeito sobre *P. falciparum in vitro* e exibiu toxicidade em gametócitos *in vitro*. Bahia e colaboradores (2014) mostraram que *Elizabethkingia anophelis* teve um efeito de destaque no bloqueio do desenvolvimento do parasita *Plasmodium in vitro*. Quando Akhouayri e colaboradores (2013) injetaram *Elizabethkingia meningoseptica* em mosquitos *Anopheles*, as bactérias foram altamente virulentas aos insetos adultos, através de um processo relacionado a lesões melanóticas

nos tecidos corporais de gordura. Juntos, estes estudos demonstram que as espécies do gênero *Elizabethkingia* têm impacto na fisiologia de seus mosquitos hospedeiros e interações com patógenos.

Em nossos resultados, foi observada a predominância do gênero *Elizabethkingia* nas amostras da população de Botucatu em comparação com a população de Neópolis. Com isso, e baseando-se nos níveis de susceptibilidade apresentados pelas populações de Botucatu e Neópolis ao DENV (Botucatu é mais resistente enquanto Neópolis é mais suscetível), é possível que bactérias do gênero *Elizabethkingia* estejam exercendo algum tipo de ação anti-DENV na população de Botucatu, o que poderia ao menos em parte explicar a baixa suscetibilidade destes mosquitos ao DENV. Entretanto, para a confirmação desta hipótese são necessários estudos funcionais (interação *in vitro* e *in vivo*) para verificar o efeito de bactérias do gênero *Elizabethkingia* sobre a infecção viral.

Cabe ressaltar que este gênero, dentre todos os principais encontrados neste trabalho, é o gênero com o maior número de relatos da relevância biológica, uma vez que foi demonstrada sua transmissão horizontal e trans-estadial em mosquitos. Além disso, bactérias deste gênero foram encontradas em tecidos ovarianos, podendo ser transmitida para os embriões, o que pode favorecer sua utilização para o desenvolvimento de estratégias de controle do mosquito baseadas em simbioses (Akhouayri *et al.*, 2013).

Outro gênero encontrado com alta frequência, principalmente na amostra de Neópolis ingurgitada e não infectada com DENV (NEO-), foi *Stenotrophomonas*. Apesar de alguns estudos terem relatado este gênero no intestino médio de *Anopheles gambiae* (Lindh *et al.*, 2005) e de *Culex quinquefasciatus* (Pidiyar *et al.*, 2004), não encontramos na literatura outros relatos de mosquitos com tamanha prevalência deste gênero em seu microbioma. Este gênero já foi associado a outros organismos, tais como carrapatos (Murrell *et al.*, 2003), peixes (Furushita *et al.*, 2005) e abelhas (Evans *et al.*, 2006), porém em uma proporção inferior à obtida em nosso estudo.

Sabe-se que o gênero *Stenotrophomonas* é frequentemente encontrado em um grande número de solos e ambientes aquáticos, os quais costumam ter grande variação entre diferentes localidades. Isso sugere que os fatores ambientes (solo, ambiente aquático) desempenham um papel importante na colonização do intestino do mosquito com as bactérias encontradas em locais de reprodução ou durante a alimentação (Chandel *et al.*, 2013). Entretanto, a hipótese de contaminação das populações durante a realização do estudo não se aplica em nosso caso, uma vez que todos os mosquitos ingurgitados da população de Neópolis (NEO+ e NEO-) foram criados ao mesmo tempo, no mesmo reservatório de água e nas mesmas condições (temperatura e humidade). O que justifica a exclusão dessa hipótese é o fato da grande diferença na composição microbiana, pois em caso de contaminação por fatores ambientais, sendo que todas as amostras estavam no mesmo ambiente, deveriam ter apresentado microbiomas similares, o que não aconteceu. Pelo mesmo motivo podemos descartar a contaminação das amostras durante a preparação das etapas de PCR e sequenciamento, pois todas as amostras foram processadas concomitantemente, com seus respectivos controles negativos. E em caso de contaminação, todas deveriam ter apresentado o mesmo perfil do microbioma.

O gênero *Pseudomonas* foi o terceiro de maior importância para separação das amostras estudadas, pois foi o mais prevalente na amostra NEO+ (população de Neópolis ingurgitada e infectada com DENV). Apesar de alguns relatos sugerirem que se trata de um gênero muito comum na microbiota de mosquitos (*Culex* e *Anopheles* principalmente) (Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003; Pidiyar *et al.*, 2004; Riehle & Jacobs-Lorena, 2005; Favia *et al.*, 2007, Rani *et al.*, 2009), em nosso trabalho este gênero mostrou-se irregularmente distribuído, como já mostrado por Osei-Poku e colaboradores (2012), bem como sendo predominante em outros microbiomas (Chavshin *et al.*, 2012; Charan *et al.*, 2013).

Há relatos que bactérias do gênero *Pseudomonas* estão associadas ao aumento da carga do parasita no mosquito *Culex quinquefasciatus* após a ingestão de sangue (Pidiyar *et al.*, 2004). Foi

mostrado também que este gênero pode estar relacionado com o controle da competência vetorial de mosquitos (Charan *et al.*, 2013), o que poderia, em parte explicar a diferença de suscetibilidade ao DENV-4 entre os indivíduos NEO+ e NEO-.

Bahia e colaboradores (2014) demonstram que *Pseudomonas putida* interferiu com a infecção do mosquito *An. gambiae* pelo *Plasmodium falciparum*, porém não exerceu um bloqueio completo, sugerindo que o mecanismo de inibição do *Plasmodium* exercido por *P. putida* possa requerer a introdução de um maior número de bactérias daquele isolado.

Entretanto, o possível mecanismo anti-DENV ou antiparasitário das bactérias do gênero *Pseudomonas* não foi elucidado e não se sabe se a ação é ligada à interação direta com o parasita, à produção de metabólitos secundários antiparasitários e anti-DENV ou à ativação do sistema imune do mosquito. Para o *Plasmodium* ensaios *in vitro* sugerem que a inibição do desenvolvimento deste parasita por diversos isolados bacterianos incluindo *P. putida* podem ser mediados através de uma interação direta com os parasitas ou da produção de fatores inibitórios (Bahia *et al.*, 2014).

O gênero *Asaia* foi encontrado nas duas populações estudadas, entretanto apenas nas amostras BTU+ e BTU- elas apresentaram quantidades representativamente diferentes entre si. Boissière e colaboradores (2012) relataram que *Asaia* é um dos principais gêneros que compõe o intestino médio de mosquitos, porém ocorrendo com grande variabilidade individual entre diferentes populações do gênero *Anopheles*.

Estudos realizados em *An. stephensis* com estirpes fluorescentes de *Asaia* demonstraram que esta bactéria é transmitida verticalmente da mãe para a prole (Crotti *et al.*, 2009; Favia *et al.*, 2007), sofrendo também transmissão paterna para a descendência, por transferência venérea do macho para a fêmea durante o acasalamento (Crotti *et al.*, 2009; Damiani *et al.*, 2008). Essa capacidade permitiria investigar a base da interação específica hospedeiro-simbionte e tendo elevado potencial para o desenvolvimento de abordagens de bloqueio de transmissão de microorganismos por insetos vetores baseadas em bactérias desse gênero (Crotti *et al.*, 2009). Embora há relatos de estudos *in*

vitro em que bactérias do gênero *Asaia* induzem a expressão de peptídeos antimicrobianos em *An. stephensi* e *Drosophila* (Capone *et al.*, 2013), nossas análises não nos permitem traçar uma associação direta entre a indução de AMPs nas amostras NEO+ e BTU+ e a presença desta bactéria naqueles indivíduos.

Nossos dados sugerem que as bactérias do gênero *Elizabethkingia* apesar de não serem as mais prevalentes percentualmente em nossas amostras, foram as preponderantes para separar as amostras de nosso estudo. Dentre todas as citadas, as que mais apresentam relatos são aquelas relacionadas a esse gênero e, assim como na literatura, nossos resultados sugerem que esse gênero pode estar relacionado com a maior resistência apresentada à infecção por DENV da população de Botucatu em relação à população de Neópolis. Contudo, esta hipótese ainda necessita ser devidamente avaliada e confirmada em experimentos futuros.

6. Conclusão

6. Conclusão

O presente estudo traz informações inéditas e relevantes sobre o perfil gênico diferencialmente expresso em mosquitos *Aedes aegypti* de diferentes populações naturais (Botucatu-SP e Neópolis-SE) sabidamente infectados ou não infectados por DENV-4. Constatamos que a população de Botucatu apresentou maior resistência e teve seu perfil de expressão gênica pouco alterado após a infecção dos mosquitos. Já a população de Neópolis, mais suscetível, apresentou maior modulação gênica pós-infecção. Embora a análise do perfil de expressão indique alguns genes imunes ligados à infecção, acreditamos que estes são apenas responsivos à infecção, mas não responsáveis pelo controle do nível de susceptibilidade das populações. Possivelmente que os genes que codificam as proteínas digestivas Tripsinas, DEAD box e às TEPs estão desempenhando papel mais preponderante na determinação da susceptibilidade das amostras de nosso estudo. De acordo com nossos dados é lógico, ainda, hipotetizar que as bactérias do gênero *Elizabethkingia* estejam contribuindo para a elevada resistência da população de Botucatu ao DENV. Contudo mais estudos devem ser realizados, como por exemplo, estudos funcionais, para comprovação destes achados.

7. Referências

7. Referências

- ACOSTA, E.G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E.B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **J. Gen. Virol.**, v.89, p.474-484, 2008.
- AKHOUAYRI, I.G.; HABTEWOLD, T.; CHRISTOPHIDES, G.K. Melanotic Pathology and Vertical Transmission of the Gut Commensal *Elizabethkingia meningoseptica* in the Major Malaria Vector *Anopheles gambiae*. **PLoS ONE**, v.8, n.10, e77619, 2013.
- ASSENBERG, R.; MASTRANGELO, E.; WALTER, T. S.; VERMA, A.; MILANI, M.; OWENS, R. J.; STUART, D. I.; GRIMES, J. M.; MANCINI, E. J. Crystal Structure of a Novel Conformational State of the Flavivirus NS3 Protein: Implications for the Polyprotein Processing and Viral Replication. **J. Virol.**, v.83, n.24, p.12895-12906, 2009.
- BARTHOLOMAY, L.C.; WATERHOUSE, R.M.; MAYHEW, G.F.; CAMPBELL, C.L.; MICHEL, K.; *et al.* Pathogenomics of *Culex quinquefasciatus* and meta-analysis of infection responses to diverse pathogens. **Science**, n.330, p.88–90, 2010.
- BEERNTSEN, B.T.; JAMES, A.A.; CHRISTENSEN, B.M. Genetics of mosquito vector competence. Microbiol. **Mol. Biol. Rev. Madison.**, v.64, n.1, p.115–137, 2000.
- BEHURA, S.; GOMEZ MOCHORO, C.; HARKER, B.W.; DEBRUYN, B.; LOVIN, D.D.; HEMME, R.R.; MORI, A.; ROMERO SEVERSON, J.; SEVERSON, D.W. Global cross-talk of genes in the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.5, n.11, e1385, 2011.
- BENJAMINI, Y. & HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J. R. Stat. Soc.**, v.57, n.1, p.289–300, 1995.
- 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.
- BENNETT, K.E.; FLICK, D.; FLEMING, K.H.; JOCHIM, R.; BEATY, B.J.; *et al.* Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics**, v.170, p.185–194, 2005.

- BAHIA, A.C.; DONG, Y.; BLUMBERG, B.J.; MLAMBO, G.; TRIPATHI, A.; BENMARZOUK-HIDALGO, O.J.; CHANDRA, R.; DIMOPOULOS, G. Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. **Envir. Microbiol.**, v.16, p.2980–2994, 2014.
- BLACK, I.V. W.C.; BENNET, K.E.; GORROCHÓTEGUI-ESCALANTE, N.; BARILLAS-MURY, C.V.; FERNANDEZ-SALAS, I.; MUNOZ, M.D.L.; FARFÁN-ALE, J.A.; OLSON, K.E.; BEATY, B.J. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Arc. Med. Res.**, v.33, p.379-388, 2002.
- BLANDIN, S.; SHIAO, S.H.; MOITA, L.F.; JANSE, C.J.; WATERS, A.P.; *et al.* Complementlike protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Cell**, v.116, p.661–670, 2004.
- BOISSIÈRE, A.; TCHIOFFO, MT.; BACHAR, D.; ABATE, L.; MARIE, A.; *et al.* Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. **Plos Pathog.**, v.8, 2012.
- BONIZZONI, M.; DUNN, W.A.; CAMPBELL, C.L.; OLSON, K.E.; DIMON, M.T.; MARINOTTI, O.; JAMES, A.A. RNA-Seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*. **BMC Genomics**, v.12, n.82, 2011.
- BONIZZONI, M.; DUNN, W.A.; CAMPBELL, C.L.; OLSON, K.E.; MARINOTTI, O.; *et al.* Complex Modulation of the *Aedes aegypti* Transcriptome in Response to Dengue Virus Infection. **PLoS ONE**, v.7, n.11, e50512, 2012.
- BONIZZONI, M.; DUNN, W.A.; CAMPBELL, C.L.; OLSON, K.E.; MARINOTTI, O.; *et al.* Strain variation in the transcriptome of the dengue fever, *Aedes aegypti*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v.2, p.103–114, 2012.
- BONIZZONI, M.; BRITTON, M.; MARINOTTI, O.; DUNN, W.A.; FASS, J.; JAMES, A.A. Probing functional polymorphisms in the dengue vector, *Aedes aegypti*. **BMC Genomics**, v.14, n.739, 2013.
- BOSIO, C.F.; BEATY, B.J.; BLACK, W.C. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.59, p.965–970, 1998.
- BOSIO, C.F.; FULTON, R.E.; SALASEK, M.L.; BEATY, B.J. & BLACK, W.C.T. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics**, v.156, p.687–698, 2000.
- BOSIO, C.F.; HARRINGTON, L.C.; JONES, J.W.; SITHIPRASASNA, R.; NORRIS, D. E.; SCOTT, T.W. Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.72, p.434-442, 2005.
- BOUTROS, M.; AGAISSE, H.; PERRIMON, N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. **Dev. Cell**, v.3, p.711-722, 2002.
- BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCO, J.L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Dev. Com. Immunol.**, v.23, p.329-344, 1999.

- 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.
- CAPONE, A.; RICCI, I.; DAMIANI, C.; MOSCA, M.; ROSSI, P.; SCUPPA, P.; CROTTI, E.; EPIS, S.; ANGELETTI, M.; VALZANO, M.; SACCHI, L.; BANDI, C.; DAFFONCHIO, D.; MANDRIOLI, M.; FAVIA, G. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. **Parasit. Vectors**, v.6, n.182, 2013
- CASTRO, D.P.; MORAES, C.S.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Inhibitory effects of D-mannose on trypanosomatid lysis induced by *Serratia marcescens*. **Exp. Parasitol.**, v.115, p.200–204, 2007.
- CDC/HOWELL, P.I. AND COLLINS, F.H. (2007). Disponível em: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>. Acesso em: 10 de abril de 2014.
- CDC. (2009). "Dengue fever fact sheet." Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/>. Acesso em: 20 de abril de 2014.
- CHAMBERS, E.W.; MEECE, J.K.; MCGOWAN, J.A.; LOVIN, D.D.; HEMME, R.R.; CHADEE, D.D.; MCABEE, K.; BROWN, S.E.; KNUDSON, D.L.; SEVERSON, D.L.; DAVID, W. Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Heredity**, v.98, p.202–210, 2007.
- CHANDEL, K.; MENDKI, M.J.; PARIKH, R.Y.; KULKARNI, G.; TIKAR, S.N., *et al.* Midgut Microbial Community of *Culex quinquefasciatus* Mosquito Populations from India. **PLoS ONE**, v.8, n.11, e80453, 2013.
- CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandi. J. Stat.**, v.11, p.265-270, 1984.
- CHARAN, S.S.; PAWAR, K.D.; SEVERSON, D.W.; PATOLE, M.S.; SHOUCHE, Y.S. Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. **Parasitol. Res.**, v.112, n.7, p.2627-2637, 2013.
- CHAVSHIN, A.Z.; OSHAGHI, M.A.; VATANDOOST, H.; POURMAND, M.R.; RAEISI, A.; ENAYATI, A.A.; MARDANI, N.; GHOORCHIAN, S. Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. **Acta Trop.**, v.121, p.129-134, 2012.
- CHENG, G.; LIU, L.; WANG, P.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.O.; *et al.* An *in vivo* transfection approach elucidates a role for *Aedes aegypti* thioester-containing proteins in flaviviral infection. **PLoS ONE**, v.6, e22786, 2011.
- CHERRY, S. & PERRIMON, N. Entry is a rate-limiting step for viral infection in a *Drosophila melanogaster* model of pathogenesis. **Nat. Immunol.**, v.5, n.1, p.81-87, 2004.

- CHRISTOPHIDES, G.K.; VLACHOU, D.; KAFATOS, F.C. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Immunol. Rev.**, v.198, n.1, 2004.
- 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.
- CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J. Virol.**, v.80, n.23, p.11418-11431, 2006.
- COLEMAN, J.; JUHN, J.; JAMES, A.A.A. Dissection of Midgut and Salivary Glands from *Ae. aegypti* Mosquitoes. **J. Vis. Exp.**, v.5, 2007.
- COLPITTS, T.M.; COX, J.; VANLANDINGHAM, D.L.; FEITOSA, F.M.; CHENG, G.; *et al.* Alterations in the *Aedes aegypti* Transcriptome during Infection with West Nile, Dengue and Yellow Fever Viruses. **PLoS Pathog**, v.7, n.9, e1002189, 2011.
- COMUNICAÇÃO / INSTITUTO OSWALDO CRUZ. 2014. Estudo compara métodos para medir infestação por *Aedes aegypti*. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2135&sid=32&tpl=printerview>. Acesso em: abril 2014.
- COON, K.L.; VOGEL, K.J.; BROWN, M.R.; STRAND, M.R. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. **Mol. Ecol.**, v.23, p.2727–2739, 2014.
- CONSOLI, R.A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 225p, 1994.
- 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.
- CROTTI, E.; DAMIANI, C.; PAJORO, M.; GONELLA, E.; RIZZI, A.; RICCI, I.; NEGRI, I.; SCUPPA, P.; ROSSI, P.; BALLARINI, P.; RADDADI, N.; MARZORATI, M.; SACCHI, L.; CLEMENTI, E.; GENCHI, M.; MANDRIOLI, M.; BANDI, C.; FAVIA, G.; ALMA, A. DAFFONCHIO, D. *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. **Environ. Microbiol.**, v.11, p.3252–3264, 2009.
- DAMIANI, C.; RICCI, I.; CROTTI, E.; ROSSI, P.; RIZZI, A.; SCUPPA, P.; ESPOSITO, F.; BANDI, C.; DAFFONCHIO, D.; FAVIA, G. Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. **Curr. Biol.**, v.18, p.R1087-R1088, 2008.
- DAMIANI, C.; RICCI, I.; CROTTI, E.; ROSSI, P.; RIZZI, A.; *et al.* Mosquito bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. **Microb. Ecol.**, v.60, p.644-654, 2010.
- DAVID, J.P. *et al.* Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v.368, 2013.

- DE GREGORIO, E.; SPELLMAN, P.T.; RUBIN, G.M.; LEMAITRE, B. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. **P.N.A.S.**, v.98, p.12590-12595, 2001.
- DE GREGORIO, E.; SPELLMAN, P.T.; TZOU, P.; RUBIN, G.M.; LEMAITRE, B. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. **EMBO Journal**, v.21, p.2568-2579, 2002.
- DEDDOUCHE, S.; MATT, N.; BUDD, A.; MUELLER, S.; KEMP, C.; *et al.* The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *Drosophila*. **Nat. Immunol.**, v.9, p.1425–1432, 2008.
- DILLON, R.J.; DILLON, V.M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. **Annu. Rev. Entomol.**, v.49, p.71-92, 2004.
- DIMOPOULOS, G. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. **Cell Microbiol.**, v.5, p.3-14, 2003.
- DINPARAST, D.N.; JAZAYERI, H.; RAZ, A.; FAVIA, G.; RICCI, I.; *et al.* Identification of the Midgut Microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for Their Application as a Paratransgenic Tool against Malaria. **PLoS ONE**, v.6, n.12, e28484, 2011.
- DONALÍSIO, M.R.; GLASSER, C.M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.5, n.3, p.260-272, 2002.
- DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLoS Pathog.**, v. 5, e1000423, 2009.
- DUPONT, A.W. & DUPONT, H.L. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v.8, n.9, p.523-531, 2011.
- EDGAR, R.C.; HAAS, B.J.; CLEMENTE, J.C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v.27, n.16, 2011.
- EL CHAMY, L.; LECLERC, V.; CALDELARI, I.; REICHHART, J.-M. Sensing of danger signals and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways upstream of Toll. **Nat. Immunol.**, v.9, p.1165-1170, 2008.
- EVANS, J.D.; ARMSTRONG, T.N. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. **BMC Ecology**, v.6, n.4, 2006.
- FAVIA, G.; RICCI, I.; DAMIANI, C.; RADDADI, N.; CROTTI, E. *et al.* Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. **P.N.A.S.**, v.104, p.9047-9051, 2007.
- FAY, R.W. & ELIASON, D.A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. **Mosqu. News**, v.26, p.531-5, 1966.

- FELIX, G.M. **Saúde-USP Online Destaque**. Instituto Butantan testa vacina contra a dengue em humanos. Disponível em: < <http://www5.usp.br/33039/instituto-butantan-testa-vacina-contr-a-dengue-em-humanos>>. Acesso em: 20 jan 2014.
- FIELDS, B. *et al.* **Fields-Virology**. v.2. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 4th edition. 2001.
- FIGUEIREDO, L.T.M.; FONSECA, B.A.L. Dengue. In: **Tratado de Infectologia** (R. Veronesi & R. Focacia, org.), pp. 345-35, São Paulo: Editora Atheneu, 1966.
- FIRE, A., XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v.19, p.806-811, 1998.
- FORATTINI, O.P. **Entomologia médica**. 2ed. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 1965. 506p.
- FORATTINI, O.P. **Ecologia Epidemiologia e Sociedade**. São Paulo: Artes Médicas. 1992.
- FRANCO, O. **História da febre amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Departamento de Endemias Rurais, 208p, 1976.
- FURUSHITA, M.; OKAMOTO, A.; MAEDA, T.; OHTA, M.; SHIBA, T. Isolation of Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) from a Marine Fish Farm. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.5598-5600, 2005.
- GAIO, A.D.; GUSMAO, D.; SANTOS, A.; BERBERT-MOLINA, M.; PIMENTA, P.; *et al.* Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). **Parasit. Vectors**, v.4, p.105, 2011.
- GOMEZ-MACHORRO, C.; BENNETT, K.E.; MUNOZ, M.L. & BLACK, W.C. Quantitative Trait Loci Affecting Dengue Midgut Infection Barriers in an Advanced Intercross Line of *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol.**, v.13, p.637-648, 2004.
- GONZALEZ-CERON, L.; SANTILLAN, F.; RODRIGUEZ, M.H.; MENDEZ, D.; HERNANDEZ-AVILA, J.E. Bacteria in midguts of fieldcollected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. **J. Med. Entomol.**, v.40, p.371-374, 2003.
- GOOD, I.J. The population frequencies of species and the estimator of populations parameters. **Biometrika**, v.40, p.237-264, 1953.
- GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N. *et al.* Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.66, p.213-222, 2002.
- GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N., LOZANO-FUENTES, S., BENNETT, K. E., MOLINA-CRUZ, A., BEATY, B. J., BLACK IV, W. C. Association mapping of segregating sites in the early trypsin gene and susceptibility to dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v.35, p.771-788, 2005.

- GOTTAR, M.; GOBERT, V.; MATSKEVICH, A.A.; REICHHART, J.M.; WANG, C.; BUTT, T.M.; BELVIN, M.; HOFFMANN, J.A.; FERRANDON, D. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. **Cell**, v.127, p.1425–1437, 2006.
- GUBLER, D.J.; ROSEN, L. Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.25, p.318-325, 1976.
- GUBLER, D.J. Variation in Susceptibility to Oral Infection with Dengue Viruses among Geographic Strains of *Aedes aegypti*. **A. J. Trop. Med. Hyg.**, v.28, p.1045–52, 1979.
- GUBLER, D.J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, n.3, p.442-450, 1998a.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, n.3, p.480-496, 1998b.
- GUBLER, D.J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle?. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.27(5), p.319-330, 2004.
- GUBLER, D.J. Novartis Foundation Symposium 277 - **New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases**. Novartis Foundation Symposia, 2006.
- GUNTHER, J. *et al.* Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. **Intervirology**, v.50, p.347–352, 2007.
- GUSMÃO, D.S.; SANTOS, A.V.; MARINI, D.C.; *et al.* First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, p.919–924, 2007.
- GUSMÃO, D.S.; SANTOS, A.V.; MARINI, D.C.; BACCI, M. JR; BERBERT-MOLINA, M.A.; LEMOS, F.J. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. **Acta Trop.**, v. 115, p.275–281, 2011.
- GUZMÁN, M.G. Global voices of science. Deciphering dengue: the Cuban experience. **Science**, v.309, n.5740, p.1495-7, 2005.
- HALSTEAD, S.B.; NIMMANNITYA, S.; COHEN, S.N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. **The Yale Journal of Biology and Medicine.**, v.42, n.5, p.311-328, 1970.
- HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, p.476-81, 1988.
- HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, v.370, p.1644-1652, 2007.
- HATCH, S.; MATHEW, A.; *et al.* Dengue vaccine: opportunities and challenges. **IDrugs**, v.11, n.1, p.42-45, 2008.
- HENCHAL, E.A. & PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.3, n.4, p.376-396, 1990.

- HOFFMANN, J.A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY JR., C.A.; EZEKOWITZ, R.A.B. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. **Science**, v.284, p.1313-1318, 1999.
- HOFFMANN, J.A. & REICHHART, J.M. *Drosophila* immunity : an evolutionary perspective. **Nat. Immunol.**, v.2, p.121-12, 2002.
- HOWE, G.M. A World geography of human diseases. **Academic Press**, Inc, New York, N.Y. 1977.
- HUNG, P.; LIN, Y.; LIN, C.; LIU, M.;SHI, Z. *Chryseobacterium meningosepticum* infection: antibiotic susceptibility and risk factors for mortality. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v.41, p.137-144, 2008.
- HURST, G.D.D.; HUTCHENCE, K.J. Host defence: getting by with a little help from our friends. **Curr. Biol.**, v.20, p.R806-R808, 2010.
- IGARASHI, A. Impact of dengue virus infection and its control. **Immunol. Med. Microbiol.**, v.18, p.291-300, 1997.
- IRVING, P.; TROXLER, L.; HEUER, T.S.; BELVIN, M.; KOPCZYNSKI, C.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A.; HETRU, C. A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. **P.N.A.S.**, v.98, p.15119-15124, 2001.
- JACCARD, P. The distribution of the flora in the alpine zone. **New Phytologist**, v.11, p.37-50, 1912.
- JÜNEMANN, S., PRIOR, K., SZCZEPANOWSKI, R., HARKS, I., EHMKE, B., GOESMANN, A., STOYE, J., HARMSEN, D. Bacterial Community Shift in Treated Periodontitis Patients Revealed by Ion Torrent 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing. **PLoS ONE**, v.7, n.8, e41606, 2012.
- JOBLING, B. The mosquito *Aedes aegypti*. In: B. Jobling, **Anatomical drawings of biting flies**; Welcome Trust: Londres, 1987.
- JOYCE, J.D.; NOGUEIRA, J.R.; BALES, A.A.; PITTMAN, K.E.; AANDERSON, J R. Interactions Between La Crosse Virus and Bacteria Isolated From the Digestive Tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v.48, n.2, p.389–394, 2011.
- KAJLA, M.K.; ANDREEVA, O.; GILBREATH, T.M.; PASKEWITZ, S.M. Characterization of expression, activity and role in antibacterial immunity of *Anopheles gambiae* lysozyme c-1. **Comp Biochem Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v.155, p.201–209, 2010.
- KARABATSOS, N. **International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**. 3rd edition, San Antonio, USA: ASTMH, 1141p, 1985.
- KIM, M.; OH, H.S.; PARK, S.C.; CHUN, J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. **Int. J. Syst.Evol. Micr.**, v.64, p.346–351, 2014.
- KLEINO, A.; VALANNE, S.; *et al.* Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. **Embo. J.**, v.24, n.19, p.3423-34, 2005.

- KOU, Z.; QUINN, M. *et al.* Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. **J. Med. Virol.**, v.80, n.1, p.134-46, 2008.
- KRISHNAN, M.N.; SUKUMARAN, B.; PAL, U.; AGAISSE, H.; MURRAY, J.L.; HODGE, T.W. & FIKRIG, E. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. **J. Virol.**, v.81, p.4881–4885, 2007.
- KUMAR,P.; HENIKOFF, S. & NG,P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nat. Protoc.**, v.4, p.1073–1081, 2009.
- KYLE, J.L. & HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.62, p.71-92, 2008.
- LABEAUD, A.D. Why Arboviroses Can Be Neglected Tropical diseases. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.2, n.6, 2008.
- LAMBRECHTS, L.; QUILLERY, E.; NOËL, V.; RICHARDSON, J.H.; JARMAN, R.G.; SCOTT, T.W.; CHEVILLON, Specificity of resistance to dengue virus isolates is associated with genotypes of the mosquito antiviral gene *Dicer-2*. **Proc. Biol. Sci.** v.280, n.1751, 2013.
- LEMAITRE, B. & HOFFMANN, J.The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annu. Rev. Immunol.**, v.25, p.697-743, 2007.
- LIN, P.; CHU, C.; SU, L.; HUANG, C.; CHANG, W.; CHIU, C. Clinical and microbiological analysis of bloodstream infections caused by *Chryseobacterium meningosepticum* in nonneonatal patients. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.3353-3355, 2004.
- LINDH, J.M.; TERENIUS, O.; FAYE, I. 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, p.7217–7223, 2005.
- LINDH, J.M.; BORG-KARLSON, A.K.; FAYE, I. Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. **Acta Trop.**, v.107, p.242–250, 2008.
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; DE FILIPPIS, A.M.; FAILLOUX, A.B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.98, n.1, p.43-54, 2004.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias**. In: J. R. Coura, Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias; Guanabara – Koogan: Rio de Janeiro, 2005.

- LOWENBERGER, C.; CHARLET, M.; VIZIOLI, J.; KAMAL, S.; RICHMAN, A.; CHRISTENSEN, B.M.; BULET, P. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.20092–20097, 1999.
- LUPLERTLOP, N.; SURASOMBATPATTANA, P.; PATRAMOOL, S.; DUMAS, E.; WASINPIYAMONGKOL, L.; *et al.* Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with dengue virus. **PLoS Pathog.**, v.7, n.1, e1001252, 2011.
- MACKENZIE, J.S.; GUBLER, D.J.; PETERSEN, L.R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat. Med.**, v.10, n.12, p.98-109, 2004.
- MADDEN, K., D. CROWNER, *et al.* LOLA has the properties of a master regulator of axon-target interaction for SNb motor axons of *Drosophila*. **Dev. Biol.**, v.213, n.2, p. 301-13, 1999.
- MAGURRAN, A. E. Measuring biological diversity. **Malden, Ma.: Blackwell Pub.**, 2004.
- MALAVIGE, G.N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D.J.; SENEVIRATNE, S.L. Dengue Viral Infections. **Postgrad. Med. J.**, n.80, p.588-601, 2004.
- MARIONI, J.C.; MASON, C.E.; MANE, S.M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. RNA-Seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Res.**, v.18, p.1509-1517, 2008.
- MARTINEZ-TORRES, M. E. **Dengue hemorrágico en crianças**. La Habana: José Martin. p.180, 1990.
- MARTINHO, N. **Mosquito transmissor da Dengue (*Aedes aegypti*)**. Disponível em: <http://imagem.casadasciencias.org/ver_img.php?id=1469>. Acesso em 10 de julho de 2014.
- MATTINGLY, P.E. General aspects of the *Aedes aegypti* problem. In: Taxonomy and Bionomics. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.51, p.392-408, 1957.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C.A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v.296, p.298-300, 2002.
- MEIER-KOLTHOFF, J.P.; AUCH, A.F.; KLENK, H.P.; GO KER, M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. **BMC Bioinformatics**, v.14, n.60, 2013.
- MERKLING, S.H. & VAN RIJ, R.P. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito **J. Insect Physiol.**, v.59, p.159–170, 2012.
- METZKER, M.L.. Sequencing technologies—the next generation. **Nat. Rev. Genet.**, v.11, p.31–46, 2010.
- MILANI, C., HEVIA, A., FORONI, E., DURANTI, S., TURRONI, F., LUGLI, G. A., SANCHEZ, B., MARTÍN, R., GUEIMONDE, M., SINDEREN, D. V., MARGOLLES, A., VENTURA, M. Assessing the Fecal Microbiota:

- An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol. **PLoS ONE**, v.8, n.7, e58739, 2013.
- MOITA, L.F.; WANG-SATTler, R.; MICHEL, K.; ZIMMERMANN, T.; BLANDIN, S.; *et al.* In vivo identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *Anopheles gambiae*. **Immunity**, v.23, p. 65–73, 2005.
- MOLINA-CRUZ, A., GUPTA, L., RICHARDSON, J., BENNETT, K., BLACK IV, W., BARILLAS-MURY, C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.72, n.5, p.631-637, 2005.
- MOLL, R. M., W. S. ROMOSER, M. C. MODRZAKOWSKI, A. C. MONCAYO, AND K. LERDTHUSNEE. Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. **J. Med. Entomol.** v.38, p.29–32, 2001.
- MORAES, C.S.; SEABRA, S.H.; CASTRO, D.P.; BRAZIL, R.P.; DE SOUZA, W.; GARCIA, E.S. & AZAMBUJA, P. *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. **Exp. Parasitol.**, v.118, p.561-568, 2008.
- MOREIRA, L.A; ITURBE-ORMAETXE, I.; JEFFERY, J.A; LU, G.; PYKE, A.T.; HEDGES, L.M.; ROCHA, B. C., *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. **Cell**, v.139, n.7, p.1268–78, 2009.
- MORENS, D.M. & FAUCI, A.S. Dengue and hemorrhagic fever: a potential threat to public health in the United States. **JAMA**, v.299, n.2, p.214-216, 2008.
- MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; AND WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat. Methods**, v.5, n.7, p.621-628, 2008.
- MOURYA, D. & SOMAN, R. Effect of gregarine parasite, *Ascogregarina culicis* & tetracycline on the susceptibility of *Culex bitaeniorhynchus* to JE virus. . **Indian J. Med. Res.**, v.81, p.247–250, 1985.
- MURREL A, DOBSON SJ, YANG X, LACEY E, BARKER SC: A survey of bacterial diversity in ticks, lice and fleas from Australia. **Parasitol. Res.**, v.89, p.326-334, 2003.
- NENE, V.; WORTMAN, J.R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C.; *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v.316, p.1718–23, 2007.
- NEVES, D.P. **Parasitologia Dinâmica**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, p. 485-486, 2009.
- NGWA, C.J.; GLOCKNER, V.; ABDELMOHSEN, U.R.; SCHEUERMAYER, M.; FISCHER, R.; *et al.* 16S rRNA gene-based identification of *Elizabethkingia meningoseptica* (Flavobacteriales: Flavobacteriaceae) as a dominant midgut bacterium of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) with antimicrobial activities. **J. Med. Entomol.**, v.50, p.404–414, 2013.

- NORIEGA, F. G., EDGAR, K. A., GOODMAN, W. G., SHAH, D. K., WELLS, M. A. Neuroendocrine factors affecting the steady-state levels of early trypsin mRNA in *Aedes aegypti*. **J. Insect. Physiol.**, v.47, p.515-522, 2001.
- NORMILE, D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v.342, n.6157, p.415, 2013.
- NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **J. Bacteriol.**, v.178, n.19, p.5636-5643, 1996.
- OBARD, D.J. & DUDAS, G. The genetics of host-virus coevolution in vertebrates. **Curr. Opin. Virol.**, v.8, p.73-78, 2014.
- OOI, E.E.; GO, H.K.T. *et al.* Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n.6, p.887-893, 2006.
- OSEI-POKU, J.; MBOGO, C. M.; PALMER, W. J.; JOGGINS, F. M. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. **Mol. Ecol.**, v.21, p.5138-5150, 2012.
- PADMANABHAN, N. National Institutes of Health (NIH). **NIH-developed candidate dengue vaccine shows promise in early-stage trial.** Disponível em: <<http://www.nih.gov/news/health/jan2013/niad-23.htm>>. Acesso em: Jan. 2014.
- PADUAN, K.S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.P.; RIBOLLA, P.E.M. Genetic and variability in geographical populations of *Aedes aegypti* in Brazil elucidated by molecular markers. **Genet. Mol. Biol.**, v.29, n.2, p.391-395, 2006.
- PADUAN, K.S.; RIBOLLA, P.E.M. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v.45, n.1, p.59-67, 2008.
- PADUAN, K.S. & RIBOLLA, P.E.M. Characterization of eight single nucleotide polymorphism markers in *Aedes aegypti*. **Mol. Ecol. Res.**, v.9, p.114-116, 2009.
- PAN, X.; ZHOU, G.; WU, J.; BIAN, G.; LU, P.; RAIKHEL, A.S.; & XI, Z. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **P.N.A.S.**, v.109, n.1, p. E23-E31, 2012.
- PARADKAR, P.N.; TRINIDAD, L.; VOYSEY, R.; DUCHEMIN, J-B.; WALKER, P.J. Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the JAK-STAT pathway. **P.N.A.S.**, v.109, n.46, p.18915-18920, 2012.
- PIDIYAR, V.J.; JANGID, K.; PATOLE, M.S.; HOUCHE, Y.S. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16S ribosomal RNA gene analysis. **Am. Trop. Med. Hyg.**, v.70, p.597-603, 2004.

- PINHEIRO, F.P. & TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S. Febres hemorrágicas viróticas. Febre hemorrágica do dengue. In: **Tratado de Infectologia** (R. Veronesi & R. Focacia, org.), São Paulo: Editora Atheneu, p.258-263, 1996.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucl. Acids Res.**, v.41, n.D1, p.D590-D596, 2013.
- RAMET, M.; MANFRUELLI, P., *et al.* Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. **Nature**, v.416, n.6881, p.644-8, 2002.
- RAMIREZ, J.L.; SOUZA-NETO, J.; TORRES COSME, R.; ROVIRA, J.; ORTIZ, A.; *et al.* Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.6, n.3, e1561, 2012.
- RANI, A.; SHARMA, A.; RAJAGOPAL, R.; ADAK, T.; BHATNAGAR, R. K. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi* – na Asian malarial vector. **BMC Microbiol.**, v.9, 2009.
- RAPAPORT, F.; KHANIN, R.; LIANG, Y.; PIRUN, M.; KREK, A.; ZUMBO, P.; MASON, C. E.; SOCCI, N. D.; BETEL, D. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. **Genome Biol.**, v.14, 2013.
- RIDAURA, . V.K.; FAITH, J.J.; REY, F.; CHENG, E.J.; DUNCAN, A.E.; KAU, A.L.; GRIFFIN, N.W.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B.; BAIN, J.R.; MUEHLBAUER, M.J.; ILKAYEVA, O.; SEMENKOVICH, C.F.; FUNAI, K.; *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. **Science**, v.341, 2013.
- RIEHLE, M.A. & JACOBS-LORENA, M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.35, p.699–707, 2005.
- RIGAU-PÉREZ, J.G.; VORNDAM, A.V.; CLARK, G.G. The dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.64, n.1, p.67-74, 2001.
- ROCCO, I.M.; KAVAKAMA, B.B.; SANTOS, C.L.S. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.43, n.1, p.55-57, 2001.
- ROSENGAUS, R.B.; ZECHER, C.N.; SCHULTHEIS, K.F.; BRUCKER, R.M.; BORDENSTEIN, S.R. Disruption of the Termite Gut Microbiota and Its Prolonged Consequences for Fitness . **Appl. Environ. Microbiol.**, v.77, n.13, p. 4303-4312, 2011.
- SABCHAREON, A; WALLACE, D.; SIRIVICHAYAKUL, C; *et al.* Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**, v.380, n.9853, p.1559–1567, 2012.

- 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.
- SÁNCHEZ-VARGAS, I.; SCOTT, J.C.; POOLE-SMITH, B.K.; FRANZ, A.W.; BARBOSA-SOLOMIEU, V.; WILUSZ, J.; OLSON, K.E.; BLAIR, C.D. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. **PLoS Pathog.**, v.5, n2, e1000299, 2009.
- SANOFI-AVENTIS. Sanofi-Aventis - Construction of a new vaccine production center in France. <<http://en.sanofi-aventis.com/at-a-glance/news/dengue/dengue.asp>> acessado em 2009.
- SAÚDE AMBIENTAL- Prefeitura Municipal de Botucatu. disponível em: <http://www.botucatu.sp.gov.br>. Acesso em: 04 de agosto de 2014.
- SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; HORN, D.J.V.; WEBER, C.F. Introducing mother: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.75, n.23, p.7537-7541, 2009.
- SCHLOSS, P.D.; GEVERS, D.; WESTCOTT, S.L. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. **PLoS ONE**, v.6, n.12, e27310, 2011.
- SCHMITTGEN, T.D. & LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nat. Protoc.**, v.3, n.6, p.1101-8, 2008.
- SCHNIRRING, L. CIDRAP News. **Researchers identify fifth dengue subtype**. Disponível em: <<http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2013/10/researchers-identify-fifth-dengue-subtype>>. Acesso em: 17 dez 2013.
- SCOTT, T.W. *et al.* Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. **J. Med. Entomol.**, v.30, p.922–927, 1993.
- SCOTT, T.W. *et al.* Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: blood feeding frequency. **J. Med. Entomol.**, v.37, p.89–101, 2000.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVE) – Boletim epidemiológico. **Ministério da Saúde**, v.46, n.8, 2015.
- SESSIONS, O.M.; BARROWS, N.J.; SOUZA-NETO, J.A.; OBINSON, T.J.; HERSHEY, C.L.; RODGERS, M.A.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G.; YANG, P.L.; PEARSON, J.L.; GARCIA-BLANCO, M.A. Discovery of insect and human dengue virus host factors. **Nature**, v.458, n.23, p.1047-1050, 2009.
- SEVERSON, D.W.; BROWN, S.E.; KNUDSON, D.L. Genetic and physical mapping in mosquitoes: molecular approaches. **Annu. Rev. Entomol.**, v.46, p.183–219, 2001.
- SEVERSON, D.W.; KNUDSON, D.L.; SOARES, M.B.; LOFTUS, B.J. *Aedes aegypti* genomics. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.34, n.7, p.715-721, 2004.

- SHAHINAS, D.; SILVERMAN, M.; SITTler, T.; *et al.* Toward an Understanding of Changes in Diversity Associated with Fecal Microbiome Transplantation Based on 16S rRNA Gene Deep Sequencing. **MBio.**, v.3, n.5, e00338-12, 2012.
- SIM, S.; JUPATANAKUL, N.; RAMIREZ, J.L.; KANG, S.; ROMERO-VIVAS, C.M.; *et al.* Transcriptomic Profiling of Diverse *Aedes aegypti* Strains Reveals Increased Basal-level Immune Activation in Dengue Virus-refractory Populations and Identifies Novel Virus-vector Molecular Interactions. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.7, n.7, e2295., 2013.
- SINDEN, R.E. Molecular interactions between *Plasmodium* and its insect vectors. **Cell Microbiol.**, v.4, p.713–724, 2002.
- SLOSEK, J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. **Soc. Sci. Med.**, v.23, n.3, p.249-257, 1986.
- SOARES, T. S., WATANABE, R. M. O., LEMOS, F. J. A., TANAKA, A. S. Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from *Aedes aegypti* larvae and identificatino of digestive enzymes. **Gene**, v.489, p.70-75, 2011.
- SOPER, F.L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.14, n.6, p.887-891, 1965.
- SOUZA-NETO, J.A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **P.N.A.S.**, v.106, p.17841-17846, 2009.
- STACKEBRANDT, E. & EBERS, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. **Microbiol. Today**, v.33, p.152–155, 2006.
- STEINBERG, J.P. & BURD, E.M. (2010) Other gram negative and gram variable bacilli. In Mandell GL, Bennett JE and Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's **Principles and practice of infectious diseases**, 7th edition. United States: Churchill Livingstone.
- STOECK, T.; BEHNKE, A.; CHRISTEN, R.; AMARAL-ZETTLER, L.; RODRIGUEZ-MORA, M.J.; CHISTOSERDOV, A.; ORSI, W.; EDGCOMB, V.P. Massively parallel tag sequencing reveals the complexity of anaerobic marine protistan communities. **BMC Biol.**, v.7, 2009.
- STROSCHEIN-STEVENSON, S.L.; FOLEY, E.; O'FARRELL, P.H.; JOHNSON, A D. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. **PLoS Biol.**, v.4, p.87–99, 2006.
- SUEN, G., SCOTT, J.J., AYLWARD, F.O., ADAMS, S.M., TRINGE, S.G., PINTO-TOMÁS, A.A., *et al.* An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PLoS Genet.**, v.6, e1001129, 2010.

- TARTAR, A.; WHEELER, M.M.; ZHOU, X.; COY, M.R.; BOUCIAS, D.G.; SCHARF, M.E.. Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiont gene expression in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. **Biotechnol. Biofuels**, v.2, 2009.
- TERENIUS, O.; LIDH, J.M.; ERIKSSON-GONZALES, K.; BUSSIÈRE, L.; LAUGEN, A.T.; BERGQUIST, H.; TITANJI, K.; FAYE, I. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.80, p.556-565, 2012.
- THEIN, S.; AUNG, M. M.; SHWE, T. N.; AYE, M.; AUNG, Z.; AYE, K.; AYE, K. M. & AASKOV, J. Risk factors in dengue shock syndrome. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.56, p.566–572, 1997.
- TOMLINSON, S.M.; MALMTROM, R.D; WATOWICH, S.J. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. **Infections Disorders - Drug Targets**, v.9, p.327-343, 2009.
- VALIENTE MORO, C.; TRAN, F. H.; RAHARIMALALA, F. N.; RAVELONANDRO, P.; MAVINGUI, P. Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. **BMC Microbiol.**, v.13, 2013.
- VAN DER SCHAAR, H.M.; RUST, M.J.; CHEN, C.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; WILSCHUT, J.; *et al.* Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells. **PLoS Pathog.**, v.4, n.12, e1000244, 2008.
- VEZZULLI, L., PEZZATI, EL., HUETE-STAUFFER, C., PRUZZO, C., CERRANO, C. 16SrDNA Pyrosequencing of the Mediterranean Gorgonian *Paramuricea clavata* Reveals a Link among Alterations in Bacterial Holobiont Members, Anthropogenic Influence and Disease Outbreaks. **PLoS ONE**, v.8, n.6, e67745, 2013.
- VILLALBA, L.R.L.; ROMOSER, W.S.; PATRICAN, L. Meconial peritrophic matrix and meconial degradation in the biting midge, *Culicoides variipennis* (Coquillett) (Diptera: Ceratopogonidae). **Open Access Insect Physiology**, v.3, 2011.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M. & SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Rev. Genet.**, v.10, p.57–63, 2009.
- WANG, Y.; GILBREATH, T.M. III; KUKUTLA, P.; YAN, G.; XU, J. Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. **Plos One**, v.6, p.1-9, 2011.
- WARNECKE, F.; *et al.* Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, v.450, p.560–565, 2007.
- WEARING, H.J. & ROHANI, P. Ecological and immunological determinants of dengue epidemics. **P.N.A.S.**, v.103, n.31, p.11802-11807, 2006.
- WEISS, B.L.; WANG, J.; AKSOY, S. Tsetse Immune System Maturation Requires the Presence of Obligate Symbionts in Larvae. **PLoS Biol.**, v.9, n.5, e1000619, 2011.

- WIKRAMARATNA, P.S.; SIMMONS, C.P.; GUPTA, S.; RECKER, M. The effects of Tertiary and Quaternary Infections on the Epidemiology of Dengue. **Plos One**, v.5, n.8, e12347, 2010.
- WILDER-SMITH, A. & GUBLER D.J. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Med. Clin. North. Am.**, v.92, n.6, p.1377-1390, 2008.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WOODRING, J.L.; HIGGS, S.; BEATY, B.J. Biology of Disease Vectors. In Marquardt, W.C., Beaty, B.J., editores. Natural cycles of vector-borne pathogens. Colorado: **University Press of Colorado**, p.51–72, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2nd ed. Geneva: WHO; p.84, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2009). "Dengue and dengue haemorrhagic fever." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2013a). "Neglected tropical diseases". http://www.who.int/neglected_diseases/en/.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases**. França, p. 138, 2013b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2014), "Dengue and severe dengue". <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>.
- XI, Z.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathog.**, v.4, e1000098, 2008.
- XIAO X, LIU Y, ZHANG X, WANG J, LI Z, *et al.* Complement-Related Proteins Control the Flavivirus Infection of *Aedes aegypti* by Inducing Antimicrobial Peptides. **PLoS Pathog.**, v.10, n.4, e1004027, 2014.
- YUE, J.C.; CLAYTON, M.K. A similarity measure based on species proportions. Communications in statistics. **Theory and Methods**, v.34, n.11, p.2123-2131, 2005.
- ZOU, Z.; SOUZA-NETO, J.; XI, Z.; KOKOZA, V.; SHIN, S.W.; DIMOPOULOS, G.; RAIKHEL, A. Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* transgenic mosquitoes with altered immunity. **PLoS Pathog.**, v.7, n.11, e1002394, 2011.
- ZOUACHE, K.; RAHARIMALALA, F. N.; RAQUIN, R.; TRAN-VAN, V. RAVELOSON, L. H. R.; RAVELONANDRO, P.; MAVINGUI, P. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes*

albopictus and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.75, p.377-389, 2011.

ANEXOS

Tabelas:

Tabela S1. Genes diferencialmente expressos na comparação das amostras das replicatas biológicas (BTU- (rep.b1) e BTU-(rep.b2)) da população de Botucatu– SP ingurgitada e não infectada.

Gene ID	Nome	Função	Log ₂ Fold
AAEL000302	cysteinech venom protein	DIV	-5.0736
AAEL000363	cysteinech venom protein	DIV	-4.01526
AAEL000556	C-Type Lectin (CTL)	IM	2.327283
AAEL000611	cecropin anti-microbial peptide	IM	2.155222
AAEL000627	cecropin anti-microbial peptide	IM	2.185811
AAEL000681	hypothetical protein	FDD	3.283672
AAEL000726	fibrinogen and fibronectin	IM	2.302621
AAEL000749	conserved hypothetical protein	IM	2.437271
AAEL003053	allergen, putative	DIV	3.040146
AAEL003053	allergen, putative	DIV	2.131993
AAEL003182	Serine Protease Inhibitor (serpin) homologue	IM	2.048496
AAEL003389	attacin anti-microbial peptide	IM	3.172863
AAEL003843	hypothetical protein	IM	4.306963
AAEL003862	histone H2A	RTT	-4.42999
AAEL005098	cysteinech venom protein, putative	DIV	-3.46646
AAEL006485	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	MET	2.016981
AAEL015515	cecropin anti-microbial peptide	IM	2.767985
AAEL017590	Metazoan signal recognition particle RNA	FDD	2.204111

Tabela S2. Genes diferencialmente expressos nos mosquitos BTU+ em relação aos BTU-.

Gene ID	Nome	Função	Log ₂ fold
AAEL010848	conserved hypothetical protein	IM	4.66
AAEL017597	28S_rRNA	DIV	3.83
AAEL017683	28S_rRNA	DIV	3.47
AAEL005759	conserved hypothetical protein	DIV	3.32
AAEL007339	conserved hypothetical protein	DIV	3.31
AAEL015515	cecropin anti-microbial peptide	IM	3.24
AAEL017851	Small nucleolar RNA U3	DIV	3.08
AAEL017590	Metazoan signal recognition particle RNA	DIV	2.72
AAEL000302	cysteinech venom protein, putative	DIV	2.66
AAEL017811	RNase MRP	DIV	2.41
AAEL003841	defensin anti-microbial peptide	IM	2.17
AAEL018349	hypothetical protein	DIV	2.03
AAEL018527	Metazoan signal recognition particle	DIV	1.90
AAEL017380	hypothetical protein	DIV	1.87
AAEL003832	defensin anti-microbial peptide	IM	1.87
AAEL005212	hypothetical protein	FDD	1.56
AAEL002889	hypothetical protein	FDD	1.54
AAEL012927	hypothetical protein	FDD	1.46
AAEL005192	hypothetical protein	FDD	1.44
AAEL000621	cecropin anti-microbial peptide	IM	1.28
AAEL003857	defensin anti-microbial peptide	IM	1.07
AAEL014318	conserved hypothetical protein	FDD	1.05
AAEL011542	metalloproteinase, putative	PROT	-1.44
AAEL007727	hypothetical protein	FDD	-2.12

Tabela S3. Genes diferencialmente expressos nos mosquitos NEO+ em relação aos NEO-.

Gene ID	Nome	Função	Log ₂ fold
AAEL001690	serine-type endopeptidase, putative	PROT	6.30
AAEL002467	conserved hypothetical protein	EC	5.73
AAEL000627	cecropin anti-microbial peptid	IM	5.51
AAEL001392	hypothetical protein	FDD	4.75
AAEL015515	cecropin anti-microbial peptide	IM	4.67
AAEL005332	hypothetical protein	FDD	4.66
AAEL018349	hypothetical protein	DIV	4.56
AAEL008050	hypothetical protein	FDD	4.54
AAEL003841	defensin anti-microbial	IM	4.51
AAEL003857	defensin anti-microbial	IM	4.48
AAEL007344	conserved hypothetical protein	FDD	4.44
AAEL000611	cecropin anti-microbial peptide	IM	4.20
AAEL005641	galactose-specific C-type lectin, putative	IM	4.16
AAEL017380	hypothetical protein	DIV	4.00
AAEL006971	conserved hypothetical protein	FDD	3.90
AAEL008473	cysteinech venom protein, putative	DIV	3.80
AAEL007599	cathepsin b	IM	3.79
AAEL002559	conserved hypothetical protein	DIV	3.72
AAEL012534	hypothetical protein	FDD	3.68
AAEL001965	imaginal disc growth factor	DIV	3.67
AAEL000859	hypothetical protein	DIV	3.64
AAEL005431	clip-domain serine protease, putative	IM	3.63
AAEL003821	hypothetical protein	IM	3.53
AAEL012636	cytochrome b5, putative	R/E/M	3.53

AAEL001897	conserved hypothetical protein	FDD	3.49
AAEL004894	hypothetical protein	FDD	3.44
AAEL003832	defensin anti-microbial peptide	IM	3.43
AAEL000551	hypothetical protein	DIV	3.43
AAEL008757	juvenile hormone esterase	R/E/M	3.27
AAEL002889	hypothetical protein	FDD	3.21
AAEL017973	heat shock protein HSP70	DIV	3.13
AAEL008607	tep3	IM	3.06
AAEL005093	serine protease	IM	3.00
AAEL014349	serine protease	IM	2.95
AAEL014565	hypothetical protein	FDD	2.90
AAEL013284	serine-type endopeptidase, putative	PROT	2.90
AAEL000302	cysteine venom protein, putative	DIV	2.88
AAEL001794	macroglobulin/complement	IM	2.86
AAEL015312	cathepsin b	IM	2.82
AAEL011641	transferrin	IM	2.81
AAEL012853	hypothetical protein	DIV	2.79
AAEL008936	hypothetical protein	FDD	2.78
AAEL007626	gram-negative bacteria binding protein	IM	2.78
AAEL000957	hypothetical protein	DIV	2.75
AAEL012341	lysosomal acid lipase, putative	MET	2.74
AAEL015639	transferrin	IM	2.72
AAEL014382	galactose-specific C-type lectin, putative	IM	2.69
AAEL006576	clip-domain serine protease, putative	IM	2.67
AAEL013984	conserved hypothetical protein	FDD	2.67

Continuação Tabela S3

AAEL017325	Clip-Domain Serine Protease family B	IM	2.67
AAEL008106	hypothetical protein	FDD	2.66
AAEL017345	hypothetical protein	FDD	2.66
AAEL000621	cecropin anti-microbial peptide	IM	2.66
AAEL002848	tubulin beta chain	EC	2.64
AAEL003389	attacin anti-microbial peptide	IM	2.63
AAEL002610	serine protease	IM	2.62
AAEL001667	multicopper oxidase	DIV	2.59
AAEL017023	hypothetical protein	FDD	2.56
AAEL000361	cysteinech venom protein, putative	DIV	2.55
AAEL014914	conserved hypothetical protein	DIV	2.54
AAEL000271	gamma-glutamyl hydrolase, putative	MET	2.53
AAEL006594	serine-type enodpeptidase, putative	DIG	2.52
AAEL000683	conserved hypothetical protein	FDD	2.51
AAEL017334	hypothetical protein	FDD	2.49
AAEL012764	conserved hypothetical protein	DIV	2.49
AAEL002560	conserved hypothetical protein	FDD	2.45
AAEL012856	hypothetical protein	DIV	2.42
AAEL008097	trypsin-eta, putative	DIG	2.42
AAEL009127	cytochrome P450	R/E/M	2.40
AAEL003114	conserved hypothetical protein	FDD	2.37
AAEL005331	hypothetical protein	DIV	2.35
AAEL003816	hypothetical protein	FDD	2.31
AAEL009474	peptidoglycan recognition protein-lc isoform	IM	2.31
AAEL015458	transferrin	IM	2.26
AAEL000032	ribosomal protein S6	RTT	2.25

Continuação Tabela S3

AAEL011727	conserved hypothetical protein	DIV	2.24
AAEL011622	serine protease, putative	IM	2.23
AAEL000948	conserved hypothetical protein	FDD	2.23
AAEL014004	clip-domain serine protease, putative	IM	2.23
AAEL002578	conserved hypothetical protein	TRP	2.20
AAEL004090	conserved hypothetical protein	FDD	2.17
AAEL001098	clip-domain serine protease, putative	IM	2.15
AAEL001818	conserved hypothetical protein	DIV	2.15
AAEL008646	fibrinogen and fibronectin	DIV	2.13
AAEL003434	alpha-amylase	DIG	2.12
AAEL003723	lysozyme P, putative	IM	2.12
AAEL009985	conserved hypothetical protein	FDD	2.12
AAEL005586	transient receptor potential channel 4, putative	TRP	2.11
AAEL009904	conserved hypothetical protein	DIV	2.05
AAEL005772	Odorant-binding protein 99c, putative	RQS	2.04
AAEL009459	hypothetical protein	FDD	2.03
AAEL001964	protein serine/threonine kinase, putative	RQS	2.01
AAEL012571	conserved hypothetical protein	FDD	2.00
AAEL013347	lethal(2)essential for life protein, l2efl	DIV	1.98
AAEL009645	hypothetical protein	DIV	1.98
AAEL017144	hypothetical protein	FDD	1.96
AAEL012702	ATP-binding cassette sub-family A member 3, putative	TRP	1.94
AAEL000037	serine protease	IM	1.93
AAEL003505	jun	DIV	1.92
AAEL010099	4-nitrophenylphosphatase	MET	1.92
AAEL007778	leucinech transmembrane protein	IM	1.91

Continuação Tabela S3

AAEL005432	conserved hypothetical protein	DIV	1.90
AAEL003656	hypothetical protein	FDD	1.89
AAEL002295	leucinech transmembrane protein	IM	1.88
AAEL003645	stearoyl-coa desaturase	DIV	1.84
AAEL002301	serine protease	IM	1.83
AAEL006493	hypothetical protein	FDD	1.82
AAEL018691	rRNA		1.82
AAEL004931	beta-hexosaminidase b	DIV	1.81
AAEL010168	40S ribosomal protein S2	RTT	1.81
AAEL007383	secreted ferritin G subunit precursor, putative	DIV	1.80
AAEL012357	conserved hypothetical protein	FDD	1.78
AAEL012086	hypothetical protein	DIV	1.78
AAEL013223	hypothetical protein	DIV	1.77
AAEL008710	hypothetical protein	DIV	1.77
AAEL003889	gram-negative bacteria binding protein	IM	1.74
AAEL012457	alcohol dehydrogenase	MET	1.73
AAEL000834	dimethylaniline monooxygenase	DIV	1.72
AAEL017514	hypothetical protein	FDD	1.70
AAEL006883	conserved hypothetical protein	RTT	1.67
AAEL002600	serine protease	IM	1.67
AAEL000317	cysteinech venom protein, putative	DIV	1.65
AAEL013623	trypsin	DIG	1.64
AAEL011551	conserved hypothetical protein	FDD	1.56
AAEL001271	conserved hypothetical protein	FDD	1.55
AAEL000363	cysteinech venom protein, putative	DIV	1.55
AAEL008039	conserved hypothetical protein	FDD	1.55

Continuação Tabela S3

AAEL003066	brain chitinase and chia	MET	1.54
AAEL009520	hypothetical protein	DIV	1.53
AAEL017536	holotricin	IM	1.53
AAEL003720	leucinech transmembrane protein	IM	1.52
AAEL006518	cytidine deaminase, putative	DIV	1.49
AAEL017513	hypothetical protein	FDD	1.48
AAEL002130	ecdysone inducible protein L2, putative	DIV	1.48
AAEL011980	hypothetical protein	DIV	1.45
AAEL000074	serine protease	IM	1.45
AAEL013987	conserved hypothetical protein	FDD	1.44
AAEL010867	serine protease	IM	1.43
AAEL003076	glucosyl/glucuronosyl transferases	MET	1.42
AAEL004591	hypothetical protein	FDD	1.42
AAEL005428	conserved hypothetical protein	FDD	1.39
AAEL006096	Gelsolin precursor	DIV	1.38
AAEL006674	clip-domain serine protease, putative	IM	1.37
AAEL005192	hypothetical protein	FDD	1.35
AAEL001471	hypothetical protein	DIV	1.34
AAEL003345	argininosuccinate lyase	DIV	1.32
AAEL003877	ubiquitin	DIV	1.25
AAEL012644	conserved hypothetical protein	EC	1.23
AAEL002280	ctl2	TRP	1.21
AAEL005673	serine protease inhibitor, serpin	IM	1.21
AAEL013047	sphingolipid delta 4 desaturase/c-4 hydroxylase protein des2	MET	1.18
AAEL004067	mitochondrial benzodiazepine receptor, putative	R/E/M	1.17

Continuação Tabela S3

AAEL004498	hypothetical protein	FDD	1.15
AAEL003844	galectin	IM	1.11
AAEL004809	conserved hypothetical protein	FDD	1.11
AAEL000102	conserved hypothetical protein	DIV	1.11
AAEL004278	conserved hypothetical protein	DIV	1.11
AAEL005179	hypothetical protein	FDD	1.11
AAEL002595	serine protease	IM	1.08
AAEL009629	endoU protein, putative	DIV	1.08
AAEL012069	glutathione peroxidase	R/E/M	1.07
AAEL013341	lethal(2)essential for life protein, l2efl	DIV	1.05
AAEL002175	conserved hypothetical protein	DIV	1.04
AAEL010139	serine protease, putative	IM	1.04
AAEL011180	conserved hypothetical protein	FDD	1.01
AAEL013875	tetraspanin, putative	TRP	1.00
AAEL017211	cecropin anti-microbial peptide	IM	-1.01
AAEL003862	histone h2a	RTT	-1.03
AAEL010228	conserved hypothetical protein	FDD	-1.04
AAEL006423	conserved hypothetical protein	DIV	-1.07
AAEL003849	conserved hypothetical protein	IM	-1.08
AAEL006759	hypothetical protein	DIV	-1.08
AAEL013402	hypothetical protein	FDD	-1.10
AAEL014893	cytochrome P450	R/E/M	-1.10
AAEL003596	hypothetical protein	FDD	-1.10
AAEL008330	hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase	MET	-1.11
AAEL003182	SERPIN1 protein precursor, putative	IM	-1.12
AAEL015447	hypothetical protein	DIV	-1.14

Continuação Tabela S3

AAEL007394	conserved hypothetical protein	FDD	-1.15
AAEL015052	conserved hypothetical protein	FDD	-1.15
AAEL007818	trypsin	DIG	-1.23
AAEL004555	hypothetical protein	FDD	-1.27
AAEL010242	conserved hypothetical protein	DIV	-1.33
AAEL011638	cyclic-nucleotide-gated cation channel	TRP	-1.35
AAEL015051	glycoside hydrolases	MET	-1.50
AAEL011542	metalloproteinase, putative	PROT	-1.68
AAEL003053	allergen, putative	DIV	-1.81
AAEL012144	cytochrome P450	R/E/M	-2.73
AAEL010787	DEAD box ATP-dependent RNA helicase	RTT	-3.08

Continuação Tabela S3

Tabela S4. Genes diferencialmente expressos nos mosquitos NEO- em relação aos BTU-.

Gene ID	Nome	Função	Log ₂ fold
AAEL003750	conserved hypothetical protein	DIV	5.74
AAEL013716	conserved hypothetical protein	DIV	5.18
AAEL006759	hypothetical protein	DIV	4.80
AAEL007262	hypothetical protein	DIV	4.66
AAEL013997	guanine nucleotide-binding protein beta 3 (g protein beta3)	DIV	4.41
AAEL008263	conserved hypothetical protein	DIV	4.36
AAEL009885	hypothetical protein	RTT	3.52
AAEL007606	hypothetical protein	FDD	3.41
AAEL002134	conserved hypothetical protein	FDD	3.34
AAEL015379	conserved hypothetical protein	FDD	3.15
AAEL010519	succinate dehydrogenase, putative	TRP	3.02
AAEL011160	predicted protein	FDD	3.00
AAEL018047	hypothetical protein	FDD	2.96
AAEL004555	hypothetical protein	FDD	2.94
AAEL008093	trypsin	DIG	2.82
AAEL007327	cornichon protein, putative	DIV	2.70
AAEL002076	outer mitochondrial translocase subunit, putative	DIV	2.63
AAEL008781	serine-type endopeptidase, putative	DIG	2.43
AAEL008260	hypothetical protein	DIV	2.42
AAEL018702	hypothetical protein	FDD	2.35
AAEL005585	hypothetical protein	DIV	2.28
AAEL008191	predicted protein	DIV	2.22
AAEL009023	conserved hypothetical protein	DIV	2.19
AAEL008894	conserved hypothetical protein	FDD	2.11
AAEL000795	ubiquitin	DIV	2.09

AAEL004134	lupus la ribonucleoprotein	DIV	2.06
AAEL013974	conserved hypothetical protein	DIV	1.99
AAEL011414	high mobility group non-histone protein, putative	MET	1.97
AAEL013899	protease m1 zinc metalloprotease	PROT	1.95
AAEL015051	glycoside hydrolases	MET	1.92
AAEL002365	hypothetical protein	DIV	1.90
AAEL013009	cytochrome c oxidase subunit iv	R/E/M	1.89
AAEL010161	conserved hypothetical protein	FDD	1.87
AAEL007928	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	RTT	1.83
AAEL008266	hypothetical protein	RTT	1.83
AAEL015249	sulfate transporter	TRP	1.79
AAEL009255	hypothetical protein	FDD	1.76
AAEL003053	allergen, putative	DIV	1.75
AAEL017507	hypothetical protein	FDD	1.69
AAEL007870	hypothetical protein	FDD	1.66
AAEL010486	viral IAP-associated factor, putative	TRP	1.61
AAEL003989	GTP-binding protein alpha subunit, gna	DIV	1.58
AAEL010294	membrane-associated guanylate kinase (maguk)	TRP	1.58
AAEL010160	conserved hypothetical protein	FDD	1.52
AAEL015052	conserved hypothetical protein	FDD	1.52
AAEL006408	conserved hypothetical protein	RQS	1.51
AAEL000804	conserved hypothetical protein	FDD	1.43
AAEL004899	hypothetical protein	DIV	1.42
AAEL008330	hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase	MET	1.42
AAEL008276	hypothetical protein	DIV	1.41
AAEL008310	hypothetical protein	DIV	1.40

Continuação Tabela S4

AAEL002495	conserved hypothetical protein	DIV	1.38
AAEL009985	conserved hypothetical protein	FDD	1.37
AAEL006575	troponin C	DIV	1.33
AAEL003734	aconitase, mitochondrial	R/E/M	1.33
AAEL010611	conserved hypothetical protein	DIV	1.32
AAEL003663	hypothetical protein	FDD	1.32
AAEL003404	hypothetical protein	FDD	1.31
AAEL005482	conserved hypothetical protein	IM	1.31
AAEL014924	cytochrome P450	R/E/M	1.26
AAEL013344	lethal(2)essential for life protein, l2efl	DIV	1.24
AAEL006425	trypsin	DIG	1.23
AAEL000348	conserved hypothetical protein	FDD	1.22
AAEL011264	phosphatidylethanolamine-binding protein	DIV	1.19
AAEL005884	conserved hypothetical protein	DIV	1.18
AAEL000294	conserved hypothetical protein	DIV	1.18
AAEL010016	hypothetical protein	FDD	1.17
AAEL014748	DNA repair protein rad50	RTT	1.17
AAEL012339	cdk1	DIV	1.16
AAEL012200	protein kinase C inhibitor, putative	DIV	1.15
AAEL012026	translation initiation factor 5C, putative	RTT	1.14
AAEL002737	cytochrome c oxidase, subunit VIIC, putative	R/E/M	1.10
AAEL005958	oxidoreductase	R/E/M	1.10
AAEL011999	histone H4	RTT	1.09
AAEL010174	conserved hypothetical protein	FDD	1.08
AAEL013402	hypothetical protein	FDD	1.07
AAEL014516	metalloproteinase, putative	PROT	1.07

Continuação Tabela S4

AAEL013703	trypsin	DIG	1.06
AAEL006000	conserved hypothetical protein	FDD	1.06
AAEL007549	phosphatidylethanolamine-binding protein	DIV	1.05
AAEL012976	hypothetical protein	DIV	1.04
AAEL006575	troponin C	DIV	1.04
AAEL017211	cecropin anti-microbial peptide	IM	1.04
AAEL001767	conserved hypothetical protein	FDD	1.03
AAEL006053	conserved hypothetical protein	FDD	1.00
AAEL000068	ribosomal protein S25, putative	RTT	-1.04
AAEL003203	fatty acid desaturase, putative	MET	-1.04
AAEL014816	hypothetical protein	FDD	-1.05
AAEL005721	conserved hypothetical protein	DIV	-1.07
AAEL005331	hypothetical protein	DIV	-1.08
AAEL009151	30S ribosomal protein S8	RTT	-1.08
AAEL003832	defensin anti-microbial peptide	IM	-1.09
AAEL002036	hypothetical protein	FDD	-1.10
AAEL001420	conserved hypothetical protein	DIV	-1.10
AAEL001748	hypothetical protein	DIV	-1.16
AAEL013596	phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit	DIV	-1.17
AAEL013641	conserved hypothetical protein	FDD	-1.21
AAEL010873	hypothetical protein	DIV	-1.21
AAEL012154	2,3-cyclic-nucleotide 2-phosphodiesterase	RTT	-1.23
AAEL014188	serine-type endopeptidase, putative	DIG	-1.24
AAEL001964	protein serine/threonine kinase, putative	RQS	-1.26
AAEL004401	peroxinectin	IM	-1.27
AAEL000516	Juvenile hormone-inducible protein, putative	DIV	-1.28

Continuação Tabela S4

AAEL014001	yellow protein precursor, putative	DIV	-1.29
AAEL014489	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	DIV	-1.29
AAEL009617	67 kDa polymerase-associated factor PAF67, putative	DIV	-1.29
AAEL014292	40S ribosomal protein S24	RTT	-1.29
AAEL004547	conserved hypothetical protein	DIV	-1.30
AAEL014693	conserved hypothetical protein	FDD	-1.32
AAEL007842	conserved hypothetical protein	DIV	-1.36
AAEL005772	Odorant-binding protein 99c, putative	RQS	-1.39
AAEL017119	hypothetical protein	FDD	-1.40
AAEL007383	secreted ferritin G subunit precursor, putative	DIV	-1.40
AAEL000046	conserved hypothetical protein	FDD	-1.42
AAEL012666	phosphatidylethanolamine-binding protein	DIV	-1.45
AAEL002889	hypothetical protein	FDD	-1.46
AAEL001852	conserved hypothetical protein	DIV	-1.46
AAEL008096	mitochondrial ornithine transporter	R/E/M	-1.49
AAEL008829	conserved hypothetical protein	DIV	-1.51
AAEL014607	cytochrome P450	R/E/M	-1.51
AAEL002497	hypothetical protein	FDD	-1.53
AAEL003864	conserved hypothetical protein	FDD	-1.55
AAEL012856	hypothetical protein	DIV	-1.57
AAEL007669	oxidoreductase	R/E/M	-1.59
AAEL000804	conserved hypothetical protein	FDD	-1.62
AAEL012348	splicing factor 3a	RTT	-1.62
AAEL005577	conserved hypothetical protein	DIV	-1.63
AAEL013827	hypothetical protein	DIV	-1.65
AAEL014609	cytochrome P450	R/E/M	-1.67

Continuação Tabela S4

AAEL011075	hypothetical protein	FDD	-1.71
AAEL009459	hypothetical protein	FDD	-1.71
AAEL004498	hypothetical protein	FDD	-1.73
AAEL002993	39S ribosomal protein L43	RTT	-1.75
AAEL003004	hypothetical protein	DIV	-1.78
AAEL007133	conserved hypothetical protein	FDD	-1.79
AAEL009454	conserved hypothetical protein	DIV	-1.80
AAEL011773	calreticulin	DIV	-1.82
AAEL009949	homeotic antennapedia protein, putative	RTT	-1.84
AAEL004101	hypothetical protein	DIV	-1.90
AAEL011119	hypothetical protein	FDD	-1.93
AAEL000961	conserved hypothetical protein	DIV	-1.95
AAEL007182	hypothetical protein	DIV	-1.98
AAEL001667	multicopper oxidase	DIV	-1.99
AAEL004805	potassium-dependent sodium-calcium exchanger, putative	TRP	-2.03
AAEL009401	conserved hypothetical protein	FDD	-2.08
AAEL012644	conserved hypothetical protein	EC	-2.17
AAEL013623	trypsin	DIG	-2.17
AAEL017334	hypothetical protein	FDD	-2.20
AAEL013783	protein farnesyltransferase alpha subunit	DIV	-2.21
AAEL009436	conserved hypothetical protein	IM	-2.33
AAEL002917	conserved hypothetical protein	DIV	-2.34
AAEL000032	ribosomal protein S6	RTT	-2.37
AAEL003763	cytochrome P450	R/E/M	-2.39
AAEL001828	hypothetical protein	FDD	-2.39
AAEL014045	allantoicase	DIV	-2.45

Continuação Tabela S4

AAEL012457	alcohol dehydrogenase	MET	-2.48
AAEL003787	conserved hypothetical protein	DIV	-2.52
AAEL014664	AMP dependent coa ligase	MET	-2.57
AAEL013944	hypothetical protein	FDD	-2.57
AAEL007703	conserved hypothetical protein	FDD	-2.57
AAEL014215	nicotinate phosphoribosyltransferase	MET	-2.68
AAEL012694	Juvenile hormone-inducible protein, putative	DIV	-2.76
AAEL012138	24-dehydrocholesterol reductase	R/E/M	-2.89
AAEL014374	hypothetical protein	PROT	-2.92
AAEL003443	threonine dehydrogenase	DIV	-2.94
AAEL013064	tubulin gamma chain	EC	-3.05
AAEL014617	cytochrome P450	R/E/M	-3.19
AAEL010751	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	MET	-3.20
AAEL017268	hypothetical protein	FDD	-3.35
AAEL015285	conserved hypothetical protein	FDD	-3.37
AAEL017358	hypothetical protein	FDD	-3.43
AAEL013946	conserved hypothetical protein	DIV	-3.50
AAEL012534	hypothetical protein	FDD	-3.58
AAEL000183	hypothetical protein	FDD	-3.71
AAEL014813	viral IAP-associated factor, putative	TRP	-3.75
AAEL002612	hypothetical protein	R/E/M	-3.76
AAEL014755	tep2	IM	-4.27

Continuação Tabela S4

Tabela S5. Genes diferencialmente expressos nos mosquitos NEO+ em relação aos BTU+.

Gene ID	Nome	Função	Log ₂ fold
AAEL001690	serine-type endopeptidase, putative	PROT	8.65
AAEL007262	hypothetical protein	DIV	5.15
AAEL013350	heat shock protein 26kD, putative	R/E/M	4.80
AAEL003750	conserved hypothetical protein	DIV	4.20
AAEL002076	outer mitochondrial translocase subunit, putative	DIV	4.07
AAEL008263	conserved hypothetical protein	DIV	4.03
AAEL002467	conserved hypothetical protein	EC	3.82
AAEL000683	conserved hypothetical protein	FDD	3.81
AAEL000627	cecropin anti-microbial peptide	IM	3.79
AAEL013438	LIM domain-binding protein 3, putative	DIV	3.78
AAEL003862	histone h2a	RTT	3.76
AAEL015312	cathepsin b	IM	3.73
AAEL009985	conserved hypothetical protein	FDD	3.72
AAEL005432	conserved hypothetical protein	DIV	3.68
AAEL013974	conserved hypothetical protein	DIV	3.65
AAEL009023	conserved hypothetical protein	DIV	3.64
AAEL014561	conserved hypothetical protein	DIV	3.60
AAEL000859	hypothetical protein	DIV	3.54
AAEL006759	hypothetical protein	DIV	3.48
AAEL015379	conserved hypothetical protein	FDD	3.43
AAEL008607	tep3	IM	3.33
AAEL003857	conserved hypothetical protein	IM	3.30
AAEL003843	hypothetical protein	IM	3.19
AAEL008781	serine-type endopeptidase, putative	DIG	3.18

AAEL007344	conserved hypothetical protein	FDD	3.17
AAEL003821	hypothetical protein	IM	3.16
AAEL011641	transferrin	IM	3.12
AAEL001965	imaginal disc growth factor	DIV	3.09
AAEL013716	conserved hypothetical protein	DIV	3.06
AAEL013347	lethal(2)essential for life protein, l2efl	DIV	3.03
AAEL013284	serine-type endopeptidase, putative	PROT	2.97
AAEL017973	heat shock protein	DIV	2.95
AAEL006576	clip-domain serine protease, putative	IM	2.95
AAEL012636	cytochrome b5, putative	R/E/M	2.92
AAEL005332	hypothetical protein	FDD	2.91
AAEL000551	hypothetical protein	DIV	2.87
AAEL015616	conserved hypothetical protein	FDD	2.86
AAEL012357	conserved hypothetical protein	FDD	2.85
AAEL002560	conserved hypothetical protein	FDD	2.80
AAEL017325	Clip-Domain Serine Protease	IM	2.77
AAEL013984	conserved hypothetical protein	FDD	2.76
AAEL010294	membrane-associated guanylate kinase (maguk)	TRP	2.76
AAEL005536	tetraspanin 29fb	DIV	2.73
AAEL008473	cysteine venom protein, putative	DIV	2.69
AAEL000957	hypothetical protein	DIV	2.67
AAEL009844	conserved hypothetical protein	FDD	2.64
AAEL002848	tubulin beta chain	EC	2.64
AAEL008050	hypothetical protein	FDD	2.61
AAEL001897	conserved hypothetical protein	FDD	2.59
AAEL003434	alpha-amylase	DIG	2.59

Continuação Tabela S5

AAEL006585	predicted protein	FDD	2.58
AAEL015601	tryptophanyl-tRNA synthetase	MET	2.57
AAEL015639	transferrin	IM	2.50
AAEL008106	hypothetical protein	FDD	2.50
AAEL013401	kinesin heavy chain	EC	2.49
AAEL017345	hypothetical protein	FDD	2.46
AAEL003873	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	MET	2.46
AAEL009904	conserved hypothetical protein	DIV	2.45
AAEL014891	cytochrome P450	R/E/M	2.45
AAEL003914	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase membrane-associated guanylate kinase (cask)	DIV	2.43
AAEL005093	serine protease	IM	2.40
AAEL013009	cytochrome c oxidase subunit iv	R/E/M	2.39
AAEL011067	tubulin-specific chaperone, putative	EC	2.39
AAEL011980	hypothetical protein	DIV	2.38
AAEL004591	hypothetical protein	FDD	2.38
AAEL007727	hypothetical protein	FDD	2.36
AAEL015012	hypothetical protein	FDD	2.35
AAEL014608	cytochrome P450	R/E/M	2.34
AAEL000948	conserved hypothetical protein	FDD	2.33
AAEL005586	transient receptor potential channel 4, putative	TRP	2.32
AAEL001953	conserved hypothetical protein	FDD	2.32
AAEL007626	gram-negative bacteria binding protein	IM	2.26
AAEL010161	conserved hypothetical protein	FDD	2.24
AAEL003986	conserved hypothetical protein	DIV	2.22
AAEL003889	gram-negative bacteria binding protein	IM	2.20

Continuação Tabela S5

AAEL013027	conserved hypothetical protein	FDD	2.17
AAEL007606	hypothetical protein	FDD	2.17
AAEL005482	conserved hypothetical protein	IM	2.17
AAEL000037	serine protease	IM	2.16
AAEL002134	conserved hypothetical protein	FDD	2.15
AAEL006096	Gelsolin precursor	DIV	2.14
AAEL002578	conserved hypothetical protein	TRP	2.13
AAEL009885	hypothetical protein	RTT	2.13
AAEL008936	hypothetical protein	FDD	2.10
AAEL005293	galectin	IM	2.10
AAEL018691	rRNA	DIV	2.10
AAEL017513	hypothetical protein	FDD	2.09
AAEL003656	hypothetical protein	FDD	2.09
AAEL008093	trypsin	DIG	2.06
AAEL012702	ATP-binding cassette sub-family A member 3, putative	TRP	2.06
AAEL001927	hypothetical protein	FDD	2.05
AAEL012098	synaptic vesicle protein	DIV	2.01
AAEL003114	conserved hypothetical protein	FDD	1.99
AAEL012995	enhancer of zeste, ezh	MET	1.98
AAEL015244	splicing factor 3a	RTT	1.96
AAEL008260	hypothetical protein	DIV	1.96
AAEL014565	hypothetical protein	FDD	1.95
AAEL017380	hypothetical protein	DIV	1.94
AAEL003066	brain chitinase and chia	MET	1.94
AAEL001082	conserved hypothetical protein	FDD	1.94
AAEL005179	hypothetical protein	FDD	1.93

Continuação Tabela S5

AAEL005431	clip-domain serine protease, putative	IM	1.93
AAEL010099	4-nitrophenylphosphatase	MET	1.92
AAEL013899	protease m1 zinc metalloprotease	PROT	1.92
AAEL011999	histone H4	RTT	1.88
AAEL018047	hypothetical protein	FDD	1.87
AAEL002737	cytochrome c oxidase, subunit VIIC, putative	R/E/M	1.87
AAEL006493	hypothetical protein	FDD	1.85
AAEL011551	conserved hypothetical protein	FDD	1.85
AAEL000361	cysteinech venom protein, putative	DIV	1.85
AAEL000392	alpha-amylase	DIG	1.82
AAEL004090	conserved hypothetical protein	FDD	1.82
AAEL010180	conserved hypothetical protein	FDD	1.82
AAEL003816	hypothetical protein	FDD	1.82
AAEL002295	leucinech transmembrane protein	IM	1.81
AAEL005656	myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle	EC	1.81
AAEL000834	dimethylaniline monooxygenase	DIV	1.80
AAEL008757	juvenile hormone esterase	R/E/M	1.79
AAEL008884	hypothetical protein	FDD	1.78
AAEL004249	conserved hypothetical protein	FDD	1.78
AAEL006674	clip-domain serine protease, putative	IM	1.78
AAEL008266	hypothetical protein	RTT	1.77
AAEL007728	hypothetical protein	R/E/M	1.76
AAEL017144	hypothetical protein	FDD	1.76
AAEL000102	conserved hypothetical protein	DIV	1.75
AAEL012856	hypothetical protein	DIV	1.75
AAEL010174	conserved hypothetical protein	FDD	1.75

Continuação Tabela S5

AAEL002495	conserved hypothetical protein	DIV	1.75
AAEL010160	conserved hypothetical protein	FDD	1.74
AAEL013223	hypothetical protein	DIV	1.74
AAEL008646	fibrinogen and fibronectin	DIV	1.74
AAEL014004	clip-domain serine protease, putative	IM	1.73
AAEL017507	hypothetical protein	FDD	1.73
AAEL000795	ubiquitin	DIV	1.69
AAEL010164	conserved hypothetical protein	FDD	1.68
AAEL001794	macroglobulin/complement	IM	1.67
AAEL005673	serine protease inhibitor, serpin	IM	1.67
AAEL003877	ubiquitin	DIV	1.66
AAEL006000	conserved hypothetical protein	FDD	1.65
AAEL004051	hypothetical protein	DIV	1.64
AAEL014914	conserved hypothetical protein	DIV	1.64
AAEL014349	serine protease	IM	1.63
AAEL005641	galactose-specific C-type lectin, putative	IM	1.63
AAEL004382	conserved hypothetical protein	DIV	1.63
AAEL012099	protease m1 zinc metalloprotease	PROT	1.62
AAEL001928	actin	EC	1.62
AAEL012207	myosin light chain 1, putative	EC	1.61
AAEL006971	conserved hypothetical protein	FDD	1.60
AAEL001098	clip-domain serine protease, putative	IM	1.60
AAEL001390	conserved hypothetical protein	DIV	1.59
AAEL002600	serine protease	IM	1.59
AAEL001091	malic enzyme	DIV	1.58
AAEL002610	serine protease	IM	1.58

Continuação Tabela S5

AAEL001490	acylphosphatase, putative	DIV	1.58
AAEL010884	adp,atp carrier protein	TRP	1.55
AAEL007408	conserved hypothetical protein	DIV	1.53
AAEL009645	hypothetical protein	DIV	1.53
AAEL002886	thioredoxin reductase	R/E/M	1.53
AAEL003734	aconitase, mitochondrial	R/E/M	1.52
AAEL004931	beta-hexosaminidase b	DIV	1.51
AAEL003663	hypothetical protein	FDD	1.50
AAEL005667	LIM domain-binding protein, putative	DIV	1.50
AAEL000726	fibrinogen and fibronectin	IM	1.50
AAEL010611	conserved hypothetical protein	DIV	1.47
AAEL002776	conserved hypothetical protein	FDD	1.47
AAEL003934	conserved hypothetical protein	FDD	1.46
AAEL001392	hypothetical protein	FDD	1.46
AAEL003720	leucinech transmembrane protein	IM	1.46
AAEL012900	conserved hypothetical protein	FDD	1.45
AAEL002764	dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase	DIV	1.43
AAEL008801	conserved hypothetical protein	FDD	1.43
AAEL013146	mfs transporter	TRP	1.42
AAEL013613	pyruvate dehydrogenase	DIV	1.42
AAEL018349	hypothetical protein	DIV	1.41
AAEL008039	conserved hypothetical protein	FDD	1.40
AAEL001429	amino acid transporter	TRP	1.39
AAEL003505	jun	DIV	1.39
AAEL008844	calcium-binding protein, putative	DIV	1.39

Continuação Tabela S5

AAEL011741	glutathione s-transferase	R/E/M	1.38
AAEL006883	conserved hypothetical protein	RTT	1.38
AAEL001864	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein (4EBP)	RTT	1.38
AAEL011588	conserved hypothetical protein	FDD	1.38
AAEL012311	vitellogenin, putative	MET	1.38
AAEL012571	conserved hypothetical protein	FDD	1.36
AAEL015458	transferrin	IM	1.36
AAEL008710	hypothetical protein	DIV	1.35
AAEL000271	gamma-glutamyl hydrolase, putative	MET	1.34
AAEL004120	Niemann-Pick Type C-2, putative	IM	1.34
AAEL001998	conserved hypothetical protein	FDD	1.33
AAEL015076	conserved hypothetical protein	DIV	1.32
AAEL011884	hypothetical protein	FDD	1.31
AAEL010867	serine protease	IM	1.29
AAEL007371	hypothetical protein	FDD	1.29
AAEL011414	high mobility group non-histone protein, putative	MET	1.29
AAEL003593	hypothetical protein	RQS	1.29
AAEL005331	hypothetical protein	DIV	1.28
AAEL017514	hypothetical protein	FDD	1.28
AAEL005772	Odorant-binding protein 99c, putative	RQS	1.27
AAEL001271	conserved hypothetical protein	FDD	1.27
AAEL014382	galactose-specific C-type lectin, putative	IM	1.27
AAEL012086	hypothetical protein	DIV	1.26
AAEL000302	cysteinech venom protein, putative	DIV	1.25
AAEL013341	lethal(2)essential for life protein, l2efl	DIV	1.25

Continuação Tabela S5

AAEL008485	conserved hypothetical protein	FDD	1.24
AAEL001134	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	DIV	1.23
AAEL006719	alpha-amylase	DIG	1.23
AAEL007778	leucinech transmembrane protein	IM	1.22
AAEL009910	conserved hypothetical protein	DIV	1.22
AAEL010850	troponin i	DIV	1.22
AAEL015524	3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	MET	1.22
AAEL006575	troponin C	DIV	1.21
AAEL006575	troponin C	DIV	1.21
AAEL005766	fructose-bisphosphate aldolase	DIV	1.20
AAEL013628	trypsin-eta, putative	DIG	1.19
AAEL012552	NADH-ubiquinone oxidoreductase	R/E/M	1.19
AAEL013458	glutamine synthetase 1, 2 (glutamate-amonia ligase) (gs)	MET	1.19
AAEL002283	hypothetical protein	DIV	1.19
AAEL010183	conserved hypothetical protein	FDD	1.19
AAEL002263	conserved hypothetical protein	FDD	1.18
AAEL006053	conserved hypothetical protein	FDD	1.18
AAEL005153	hypothetical protein	FDD	1.16
AAEL004555	hypothetical protein	FDD	1.15
AAEL006485	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	MET	1.15
AAEL008454	conserved hypothetical protein	DIV	1.14
AAEL009629	endoU protein, putative	DIV	1.12
AAEL017179	hypothetical protein	FDD	1.11
AAEL006721	2-oxoglutarate dehydrogenase	R/E/M	1.09
AAEL003645	stearoyl-coa desaturase	DIV	1.09
AAEL008887	cytochrome c oxidase,-subunit VIb, putative	R/E/M	1.09

Continuação Tabela S5

AAEL009520	hypothetical protein	DIV	1.09
AAEL014516	metalloproteinase, putative	PROT	1.09
AAEL010479	sugar transporter	TRP	1.08
AAEL007681	NADH-ubiquinone oxidoreductase flavoprotein 1 (ndufv1)	R/E/M	1.07
AAEL011184	mitochondrial phosphate carrier protein	R/E/M	1.07
AAEL009081	conserved hypothetical protein	FDD	1.06
AAEL011180	conserved hypothetical protein	FDD	1.06
AAEL001964	protein serine/threonine kinase, putative	RQS	1.06
AAEL004060	conserved hypothetical protein	R/E/M	1.05
AAEL004278	conserved hypothetical protein	DIV	1.05
AAEL002130	ecdysone inducible protein L2, putative	DIV	1.05
AAEL008274	conserved hypothetical protein	FDD	1.05
AAEL011197	actin	EC	1.03
AAEL002813	coupling factor, putative	R/E/M	1.03
AAEL009670	lysozyme P, putative	IM	1.03
AAEL013875	tetraspanin, putative	TRP	1.03
AAEL002280	ctl2	TRP	1.01
AAEL014932	transcription factor btf3	RTT	1.00
AAEL002381	conserved hypothetical protein	DIV	-1.04
AAEL012457	alcohol dehydrogenase	MET	-1.06
AAEL011532	hypothetical protein	FDD	-1.06
AAEL012154	2,3-cyclic-nucleotide 2-phosphodiesterase	RTT	-1.08
AAEL007939	conserved hypothetical protein	DIV	-1.08
AAEL005307	aminoacyl-tRNA synthetase auxiliary protein, 43kD, putative	RTT	-1.11
AAEL005849	synaptic vesicle protein	DIV	-1.11
AAEL002993	39S ribosomal protein L43	RTT	-1.12

Continuação Tabela S5

AAEL014292	40S ribosomal protein S24	RTT	-1.15
AAEL009882	retinoblastoma-binding protein 4 (rbbp4)	R/E/M	-1.16
AAEL005129	40S ribosomal protein S30	RTT	-1.20
AAEL013641	conserved hypothetical protein	FDD	-1.20
AAEL017302	hypothetical protein	FDD	-1.21
AAEL009227	kinesin heavy chain	EC	-1.22
AAEL017320	hypothetical protein	FDD	-1.24
AAEL011686	starch branching enzyme ii	MET	-1.26
AAEL003004	hypothetical protein	DIV	-1.28
AAEL014001	yellow protein precursor, putative	DIV	-1.34
AAEL011773	calreticulin	DIV	-1.34
AAEL001852	conserved hypothetical protein	DIV	-1.37
AAEL014693	conserved hypothetical protein	FDD	-1.39
AAEL012666	phosphatidylethanolamine-binding protein	DIV	-1.44
AAEL004805	potassium-dependent sodium-calcium exchanger, putative	TRP	-1.46
AAEL000823	ribosomal protein L35A, putative	RTT	-1.49
AAEL008139	conserved hypothetical protein	FDD	-1.50
AAEL013581	valacyclovir hydrolase	MET	-1.50
AAEL001442	map-kinase activating death domain protein (madd)/denn/aex-3(c.elegans)	DIV	-1.50
AAEL014366	conserved hypothetical protein	FDD	-1.50
AAEL011136	arsenical pump-driving atpase	TRP	-1.52
AAEL005956	Caspase-3 precursor	IM	-1.55
AAEL010146	3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	MET	-1.56
AAEL005577	conserved hypothetical protein	DIV	-1.58
AAEL011119	hypothetical protein	FDD	-1.58

Continuação Tabela S5

AAEL002497	hypothetical protein	FDD	-1.60
AAEL015450	ribonuclease UK114, putative	RTT	-1.67
AAEL011535	wdpeat protein	DIV	-1.68
AAEL007703	conserved hypothetical protein	FDD	-1.78
AAEL000804	conserved hypothetical protein	FDD	-1.92
AAEL000804	conserved hypothetical protein	FDD	-1.92
AAEL008049	hypothetical protein	DIV	-1.97
AAEL009131	cytochrome P450	R/E/M	-2.00
AAEL012348	splicing factor 3a	RTT	-2.02
AAEL014893	cytochrome P450	R/E/M	-2.13
AAEL017811	RNase MRP	DIV	-2.13
AAEL007669	oxidoreductase	R/E/M	-2.27
AAEL011075	hypothetical protein	FDD	-2.30
AAEL003389	attacin anti-microbial peptide	IM	-2.37
AAEL018527	Metazoan signal recognition particle RNA	DIV	-2.37
AAEL012927	hypothetical protein	FDD	-2.40
AAEL009046	hypothetical protein	FDD	-2.45
AAEL008798	conserved hypothetical protein	DIV	-2.45
AAEL000183	hypothetical protein	FDD	-2.46
AAEL009124	cytochrome P450	R/E/M	-2.47
AAEL006048	interleukin enhancer binding factor	DIV	-2.67
AAEL017851	Small nucleolar RNA U3	DIV	-2.70
AAEL007339	conserved hypothetical protein	DIV	-2.71
AAEL011491	Odorant-binding protein 50d, putative	RQS	-2.77
AAEL012650	conserved hypothetical protein	EC	-2.82
AAEL011297	hypothetical protein	FDD	-2.83

Continuação Tabela S5

AAEL014813	viral IAP-associated factor, putative	TRP	-2.87
AAEL014755	tep2	IM	-3.07
AAEL009949	homeotic antennapedia protein, putative	RTT	-3.14
AAEL013064	tubulin gamma chain	EC	-3.14
AAEL014607	cytochrome P450	R/E/M	-3.15
AAEL014609	cytochrome P450	R/E/M	-3.18
AAEL014617	cytochrome P450	R/E/M	-3.21
AAEL000364	glycine cleavage system h protein	MET	-3.24
AAEL006328	conserved hypothetical protein	EC	-3.25
AAEL014616	cytochrome P450	R/E/M	-3.29
AAEL017268	hypothetical protein	FDD	-3.32
AAEL015005	hypothetical protein	DIV	-3.33
AAEL014374	hypothetical protein	PROT	-3.36
AAEL017678	hypothetical protein	FDD	-3.54
AAEL017778	U4 spliceosomal RNA	FDD	-3.56
AAEL006393	odorant binding protein OBP28	RQS	-3.62
AAEL006398	odorant binding protein OBP32	RQS	-3.72
AAEL005606	conserved hypothetical protein	FDD	-3.79
AAEL005508	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kda subunit	R/E/M	-3.83
AAEL008799	hypothetical protein	FDD	-3.87
AAEL017597	28S_rRN	DIV	-3.93
AAEL001054	glutathione-s-transferase theta, gst	R/E/M	-4.22
AAEL017590	Metazoan signal recognition particle RNA	DIV	-4.26
AAEL017683	28S_rRN	DIV	-4.33
AAEL015285	conserved hypothetical protein	FDD	-4.40
AAEL004130	conserved hypothetical protein	DIV	-4.44

Continuação Tabela S5

AAEL010872	conserved hypothetical protein	RQS	-4.44
AAEL006396	conserved hypothetical protein	RQS	-4.57
AAEL010848	conserved hypothetical protein	IM	-4.57
AAEL006385	conserved hypothetical protein	RQS	-4.93
AAEL003511	conserved hypothetical protein	RQS	-5.22
AAEL013129	salivary gland secretion, putative	DIV	-5.22
AAEL007552	hypothetical protein	FDD	-5.36
AAEL007096	conserved hypothetical protein	IM	-5.36
AAEL017197	hypothetical protein	FDD	-5.49
AAEL017502	hypothetical protein	FDD	-7.66
AAEL017231	hypothetical protein	FDD	-7.85

Continuação Tabela S5

Tabela S6. Genes co-regulados pelos mosquitos de BTU e NEO infectados com o DENV4.

Gene ID	Nome	Função	<i>Log₂fold</i>	
			BTU+	NEO+
AAEL015515	cecropin anti-microbial peptide	IM	3.24	4.67
AAEL018349	hypothetical protein	DIV	2.03	4.56
AAEL003841	defensin anti-microbial peptide	IM	2.17	4.51
AAEL003857	defensin anti-microbial peptide	IM	1.07	4.48
AAEL017380	hypothetical protein	DIV	1.87	4.00
AAEL003832	defensin anti-microbial peptide	IM	1.87	3.43
AAEL002889	hypothetical protein	FDD	1.54	3.21
AAEL000302	cysteinech venom protein, putative	DIV	2.66	2.88
AAEL000621	antibacterial peptide, putative	IM	1.28	2.66
AAEL005192	hypothetical protein	FDD	1.44	1.35
AAEL011542	metalloproteinase, putative	PROT	-1.44	-1.68

Tabela 7. Genes sob controle transcricional da via Toll modulados pelo DENV4 nos mosquitos de NEO.

GENE ID	Nome	Função	Log ₂ fold	
			NEO+	CAC
AAEL000074	serine protease	IM	1.50	1.26
AAEL000271	gamma-glutamyl hydrolase, putative	MET	2.53	0.89
AAEL000859	LSD1 subclass family protein	DIV	3.64	-1.91
AAEL001794	macroglobulin/complement	IM	2.86	1.52
AAEL002301	serine protease	IM	1.83	0.93
AAEL002595	serine protease	IM	1.08	1.62
AAEL002889	hypothetical protein	FDD	3.21	-0.08
AAEL003723	lysozyme P, putative	IM	2.12	0.03
AAEL003832	defensin anti-microbial peptide	IM	3.43	0.95
AAEL003841	defensin anti-microbial peptide	IM	4.51	0.97
AAEL003857	defensin anti-microbial peptide	IM	4.48	1
AAEL003862	histone h2a	R/T/T	-1.03	-1.59
AAEL003889	gram-negative bacteria binding protein	IM	1.74	1.12
AAEL004591	hypothetical protein	FDD	1.42	1.08
AAEL005093	serine protease	IM	3.00	1.12
AAEL005431	clip-domain serine protease, putative	IM	3.63	0.9
AAEL005641	galactose-specific C-type lectin, putative	IM	4.16	2.28
AAEL006594	serine-type endopeptidase, putative	DIG	2.52	-1.05
AAEL007626	gram-negative bacteria binding protein	IM	2.78	0.95
AAEL008050	hypothetical protein	FDD	4.54	2.33
AAEL008607	tep3	IM	3.06	1.4
AAEL008757	juvenile hormone esterase	R/E/M	3.27	1.91
AAEL009474	peptidoglycan recognition protein-lc isoform	IM	2.31	0.94
AAEL009985	conserved hypothetical protein	FDD	2.12	-1.41
AAEL010139	serine protease, putative	IM	1.04	1.5
AAEL013623	trypsin	DIG	1.64	-1.37
AAEL014349	serine protease	IM	2.95	1.7
AAEL014382	galactose-specific C-type lectin, putative	IM	2.69	1.76
AAEL015515	antibacterial peptide, putative	IM	4.67	1.39

Tabela S8. OTUs mais representativas (50) e suas respectivas composições percentuais.

OTU	Percentagem de classificação das sequências
Otu00001	Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);Flavobacteria(100);"Flavobacteriales"(100);Flavobacteriaceae(100);Elizabethkingia(100);
Otu00003	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Xanthomonadaceae(100);Stenotrophomonas(100);
Otu00005	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(97);
Otu00004	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(74);
Otu00002	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);Asaia(100);
Otu00006	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);"Enterobacteriales"(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(90);
Otu00007	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);"Enterobacteriales"(100);Enterobacteriaceae(100);Pantoea(54);
Otu00008	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(98);Delftia(74);
Otu00009	Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);Flavobacteria(100);"Flavobacteriales"(100);Flavobacteriaceae(100);Chryseobacterium(99);
Otu00010	Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Rubrobacterales(100);Rubrobacteraceae(100);Rubrobacter(100);
Otu00011	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiaceae(100);Burkholderia(99);
Otu00012	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Phyllobacteriaceae(100);Phyllobacterium(100);
Otu00013	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Moraxellaceae(100);Acinetobacter(100);
Otu00014	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(55);
Otu00018	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Oxalobacteraceae(100);Janthinobacterium(98);
Otu00015	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Oxalobacteraceae(100);Herbaspirillum(95);
Otu00023	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Alcaligenaceae(100);unclassified(85);
Otu00026	Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Actinomycetales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu00020	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(100);Sphingomonas(100);

Otu00113	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);Asaia(100);
Otu00070	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Sinobacteraceae(100);Nevskia(97);
Otu00060	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);"Enterobacteriales"(100);Enterobacteriaceae(100);unclassified(100);
Otu00214	Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);Flavobacteria(100);"Flavobacteriales"(100);Flavobacteriaceae(100);Elizabethkingia(100);
Otu00052	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Xanthomonadaceae(100);Stenotrophomonas(100);
Otu00032	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiaceae(100);Cupriavidus(95);

Continuação Tabela S8.

Figuras:

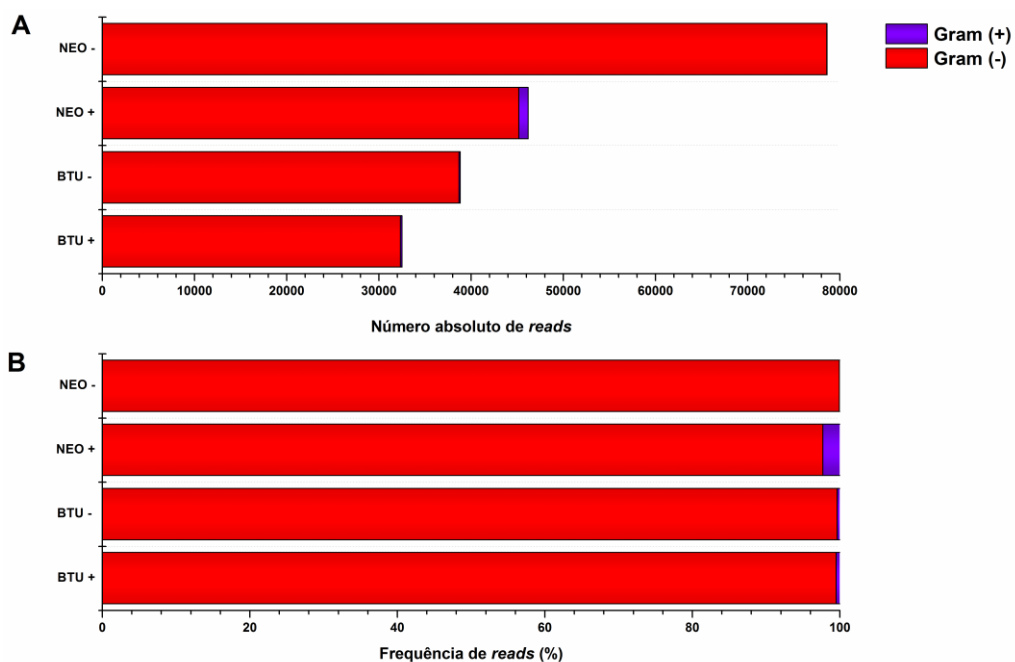


Figura S1. Composição bacteriana por Gram das amostras ingurgitadas e infectadas ou não infectadas das populações de Neópolis-SE e Botucatu-SP (NEO +, NEO -, BTU +, BTU -, respectivamente). (A) Classificação bacteriana em função do número absoluto de *reads*; (B) Classificação bacteriana em função da frequência de *reads* (%).