

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Mariana Rocha David**

### **Avaliação de aspectos das interações envolvendo o vetor *Aedes***

### ***aegypti*, a microbiota intestinal e arbovírus**

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biologia Parasitária.

**Orientadores:** Dr. Rafael Maciel de Freitas & Dra. Ana Carolina Paulo Vicente

**RIO DE JANEIRO**

21 de julho de 2016

D249 David, Mariana Rocha

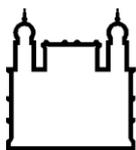
Avaliação de aspectos das interações envolvendo o vetor *Aedes aegypti*, a microbiota intestinal e arbovírus / Mariana Rocha David. – Rio de Janeiro, 2016. xii, 205 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 168-205

1. *Aedes aegypti*. 2. Microbiota. 3. Capacidade vetorial. 4. Diversidade. I. Título.

CDD 614.43



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: Mariana Rocha David***

### **Avaliação de aspectos das interações envolvendo o vetor *Ae.***

### ***aegypti*, a microbiota intestinal e arbovírus**

**Orientadores:** Dr. Rafael Maciel de Freitas & Dra. Ana Carolina Paulo Vicente

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Denise Valle – Presidente** (FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ)

**Prof. Dr. Claudio José Struchiner** (FIOCRUZ/Programa de Computação Científica, Rio de Janeiro, RJ)

**Prof. Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira** (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ)

**Prof. Dra. Cristiane Carneiro Thompson** (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ)

**Prof. Dr. Fernando Ariel Genta** (FIOCRUZ/Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ)

Rio de Janeiro, 21 de julho de 2016.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários e no Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, com recursos da Fundação Oswaldo Cruz, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto Oswaldo Cruz, minha casa desde 2007, onde aprendi a fazer ciência. Aqui me sinto realizada e muito feliz.

Obrigada aos meus orientadores Dr. Rafael e Dra. Ana Carolina, a quem considero inspirações. Rafael, meu mentor e amigo desde a época da graduação, me ensinou muito mais do que ecologia e biologia de mosquitos. Toda sua paciência, carinho e dedicação ao longo desta jornada foram fundamentais para que eu realizasse a minha formação acadêmica e concretizasse meu maior sonho profissional. Não tenho palavras para agradecer.

À minha orientadora Dra. Ana Carolina, cujo brilhantismo me desperta profunda admiração. Obrigada por me receber em seu grupo de pesquisa e me orientar, mesmo sem nenhuma experiência prévia com bactérias, por todas as discussões científicas valiosíssimas e por tudo que aprendi.

Aos amigos do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, grupo ao qual me orgulho muito em fazer parte. Todos sempre ajudam um pouquinho, até mesmo sem perceber. Em especial, gostaria de agradecer ao Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira pela oportunidade me concedida ainda na época da graduação e pela honra de ter dividido a bancada durante os experimentos com o vírus Chikungunya. A Lilha e ao Roberto pela ajuda nos trabalhos de campo.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos por todo o aprendizado ao longo do desenvolvimento desta tese. Um agradecimento carinhoso e especial à Érica Miranda e à Fernanda Freitas pelos ensinamentos e ajuda no isolamento e identificação taxonômica das bactérias e ao Michel Marín e Diego Cambuy pelo apoio na bioinformática. Aos demais agradeço pelas sugestões e discussões durante as reuniões, seminários e no dia-a-dia, as quais, sem dúvida, contribuíram de maneira positiva para o nosso trabalho.

Aos amigos Rodrigo Nunes e Marcos Sorgine e ao Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos, UFRJ, pela colaboração nos experimentos com o vírus Chikungunya. É sempre muito produtivo e agradável trabalhar com vocês! Ao Instituto Evandro Chagas e ao Dr. Pedro Vasconcelos pelo fornecimento da linhagem deste vírus.

Às plataformas de Sequenciamento de Alto Desempenho e de Sequenciamento de DNA do Instituto Oswaldo Cruz pelo sequenciamento das amostras e apoio técnico.

Ao Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, na figura do Dr. Ademir Martins, por ter me cedido o espaço para realizar a dissecação dos mosquitos e reações de biologia molecular.

À minha família, especialmente à minha mãe. Obrigada pelos conselhos e os mimos de sempre. Gostaria de agradecer também à minha irmã Fernanda, Tia Bebel, Vovó Gilda e Papai por todo amor que me cerca todos os dias e pela torcida de que tudo desse certo.

Ao Hugo por todo o amor e carinho incondicionais e pelos momentos maravilhosos de alegria. À Pinga por me mostrar que a felicidade está nas pequenas coisas da vida e pela companhia incansável durante a escrita da tese.

À Dra. Denise Valle, pela revisão desta tese, e aos demais membros da banca examinadora.

À Comissão de Pós-Graduação em Biologia Parasitária pelo esforço e dedicação que resultam na excelência de nosso curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ pelo apoio financeiro e concessão da minha bolsa de doutorado. Aos laboratórios de Mosquitos Transmissores de Hematozoários e de Genética Molecular de Microorganismos pelo apoio financeiro e técnico para a realização do nosso trabalho.

"A ciência explica a natureza e cria novos mundos  
que não percebemos com os nossos sentidos"

(Marcelo Gleiser)

## ÍNDICE

|   |            |
|---|------------|
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>xi</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>xii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>01</b>  |
| <b>1.1. Arbovírus.....</b>  | <b>01</b>  |
| 1.1.1. Dengue.....  | 03         |
| 1.1.2. Chikungunya.....   | 04         |
| 1.1.3. Zika.....  | 07         |
| <b>1.2. O mosquito <i>Aedes aegypti</i>.....</b>                                | <b>09</b>  |
| 1.2.1. Biologia e ecologia.....   | 09         |
| 1.2.2. Distribuição geográfica.....   | 10         |
| 1.2.3. Capacidade e competência vetorial a arbovírus.....                       | 12         |
| 1.2.4. Determinantes da competência vetorial a arbovírus.....                   | 12         |
| <b>1.3. Microbiota.....</b>   | <b>14</b>  |
| 1.3.1. Influência da microbiota intestinal na biologia de culicídeos.....       | 19         |
| 1.3.2. Influência da microbiota intestinal na competência vetorial.....         | 21         |
| 1.3.3. Determinantes da diversidade da microbiota intestinal de culicídeos..... | 25         |
| <b>1.4. Identificação da diversidade bacteriana da microbiota.....</b>          | <b>37</b>  |
| 1.4.1. Identificação taxonômica de bactéria.....                                | 37         |
| 1.4.2. Análise da diversidade de comunidades bacterianas.....                   | 39         |
| 1.4.3. Abordagens metodológicas para o estudo da diversidade bacteriana.....    | 41         |
| <b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>  | <b>44</b>  |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>  | <b>47</b>  |
| 3.1. Objetivo geral.....  | 47         |
| 3.2. Objetivos específicos.....   | 47         |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4. CAPÍTULO I - Efeitos do ambiente, dieta e idade na microbiota do mosquito vetor do dengue: evidências da estabilidade da microbiota ao longo da vida adulta de <i>Aedes aegypti</i>.....</b> | <b>48</b>  |
| 4.1. Justificativa.....  | 48         |
| 4.2. Metodologia.....  | 49         |
| 4.3. Resultados.....   | 58         |
| 4.4. Discussão.....  | 72         |
| 4.5. Effects of Environment, Dietary Regime and Ageing on the Dengue Vector Microbiota: Evidence for a Core Microbiota Throughout the <i>Aedes aegypti</i> Lifespan..                              | 78         |
| <b>5. CAPÍTULO II - Influência de <i>Asaia</i> e <i>Elizabethkingia</i> no desenvolvimento larvar de <i>Aedes aegypti</i>.....</b>   | <b>117</b> |
| 5.1. Justificativa.....  | 117        |
| 5.2. Metodologia.....  | 120        |
| 5.3. Resultados.....   | 124        |
| 5.4. Discussão.....  | 133        |
| <b>6. CAPÍTULO III - Aspectos quantitativos da interação tripartite envolvendo <i>Ae. aegypti</i>, a microbiota intestinal e o vírus chikungunya.....</b>  | <b>139</b> |
| 6.1. Justificativa.....  | 139        |
| 6.2. Metodologia.....  | 141        |
| 6.3. Resultados.....   | 144        |
| 6.4. Discussão.....  | 150        |
| <b>7. DISCUSSÃO GERAL.....</b>   | <b>154</b> |
| <b>8. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>166</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>168</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                  |     |
|------------------|-----|
| Figura 1.1.....  | 26  |
| Figura 1.2.....  | 38  |
| Figura 4.1.....  | 59  |
| Figura 4.2. .... | 60  |
| Figura 4.3.....  | 62  |
| Figura 4.4. .... | 64  |
| Figura 4.5. .... | 65  |
| Figura 4.6. .... | 67  |
| Figura 4.7. .... | 68  |
| Figura 4.8. .... | 71  |
| Figura 5.1. .... | 128 |
| Figura 5.2. .... | 129 |
| Figura 5.3. .... | 130 |
| Figura 6.1. .... | 145 |
| Figura 6.2.....  | 147 |
| Figura 6.3.....  | 148 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                  |     |
|------------------|-----|
| Tabela 1.1.....  | 33  |
| Tabela 1.2.....  | 35  |
| Tabela 4.1.....  | 51  |
| Tabela 4.2 ..... | 59  |
| Tabela 4.3.....  | 70  |
| Tabela 5.1.....  | 121 |
| Tabela 5.2.....  | 125 |
| Tabela 5.3.....  | 127 |
| Tabela 5.4.....  | 130 |
| Tabela 5.5.....  | 132 |
| Tabela 6.1.....  | 142 |
| Tabela 6.2.....  | 144 |

## RESUMO

A microbiota intestinal influencia diversos aspectos da biologia dos insetos, incluindo a sobrevivência, o desenvolvimento, a nutrição e a imunidade. No caso dos insetos vetores, a microbiota pode impactar a susceptibilidade a patógenos adquiridos através do repasto sanguíneo, como arbovírus e protozoários. Atualmente o Brasil enfrenta epidemias de três arboviroses, causadas pelos vírus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), os quais seriam transmitidos primariamente pelo mosquito *Aedes aegypti*. O objetivo principal desta tese foi avaliar aspectos das interações envolvendo vetor, microbiota e arbovírus, enriquecendo o conhecimento acerca da dinâmica da comunidade microbiana intestinal e dos impactos na biologia do vetor. A composição da microbiota de fêmeas de *Ae. aegypti* recapturadas em um experimento de marcação-soltura-recaptura foi comparada a de insetos mantidos no laboratório sob diferentes dietas (açúcar ou açúcar e sangue) e oriundos de distintos grupos etários. Avaliamos também a diversidade bacteriana presente no intestino de mosquitos selvagens do mesmo local. Diante de todas as variáveis supramencionadas, demonstramos que a maioria dos taxa bacterianos abundantes na microbiota de *Ae. aegypti* perdura sob diferentes condições e ao longo da vida das fêmeas, não havendo a colonização por novos taxa em quantidades expressivas (>2%). Tais resultados sugerem que o lúmen intestinal é um ambiente competitivo, colonizado por microorganismos logo após a emergência do mosquito adulto. A adição do gênero *Asaia* no criadouro larvar não colonizou e nem provocou alterações no desenvolvimento dos imaturos de *Ae. aegypti*, como é observado em *Anopheles*. Por outro lado, a presença de *Elizabethkingia* na água de criação resultou na aceleração do desenvolvimento larvar. Os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos, porém a associação entre este mosquito e *Elizabethkingia* parece oferecer uma vantagem evolutiva para o *Ae. aegypti*. Após a ingestão do sangue, fêmeas de culicídeos apresentam um aumento da ordem de 1000 vezes na quantidade de bactérias intestinais. Contudo, nossos experimentos mostram que ao ingerir sangue contendo CHIKV, fêmeas de *Ae. aegypti* não apresentam alterações significativas na carga bacteriana intestinal em relação aos insetos pré-infecção. Um comportamento similar foi observado em mosquitos da mesma espécie infectados por DENV. Além disso, as cargas bacteriana e viral apresentaram uma correlação positiva fraca 24h após o repasto infectivo. Por fim, a diversidade bacteriana encontrada se sobrepõe àquela descrita em *Ae. aegypti* coletados em diferentes localidades geográficas, com o encontro frequente dos gêneros *Asaia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia*, por exemplo. O estudo das interações entre vetor e microbiota pode auxiliar no entendimento do gradiente de susceptibilidade a arbovírus observado em populações naturais de mosquitos, bem como contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle vetorial e/ou redução da transmissão de arbovírus.

## ABSTRACT

The gut microbiota influences several aspects of insect's biology, including survival, development, nutrition and immunity. The microbiota of disease vectors can also influence the susceptibility to pathogens acquired through blood-meals, such as arbovirus and parasites. Presently, Brazil faces epidemics of three arboviruses, caused by dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) and Zika virus (ZIKV) which would be primarily transmitted by *Aedes aegypti*. The main objective of this thesis was to evaluate aspects of vector, microbiota and arbovirus interactions, improving knowledge about the intestinal microbial community dynamics and its impacts on mosquito biology. We compared the microbiota composition of recaptured *Ae. aegypti* females derived from a mark-release-recapture experiment and differently aged laboratory insects kept under different dietary regimes (sugar or sugar plus blood). We also characterized the midgut bacteria community of field-collected specimens. Despite all the aforementioned variables, in general the most frequent microbiota bacteria persisted under different conditions and throughout the *Ae. aegypti* lifespan, without significant colonization by new taxa (>2%). These results suggest that the midgut lumen is a competitive environment colonized by microorganisms shortly after emergence of the adult mosquito. Different from *Anopheles* mosquitoes, addition of the genus *Asaia* in the larval breeding environment did not change the development time of immature *Ae. aegypti*. However, the presence of *Elizabethkingia* was associated with an acceleration in the larval development rate. Although the mechanisms involved in this outcome are still unknown, the association between this mosquito and *Elizabethkingia* seems to offer an evolutionary advantage for *Ae. aegypti*. After blood feeding, the amount of midgut bacteria in Culicidae females usually increases 1,000 fold. Nevertheless, compared to pre-infection *Ae. aegypti*, we did not detect significant changes in the midgut bacteria load after the ingestion of blood containing CHIKV. A similar situation was observed in mosquitoes infected with DENV. In addition, bacterial and viral loads showed a weak positive correlation 24 hours after the infective meal. Finally, the bacterial diversity found during this study is similar to that described in *Ae. aegypti* collected in different geographic locations, where mosquitoes frequently harbour the genera *Asaia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Serratia*, for example. The study of the vector-microbiota interactions has the potential of improving knowledge of the arboviruses susceptibility gradient observed in mosquitoes natural populations, as well as contributing to the development of new strategies to control disease vectors and/or to reduce arbovirus transmission.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Arbovírus

Arbovírus (*Arthropod-borne virus*) são vírus cuja manutenção na natureza ocorre por meio da transmissão biológica entre animais vertebrados susceptíveis e artrópodes hematófagos, como mosquitos, pulgas, piolhos e carrapatos (World Health Organization 1966). Estes vírus são geralmente adquiridos durante a ingestão do sangue de um hospedeiro vertebrado com viremia e replicam-se nos diferentes tecidos dos artrópodes vetores, incluindo as glândulas salivares. Desta maneira, as partículas virais são inoculadas juntamente com a saliva na corrente sanguínea de animais vertebrados durante os repastos sanguíneos subsequentes. O período compreendido entre a ingestão do sangue contendo o vírus pelo mosquito e a infecção das glândulas salivares é denominado período de incubação extrínseco.

Ademais, alguns arbovírus também podem se disseminar entre os invertebrados via transmissão transovariana ou venérea (Gubler e Kuno 1997). Na maioria dos casos, a frequência de transmissão para a prole ou durante a cópula é baixa (~ 1% e 5%, respectivamente) e insuficiente para sustentar sozinha a manutenção dos arbovírus na natureza (Fine 1975; Thompson e Beaty 1977; Gubler e Kuno 1997). Contudo, estas rotas de transmissão são consideradas potenciais mecanismos de sobrevivência dos vírus em períodos interepidêmicos ou de redução da população de artrópodes vetores, como, por exemplo, durante o inverno, através da infecção de ovos e/ou formas imaturas (machos e fêmeas) em hibernação (Rosen 1987).

Atualmente são conhecidas mais de 500 espécies de arbovírus (Centers for Disease Control and Prevention 2016), os quais são amplamente distribuídos ao redor do mundo, se fazendo presentes em todos os continentes. À exceção do vírus da febre

suína africana, que possui genoma composto de DNA, arbovírus possuem RNA como material genético (Kuno e Chang 2005). Além disso, a denominação "arbovírus" não representa um grupo taxonômico monofilético, o que sugere que a associação com os artrópodes surgiu diversas vezes ao longo da evolução. Isto posto, estas entidades biológicas foram agrupadas devido ao seu modo comum de transmissão, compreendendo, por exemplo, alguns gêneros das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Orthomyxoviridae* (Hanley e Weaver 2008).

Os arbovírus infectam uma ampla variedade de animais vertebrados, incluindo mamíferos, aves, anfíbios e répteis, assim como artrópodes das ordens Anoplura, Diptera, Hemiptera, Siphonaptera (insetos) e Ixodida (carrapatos) (Kuno e Chang 2005). A maioria dos arbovírus circula no ambiente silvestre, onde o homem pode representar um hospedeiro acidental e "sem saída" (no qual o vírus não conseguirá se replicar em quantidades suficientes para infectar um vetor e perpetuar o ciclo de transmissão) (Weaver e Reisen 2010). Portanto, as arboviroses são classificadas comumente como zoonoses, ou seja, infecções causadas por patógenos transmitidos entre animais e o homem (World Health Organization 2006).

Entretanto, alguns arbovírus estabeleceram ciclos de transmissão bem sucedidos no ambiente urbano, mantidos exclusivamente entre humanos e vetores antropofílicos, sem que haja a necessidade da circulação e amplificação em animais (Weaver e Reisen 2010). Assim, algumas arboviroses vêm emergindo como importantes problemas globais de saúde pública, cujos agentes etiológicos são transmitidos principalmente por mosquitos antropofílicos dos gêneros *Aedes* e *Culex* (Diptera: Culicidae). Dentre os arbovírus com maior incidência na população humana estão o Dengue (DENV) e o Chikungunya (CHIKV). Recentemente, o Zika (ZIKV) emergiu na região do Pacífico (Duffy *et al.* 2009) e foi introduzido nas Américas (Campos *et al.* 2015). O ciclo urbano

de transmissão dos três arbovírus supracitados no continente americano seria sustentado principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*.

### **1.1.1. Dengue**

O DENV é um vírus de RNA fita-simples positiva do gênero *Flavivirus* (família Flaviviridae) e possui quatro sorotipos antigenicamente distintos denominados DENV-1, 2, 3 e 4 (Gubler e Kuno 1997). Recentemente, evidências apontaram para a existência de um novo sorotipo de dengue restrito à circulação silvestre entre primatas não humanos na ilha de Bornéu, região pertencente à Malásia, Ásia, sendo classificado inicialmente como DENV-5 (Vasilakis 2013). Entretanto, ainda se discute as consequências deste achado na epidemiologia da dengue e na produção de vacinas caso esta linhagem seja confirmada como pertencente a um novo sorotipo (Normile 2013).

A infecção pelo DENV em humanos é muitas vezes assintomática (Simmons *et al.* 2012; Bhatt *et al.* 2013; Duong *et al.* 2015), mas pode causar uma doença autolimitada, cujos sintomas incluem febre, artralgia (dores no corpo e nas juntas), dor de cabeça e ao redor dos olhos, náusea e exantema (erupções cutâneas avermelhadas). Em uma minoria de casos ocorre a evolução da forma clássica para a forma severa da doença, durante a qual pode ocorrer o choque com ou sem hemorragia, podendo evoluir para o óbito (Gubler e Kuno 1997).

Ainda não está claro se o DENV é nativo nas florestas tropicais da Ásia ou da África (Holmes e Twiddy 2003), onde circularia originalmente entre primatas não humanos e culicídeos do gênero *Aedes* de hábito silvestre (Gubler 1998; Vasilakis *et al.* 2011). Os primeiros registros de uma doença compatível com a dengue em populações humanas datam de 610 a.C. na China (Nobuchi 1979 apud. Gubler 1998). Durante o

período das grandes navegações o vírus teria se disseminado ao redor do mundo, mas somente na segunda metade do século XX, após a Segunda Guerra Mundial, emergiu como um problema global de saúde pública (Gubler e Kuno 1997).

Atualmente, o DENV é o arbovírus de maior impacto na saúde humana e estima-se que afete cerca de 390 milhões de pessoas anualmente (Bhatt *et al.* 2013) em 128 países localizados nas zonas tropicais e subtropicais do planeta (Brady *et al.* 2012). O Brasil registra epidemias de dengue desde 1986 (Silva Jr. *et al.* 2002) e é ultimamente o país com a maior ocorrência em número de casos no mundo. Há registro de circulação dos quatro sorotipos virais desde 2010, com autoctonia de um ou mais sorotipos em todas as Unidades da Federação. Somente em 2015, 1,5 milhão de infecções prováveis por DENV foram registradas, com 839 óbitos confirmados (Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2015a).

A dengue apresenta um padrão sazonal de maior incidência no verão, período de maior temperatura e pluviosidade, condições que favorecem o aumento da densidade de mosquitos. O *Ae. aegypti* é considerado o vetor primário na América continental (Schatzmayer 2000; Dick *et al.* 2012). Entretanto, fêmeas recém-emergidas, machos e larvas de *Ae. albopictus* já foram encontrados naturalmente infectados no México e no Brasil (Ibáñez-Bernal *et al.* 1997; Figueiredo *et al.* 2010; Martins *et al.* 2012). A importância deste mosquito na epidemiologia do DENV nas Américas ainda não está clara, mas seria minoritária, uma vez que este é considerado um vetor menos eficiente que o *Ae. aegypti* (Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2003; Lambrechts *et al.* 2010).

### **1.1.2. Chikungunya**

O CHIKV possui genoma constituído por RNA fita-simples positiva e pertence ao gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*). Estudos filogenéticos apontam para a

existência de três genótipos distintos, cuja nomenclatura foi definida de acordo com a região de circulação: Oeste da África, Leste-Centro-Sul da África (ECSA, em inglês) e Asiático (Weaver e Forrester 2015). A infecção em humanos causa sintomas similares à dengue, como febre, dores de cabeça, exantema e artralgia mais intensa, principalmente em pés e mãos. Em referência à sintomatologia, a doença foi batizada na língua local da Tanzânia de "chikungunya", termo que significa "aqueles que se dobram". Entretanto, diferentemente da dengue, cujos sintomas desaparecem após poucas semanas, a artralgia pode persistir por meses ou até anos em algumas pessoas (Robinson 1955).

Na África o CHIKV circula nas florestas tropicais entre primatas não humanos e mosquitos do gênero *Aedes* que habitam a copa das árvores (Higgs e Vanlandingham 2015). A primeira epidemia formalmente descrita em humanos ocorreu em 1952-53 na Tanzânia (Robinson 1955), embora seja possível que o vírus tenha circulado silenciosamente também na Ásia e Américas desde o século XVII, sendo erroneamente classificado como DENV (Halstead 2015). Até o final do século XX, surtos esporádicos de chikungunya foram reportados na África e na Ásia, cuja transmissão vetorial foi atribuída a *Aedes spp.* de hábito arbóreo (ciclo silvestre na África) e ao *Ae. aegypti* (ciclo urbano na Ásia) (Weaver e Forrester 2015). Entretanto, no início do século XXI, o CHIKV se tornou o terceiro arbovírus de maior impacto histórico na saúde humana, atrás apenas do DENV e Febre Amarela (Weaver 2013).

Assim como DENV, o CHIKV estabeleceu com sucesso um ciclo urbano de transmissão independente da amplificação viral em animais silvestres. Em 2005, grandes epidemias foram reportadas em várias ilhas do Oceano Índico e na Índia (Schuffenecker *et al.* 2006; Higgs 2006; Dash *et al.* 2008). A análise filogenética de linhagens virais obtidas no Oceano Índico revelou um clado homogêneo único dentro do grupo ECSA (*Indian Ocean Lineage*, IOL), sendo considerado por alguns autores

um quarto genótipo (Nunes *et al.* 2015). Além disso, em alguns genótipos foi detectada a ocorrência de uma mutação na glicoproteína E1 do envelope viral (E1-A226V) (Schuffenecker *et al.* 2006), a qual foi associada ao aumento significativo da infectividade desta cepa ao mosquito *Ae. albopictus* (Tsetsarkin *et al.* 2007), vetor primário naquela região.

Em 2007, uma linhagem de CHIKV do genótipo ECSA-IOL/ E1-A226V, foi introduzida na Itália, através de um viajante procedente da Índia. Um surto com 205 casos confirmados foi reportado neste país, cuja transmissão foi atribuída ao *Ae. albopictus* (Rezza *et al.* 2007). No continente Americano, a primeira epidemia de chikungunya ocorreu em 2013 na região do Caribe, causada por uma cepa viral pertencente ao genótipo Asiático, sendo o *Ae. aegypti* considerado o único vetor potencial (Leparc-Goffart *et al.* 2014).

Já no Brasil, a transmissão autóctone de CHIKV foi detectada concomitantemente em Feira de Santana, na Bahia, e no Oiapoque, no Amapá, em 2014. As cepas virais circulantes foram identificadas como pertencentes a dois genótipos distintos: ECSA (Bahia) e Asiático (Amapá) (Nunes *et al.* 2015; Teixeira *et al.* 2015). Análises filogenéticas e epidemiológicas indicam que uma única introdução ocorreu na Bahia a partir de Angola, onde muitos brasileiros trabalham nos setores de petróleo e minério. Por outro lado, no Norte parece ter ocorrido múltiplas introduções a partir de países do Caribe e da América do Sul, principalmente da Guiana Francesa, que faz fronteira com o estado do Amapá (Nunes *et al.* 2015).

Em 2015, o país registrou cerca de 30 mil casos suspeitos de chikungunya em 12 Unidades da Federação, com três óbitos confirmados em idosos com histórico de doenças crônicas (Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2016). Populações brasileiras de *Ae. aegypti* são altamente competentes ao CHIKV (Vega-Rúa

*et al.* 2014), sendo este mosquito considerado o único vetor deste arbovírus em todo o continente americano até o momento (Teixeira *et al.* 2015).

### **1.1.3. Zika**

O ZIKV é um vírus de RNA fita-simples positiva do gênero *Flavivirus* (família Flaviviridae), o qual apresenta três linhagens principais nominadas de acordo com a sua origem geográfica: Leste da África, Oeste da África e Asiática (Faye *et al.* 2014). Os sintomas da febre do Zika incluem febre, dores de cabeça e no corpo, exantema com pápulas, náusea e conjuntivite (Simpson 1964; Hayes 2009), o que faz com que esta infecção possa ser facilmente confundida com dengue ou chikungunya. Além disso, no caso de infecções por ZIKV em populações que já possuem imunidade para outros flavivírus, como o DENV, pode ocorrer reação cruzada em ensaios sorológicos, contribuindo para o diagnóstico equivocado da doença (Lanciotti *et al.* 2008).

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947, a partir de um macaco sentinela e mosquitos *Aedes africanus* na Floresta Zika, em Uganda, durante um estudo conduzido pela Fundação Rockefeller para monitorar a ocorrência de febre amarela (Dick *et al.* 1952). Este vírus possui um ciclo silvestre de transmissão na África envolvendo primatas não humanos e mosquitos arbóreos do gênero *Aedes* (Hayes 2009). Desde a sua descrição, a circulação do ZIKV em humanos vem sendo esporadicamente registrada na África (Simpson 1964; Moore *et al.* 1975) e também no Sudeste da Ásia (Olson *et al.* 1981), onde o vírus foi isolado pela primeira vez de *Ae. aegypti* naturalmente infectados (Marchette *et al.* 1969).

Epidemias causadas por ZIKV foram detectadas fora dos continentes Africano e Asiático a partir de 2007, quando este vírus foi identificado como o agente causador de uma doença febril nas Ilhas Yap, nos Estados Federados da Micronésia, país localizado

no norte do Oceano Pacífico (Lanciotti *et al.* 2008). Alguns anos depois, em 2013-14, uma grande epidemia se instaurou na Polinésia Francesa, com uma estimativa de 19 mil casos suspeitos (Cao-Lormeau *et al.* 2014). A circulação do ZIKV no Brasil foi detectada logo no ano seguinte nos estados do Rio Grande do Norte (Zanluca *et al.* 2015) e Bahia (Campos *et al.* 2015; Zammarchi *et al.* 2015).

O ZIKV circulante no Brasil se assemelha geneticamente àquele identificado anteriormente na Polinésia Francesa, pertencente à linhagem Asiática (Zanluca *et al.* 2015; Brasil *et al.* 2016; Faria *et al.* 2016). Além disso, análises filogenéticas e de relógio molecular sugerem que ocorreu uma única introdução no país (Faria *et al.* 2016). Desta maneira, uma das hipóteses propostas é a chegada de pessoa ou vetor infectado no território brasileiro durante a Copa do Mundo da FIFA, realizada em 2014 (Zanluca *et al.* 2015), mesmo não havendo a participação de atletas dos países afetados. Por outro lado, a Copa das Confederações e o torneio de canoagem Va'a, realizados em 2013 e 2014, respectivamente, contaram com a presença de equipes esportivas provenientes de diferentes países do Pacífico e vêm sendo apontados como prováveis momentos de entrada do ZIKV no Brasil (Musso 2015; Faria *et al.* 2016).

O Brasil vivencia a maior epidemia de febre do Zika já registrada no mundo, com pelo menos 70 mil casos suspeitos da doença (PAHO 2016) e autoctonia em 22 Unidades da Federação (Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2016). Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde declarou a epidemia uma emergência em saúde pública de interesse mundial devido à possível associação do ZIKV com casos de microcefalia em fetos e neonatos (Schuler-Faccini *et al.* 2016; Calvet *et al.* 2016) e síndrome de Guillain-Barré (Oehler *et al.* 2014; PAHO 2015). Até o momento, o *Ae. aegypti* é incriminado como principal vetor do ZIKV no Brasil. Estudos recentes utilizando *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro apontaram uma baixa

eficiência de transmissão de uma linhagem de ZIKV isolada na Nova Caledônia (Chouin-Carneiro *et al.* 2016), ao passo que 100% dos mosquitos apresentaram vírus na saliva após a infecção por uma linhagem de ZIKV isolada no Brasil (Dutra *et al.* 2016). Além da transmissão vetorial, a detecção do vírus no sêmen (Musso *et al.* 2015a), urina (Gourinat *et al.* 2015) e saliva (Musso *et al.* 2015b) de pessoas infectadas indicou a possibilidade de transmissão direta entre seres humanos.

## **1.2. O mosquito *Aedes aegypti***

### **1.2.1. Biologia e ecologia**

Parte do sucesso no estabelecimento do DENV, CHIKV e ZIKV em populações humanas se deve à sua associação com culicídeos vetores competentes altamente antropofílicos, como o *Ae. aegypti*. Diversas mudanças demográficas e sociais das últimas décadas, tais como a aceleração do processo de urbanização desordenada nas grandes metrópoles, o aumento da densidade populacional humana e a intensificação do comércio e transporte de cargas e pessoas, criaram condições propícias à disseminação e/ou aumento da densidade deste mosquito no ambiente (Gubler 1998; Weaver e Reisen 2010).

O *Ae. aegypti* está adaptado ao meio urbano e possui associação com o homem (Braks *et al.* 2003). Apenas as fêmeas realizam o repasto sanguíneo e possuem marcada preferência pelo sangue humano (Edman *et al.* 1992). Além disso, a espécie frequentemente realiza mais de uma alimentação sanguínea por ciclo gonotrófico, o que aumenta seu potencial em adquirir e transmitir patógenos (Halstead 2008). Apesar de ser um mosquito de hábito diurno, possui caráter oportunista, podendo se alimentar em qualquer horário do dia (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). Cerca de três dias após a ingestão do sangue (Christophers 1960), as fêmeas realizam a postura de

ovos em diversos recipientes artificiais (Peryassú 1908), dentre os quais estão caixas d'água, tonéis, vasos de planta, garrafas, potes plásticos, pneus ou qualquer outro local capaz de armazenar água limpa (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; Cunha *et al.* 2002; Maciel-de-Freitas *et al.* 2007a; David *et al.* 2009).

A postura dos ovos do *Ae. aegypti* ocorre na parede do criadouro, acima do nível da água (Peryassú 1908). Após o término da embriogênese, os ovos podem permanecer viáveis por até 450 dias no ambiente seco (Severo 1956). Tal característica permite que sejam facilmente transportados passivamente por longas distâncias, aderidos em pneus e outros materiais. Quando submersos, os ovos eclodem dando origem a uma larva, a qual passará por quatro estádios larvares morfológicamente idênticos até atingir a fase de pupa, quando ocorrerá a metamorfose para a forma adulta. O tempo de desenvolvimento dos imaturos varia de acordo com fatores ambientais bióticos e abióticos, tais como a disponibilidade de recursos e a temperatura da água (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

### **1.2.2. Distribuição geográfica**

Atualmente, a distribuição geográfica do *Ae. aegypti* compreende as zonas urbanas e periurbanas das regiões tropicais e subtropicais do planeta (Braks *et al.* 2003). Originário da África subsaariana, este mosquito evoluiu a partir de uma forma ancestral de hábito silvestre, cujos criadouros e fontes sanguíneas eram majoritariamente buracos de árvore e animais silvestres, respectivamente. Especula-se que após a formação do deserto do Saara, o *Ae. aegypti* adaptou-se a colocar seus ovos em recipientes empregados pelo homem para armazenamento de água, alguns dos poucos criadouros disponíveis no ambiente árido. A variação silvestre do *Ae. aegypti* constitui uma

subespécie denominada *formosus*, encontrada apenas no continente Africano (Powell e Tabachnick 2013).

O *Ae. aegypti* foi introduzido nas Américas durante o período colonial, provavelmente trazido em navios que atravessavam o Oceano Atlântico carregando mercadorias e escravos (Bracco *et al.* 2007). Posteriormente, provavelmente se espalhou a partir do Novo Mundo para a região do Pacífico, Ásia e Austrália (Brown *et al.* 2011). No continente Americano, alcançou importância epidemiológica primeiramente como vetor urbano do vírus da Febre Amarela (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). No início do século XX, intensas campanhas de controle vetorial, lideradas por Oswaldo Cruz e posteriormente pela Fundação Rockefeller, levaram à erradicação do *Ae. aegypti* do Brasil na década de 1950 (Braga e Valle 2007). Entretanto, alguns anos depois, o mosquito invadiu novamente o território brasileiro a partir focos remanescentes nos EUA, Venezuela e Caribe (Monteiro *et al.* 2014). Atualmente, o *Ae. aegypti* está presente em todos os estados brasileiros (Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2015b).

No contexto atual, a erradicação do *Ae. aegypti* é considerada uma meta inatingível visto que o processo de urbanização possibilitou o aumento da distribuição e da abundância deste mosquito nas regiões tropicais do planeta (Gubler 1998; Weaver e Reisen 2010). Especialmente nos países em desenvolvimento, este inseto se beneficia de condições precárias de saneamento e coleta de lixo ao utilizar como criadouros recipientes domésticos de armazenamento de água e materiais descartados em local inadequado (Barrera *et al.* 1993; Maciel-de-Freitas *et al.* 2007a). Ademais, a alta densidade humana das grandes cidades fornece fontes de sangue em abundância, evitando que o mosquito precise voar por longas distâncias (Paupy *et al.* 2003; David *et al.* 2009). Desta maneira, os programas de controle atuais têm como principal meta a

redução da densidade do *Ae. aegypti* a níveis insuficientes para sustentar epidemias de arboviroses.

### 1.2.3. Capacidade e competência vetorial a arbovírus

Diversos fatores determinam a ocorrência das arboviroses, dentre os quais está a capacidade vetorial (CV) (Garret-Jones 1964), que representa o componente entomológico da taxa de reprodução básica da infecção viral. Esta taxa equivale ao número médio de novos casos gerados a partir de um único caso ao longo do tempo. O conceito de CV traduz a habilidade de uma população de vetores em transmitir um determinado patógeno a uma população de hospedeiros suscetíveis (Klempner *et al.* 2007). O termo foi cunhado pela primeira vez para definir o número de infecções por *Plasmodium* que uma população de anofelinos pode distribuir em uma população humana susceptível em um dado tempo e espaço (Garret-Jones 1964). Recentemente, também vem sendo empregado com o mesmo sentido para arbovírus e seus vetores (Anderson e Rico-Hesse 2006). Desta maneira, a CV pode ser definida matematicamente como:

$$CV = m.b.c.a^2.P^n / -\log_e P$$

Onde *a* exprime o número médio de picadas por pessoa por dia; *c* é a probabilidade que um mosquito tem de se infectar com o patógeno; *b* é a probabilidade que um mosquito infectado tem de transmitir o patógeno a um hospedeiro susceptível; *m* é o número médio de fêmeas de mosquito por pessoa (densidade); *n* é a duração do período de incubação extrínseco do patógeno e *P* é a taxa de sobrevivência diária do vetor.

### 1.2.4. Determinantes da competência vetorial a arbovírus

A combinação de fatores que permite que um artrópode seja capaz de se infectar e transmitir um patógeno a um hospedeiro vertebrado susceptível (parâmetros  $c$  e  $b$  da CV, respectivamente) é denominada competência vetorial (Hardy *et al.* 1983). O processo de infecção do vetor por um arbovírus geralmente se inicia com a sua aquisição através da ingestão do sangue de um hospedeiro infectado. Subsequentemente o vírus deve sobreviver no lúmen do intestino médio e invadir, replicar-se e atravessar o epitélio intestinal. Após escapar do intestino, o vírus ainda deve se replicar na hemolinfa e em vários tecidos do mosquito até atingir as glândulas salivares. Para o sucesso da transmissão ainda é preciso que o vírus seja inoculado na corrente sanguínea de um hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva do vetor durante o respasto sanguíneo. Todas estas etapas representam potenciais barreiras à infecção viral e precisam ser transpostas pelo arbovírus para o estabelecimento de seu ciclo de transmissão (Clements 1992; Tabachnick *et al.* 2013).

A competência vetorial de *Ae. aegypti* a arbovírus varia entre populações do mosquito (Gubler *et al.* 1979; Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2004; Sim *et al.* 2013). Os determinantes desta variabilidade ainda não são totalmente entendidos, mas sabe-se que fatores extrínsecos e intrínsecos ao vetor são responsáveis por governar a susceptibilidade de uma população a um determinado arbovírus (Hardy *et al.* 1983; Tabachnick *et al.* 2013). Dentre os fatores extrínsecos destacam-se, por exemplo, diferenças genéticas das linhagens de vírus (Anderson e Rico-Hesse 2006), características do hospedeiro (Nguyen *et al.* 2013), a dose infectiva (Mahmood *et al.* 2006; Nguyen *et al.* 2013) e algumas condições ambientais abióticas, como a temperatura (Watts *et al.* 1987; Thu *et al.* 1998; Mourya *et al.* 2004) e a exposição a inseticidas (Muturi e Alto 2011).

A variação intraespecífica da competência vetorial também é resultado de características inerentes à população de vetores, algumas delas determinadas geneticamente (Gubler *et al.* 1979; Hardy *et al.* 1983; Beerntsen *et al.* 2000). De maneira geral, evidências apontam que propriedades da membrana peritrófica, perfil de enzimas digestivas, disponibilidade de receptores celulares específicos e níveis ativação do sistema imunológico estão entre os fatores que podem contribuir significativamente para a heterogeneidade da competência vetorial de mosquitos a arbovírus (Hardy *et al.* 1983). Além disso, os mecanismos envolvidos na determinação da susceptibilidade diferem entre populações de vetores da mesma espécie (Tabachnick *et al.* 2013). Considerando o *Ae. aegypti*, Sim e colaboradores (2013) observaram, por exemplo, que as populações menos susceptíveis à infecção por DENV possuíam níveis mais altos de expressão basal de genes relacionados à resposta imune.

Diante da complexidade dos parâmetros envolvidos na determinação da competência vetorial, alguns estudos recentes vêm demonstrando que a interação dos culicídeos com microorganismos simbiontes é capaz de modular infecções e determinar, ao menos em parte, a competência vetorial destes artrópodes (Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009). Assim como todos os animais, os mosquitos possuem estruturas e órgãos intensamente colonizados por microorganismos, principalmente bactérias, os quais influenciam diversos aspectos da sua biologia (Minard *et al.* 2013).

### **1.3. Microbiota**

Uma condição bastante comum na natureza é a associação de organismos superiores com microorganismos, dentre eles bactérias, protozoários, fungos e vírus (Sapp 1994). A aquisição e manutenção de uma ou mais espécies por outra é definida como simbiose. A partir desta interação ecológica os organismos afetam-se direta ou

indiretamente, em um *continuum* de relações que abrange o parasitismo, comensalismo e mutualismo, este último quando ambas as espécies se beneficiam (Begon *et al.* 2007; Klepzig *et al.* 2009).

O conjunto de microorganismos que coloniza um hábitat específico em um hospedeiro é denominado *microbiota*, enquanto seu conteúdo genético total constitui o *microbioma* (Hooper e Gordon 2001; Willing e Jansson 2011). Todos os animais e plantas albergam comunidades microbiológicas em diferentes órgãos, cuja totalidade de membros e informação genética podem se equivaler ou até mesmo ultrapassar a quantidade de células e o genoma do hospedeiro, respectivamente (Sender *et al.* 2016). A percepção de que os organismos superiores são dependentes da associação com microorganismos data do final do século XIX, quando Louis Pasteur já reconhecia que a existência de micróbios no intestino era essencial para a sobrevivência dos hospedeiros (Pasteur 1885 apud. Sapp 1994). Em 1918, Paul Portier propôs pela primeira vez que as células e tecidos dos animais saudáveis eram naturalmente colonizados por bactérias, denominadas *symbiotes*, fundamentais para a nutrição, reprodução, desenvolvimento e evolução dos hospedeiros, dentre os quais estaria a mitocôndria (Portier 1918 apud. Sapp 1994).

Contudo, a influência de microorganismos na fisiologia de seres multicelulares vem sendo reconhecida de maneira aprofundada mais recentemente, com o avanço das técnicas de sequenciamento de DNA (Hooper e Gordon 2001; Willing e Jansson 2011). Atualmente, a microbiota é considerada um "órgão" metabolicamente ativo, capaz de prover funções benéficas ao hospedeiro (O'Hara e Shanahan 2006). Assim, as relações hospedeiro-microbiota são entendidas majoritariamente como mutualistas, visto que o hospedeiro fornece substrato e nutrientes para o crescimento microbiano, ao

passo que a microbiota pode, por exemplo, fornecer nutrientes, auxiliar a digestão e regular a imunidade e o desenvolvimento do hospedeiro (Willing e Jansson 2011).

Deste modo, a diversidade destas comunidades biológicas vem sendo extensivamente explorada em diferentes animais, inclusive em humanos, onde mostrou-se correlacionada, por exemplo, com a localização no corpo, genótipo, idade, dieta, região geográfica e hábitos de higiene (Costello *et al.* 2009; Pflughoeft e Versalovic 2012; Yatsunenko *et al.* 2012). Alterações na sua composição estão associadas à ocorrência de algumas doenças, tais como obesidade (Ley *et al.* 2005), câncer (Schwabe e Jobin 2013) e depressão (Bravo *et al.* 2011). Ademais, a colonização por microorganismos simbiotes pode reduzir a infecção por patógenos, em um processo definido como resistência à colonização (van der Waaij *et al.* 1971; Buffie e Pamer 2013).

O reconhecimento de que a microbiota é capaz de influenciar a fisiologia e a adaptabilidade dos animais e plantas levanta discussões acerca do papel desta comunidade microbiana na evolução dos seus hospedeiros. Desta maneira, surgiram na literatura os conceitos de *holobionte* e *hologenoma* para descrever os consórcios compostos por um indivíduo e seus microorganismos associados e por estes genomas, respectivamente (Rosenberg e Rosenberg 2008). A Teoria do Hologenoma surgiu a partir da hipótese de que corais são capazes de se adaptar a ambientes desfavoráveis e resistir à infecção por patógenos através de mudanças na composição da comunidade microbiana associada (Rosenberg *et al.* 2007). Assim, os autores propõem que o holobionte seja considerado a unidade de seleção evolutiva, uma vez a interação entre hospedeiro e microbiota contribuiria significativamente para a adaptabilidade de ambas as partes (Rosenberg e Rosenberg 2008, 2016).

A Teoria do Hologenoma encontra-se fundamentada nas seguintes afirmações: (1) todos os animais e plantas possuem relações simbióticas com diversos microorganismos; (2) microorganismos podem ser transmitidos entre gerações; (3) a associação entre hospedeiro e microbiota afeta a adaptabilidade do holobionte em um dado ambiente e (4) a composição genética no holobionte pode modificar-se através da incorporação de diferentes simbiontes, podendo alterar-se mais rapidamente diante de mudanças ambientais do que o genoma do hospedeiro (Rosenberg e Rosenberg 2008). Assim, adaptações no holobionte ocorreriam através do processo de seleção natural de grupo (Ridley 2006), onde seriam favorecidas características que beneficiam a sobrevivência e reprodução do consórcio hospedeiro-microbiota como um todo (Rosenberg e Rosenberg 2008).

Esta teoria vem sendo alvo de críticas na comunidade científica no que diz respeito, por exemplo, às formas de transmissão da microbiota e à estabilidade da associação entre as espécies ao longo das gerações (Moran e Sloan 2015; Douglas e Werren 2016). A herdabilidade dos caracteres é um dos pressupostos fundamentais para o processo de seleção natural (Darwin 1859). Considerando a microbiota intestinal, por exemplo, assume-se que esta é adquirida principalmente de forma horizontal, a partir do ambiente e de fontes alimentares (Ley *et al.* 2008; Dillon e Dillon 2004; Engel e Moran 2013), com algumas evidências de transmissão vertical em insetos (Hosokawa *et al.* 2006; Favia *et al.* 2007; Crotti *et al.* 2009, por exemplo). Assim, a composição da microbiota seria variável entre as gerações, como observado por Dong *et al.* (2009), por exemplo.

Além disso, a Teoria do Hologenoma não considera o fato de que muitas bactérias que vivem em associação com animais e plantas também podem ser encontradas em vida livre no ambiente, ou seja, evoluem de acordo com pressões

seletivas sofridas nos diferentes nichos ecológicos que ocupam, independentemente de sua presença no hospedeiro (Douglas e Werren 2016). Outra questão relevante é que o conceito do holobionte requer que os interesses individuais dos organismos sejam superados em favor da adaptabilidade do grupo (West *et al.* 2015). Interações antagonistas entre bactérias da microbiota, tais como competição, modificação ambiental e produção de antimicrobianos, são consideradas importantes moduladores das comunidades microbiológicas associadas a animais e plantas (Fons *et al.* 2000). Além disso, alguns simbioses intracelulares transmitidos matematicamente, como a bactéria *Wolbachia*, presente em artrópodes e nematóides, são capazes de manipular a reprodução dos hospedeiros para facilitar a sua disseminação na população. A *Wolbachia* pode, por exemplo, causar a morte dos machos da prole, alterar a razão sexual em favor de fêmeas (feminização) ou inviabilizar o cruzamento entre fêmeas não-infectadas e machos infectados (incompatibilidade citoplasmática), a depender da espécie de hospedeiros em questão. Tais mecanismos resultam em um custo na adaptabilidade do hospedeiro em favor da reprodução e persistência deste simbiote na população destes invertebrados (Werren *et al.* 2008; Douglas e Werren 2016).

Deste modo, considerando os papéis essenciais que a microbiota pode desempenhar na biologia dos hospedeiros, alguns autores argumentam que animais e plantas podem se adaptar à convivência constante com certos tipos de microorganismos, assim como se adaptam às condições abióticas de um determinado ambiente (Moran e Sloan 2015). Ainda assim, um sistema hospedeiro-simbiote poderia constituir a unidade de seleção evolutiva (holobionte) em situações específicas, sobretudo aquelas envolvendo simbioses intracelulares obrigatórios transmitidos verticalmente (Moran e Sloan 2015; Douglas e Werren 2016). Este seria o caso, por exemplo, de bactérias presentes nas células de insetos fitófagos da ordem Hemíptera, como os afídeos. A

congruência entre a filogenia de simbioses e hospedeiros sugere uma história antiga de associação, durante a qual as bactérias sofreram uma drástica redução do tamanho do genoma, enquanto os insetos dependem de nutrientes, como aminoácidos, vitaminas e cofatores, produzidos pelos simbioses para sobreviver (Hansen e Moran 2014).

### **1.3.1. Influência da microbiota intestinal na biologia dos culicídeos**

Nos insetos, as principais estruturas colonizadas por bactérias são o lúmen do intestino médio e o ambiente intracelular (Douglas 2011), embora o divertículo (Gusmão *et al.* 2007), as glândulas salivares (Sharma *et al.* 2014), os túbulos de Malpighi (Chavshin *et al.* 2015) e os ovários (Gusmão *et al.* 2010) também alberguem estes microorganismos. O simbiote intracelular mais prevalente é *Wolbachia*, transmitida verticalmente e presente em cerca de 60% dos insetos (Oliveira *et al.* 2015). A descoberta de que cepas específicas de *Wolbachia* são capazes de reduzir a sobrevivência (Min e Benzer 1997) e bloquear infecções por vírus de RNA em drosófilas (Hedges *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2008) estimulou o emprego desta bactéria em estratégias de controle de arboviroses, como a dengue (McGraw e O'Neill 2013).

Curiosamente, populações naturais de *Ae. aegypti* nunca foram encontradas naturalmente infectadas por *Wolbachia* (Kittayapong *et al.* 2000). Desta maneira, diferentes linhagens da bactéria foram introduzidas neste mosquito através de microinjeções em embriões (Xi *et al.* 2005; McMeniman *et al.* 2009; Hoffman *et al.* 2011). As cepas wMelPop e wMel, isoladas a partir de *Drosophila melanogaster*, foram capazes de reduzir drasticamente a infecção de *Ae. aegypti* por DENV, CHIKV, *Plasmodium gallinaceum* (Moreira *et al.* 2009; Walker *et al.* 2011) e ZIKV (Dutra *et al.* 2016). Desta maneira, solturas de mosquitos com *Wolbachia* estão em curso no momento em diferentes países, incluindo o Brasil, com objetivo de substituir as

populações selvagens, com alta competência vetorial, por populações refratárias à infecção por arbovírus (Eliminate Dengue, 2016).

Assim como as bactérias intracelulares, microorganismos que colonizam o tubo digestivo também influenciam aspectos da fisiologia dos insetos, como a nutrição. Isto ocorre, por exemplo, na associação de cupins com bactérias e protozoários, os quais auxiliam na digestão da celulose, principal polissacarídeo presente nas fontes alimentares deste animal (Dillon e Dillon 2004). O papel da microbiota na nutrição dos insetos hematófagos ainda não é tão bem entendido, mas alguns estudos indicam que as bactérias podem fornecer vitaminas (Aksoy 2000) e/ou auxiliar na digestão do sangue (Gaio *et al.* 2011; Minard *et al.* 2012).

Nos culicídeos, a microbiota intestinal é essencial ao desenvolvimento e sobrevivência das formas imaturas, uma vez que larvas criadas em condições assépticas morrem rapidamente sem experimentar o processo natural de ecdise (Coon *et al.* 2014). Além disso, certos simbiossiontes específicos, como bactérias do gênero *Asaia*, possuem influência no tempo de desenvolvimento larvar de algumas espécies de *Anopheles* (Chouaia *et al.* 2012; Mitraka *et al.* 2013). A adição de bactérias inativadas não produz o mesmo efeito, o que sugere que estes microorganismos produzem nutrientes ou outras moléculas limitantes no criadouro e/ou auxiliam a digestão nas larvas (Mitraka *et al.* 2013).

Considerando as fêmeas adultas, o tratamento com antibióticos provocou um atraso significativo na digestão do sangue, verificado após a observação de um aumento significativo da quantidade de hemácias intactas no intestino 24, 36 e 48h após o repasto sanguíneo. Demonstrou-se que linhagens dos gêneros *Enterobacter* e *Serratia*, por exemplo, possuem forte atividade hemolítica, portanto auxiliariam no processo de digestão do sangue (Gaio *et al.* 2011). Uma vez que a hemoglobina é uma das principais

fontes proteicas empregadas na vitelogênese e maturação dos ovos (Clements 1992), a eliminação de parte da microbiota também se refletiu em uma redução significativa da fecundidade em *Ae. aegypti* (Gaio *et al.* 2011).

Linhagens do gênero *Acinetobacter*, recuperadas de populações selvagens e de laboratório de *Ae. albopictus*, tiveram o perfil metabólico caracterizado e comparado ao de cepas referência e linhagens ambientais. As bactérias recuperadas dos mosquitos adultos possuem características metabólicas possivelmente associadas ao comportamento alimentar do hospedeiro, incluindo, por exemplo, a capacidade de metabolizar aminoácidos presentes no sangue e moléculas de origem vegetal, como ácido 4-hidroxibenzoico e xilose, o que poderia auxiliar na digestão sanguínea e assimilação de carboidratos (Minard *et al.* 2012).

A colonização do intestino dos mosquitos por bactérias também pode influenciar a sobrevivência destes insetos. Uma linhagem do gênero *Chromobacterium*, obtida a partir do intestino de fêmeas de *Ae. aegypti* selvagens, foi capaz de colonizar com alta eficiência o intestino de fêmeas e larvas de *Ae. aegypti* e *Anopheles gambiae*, levando rapidamente a maioria dos insetos à morte (Ramirez *et al.* 2014). A colonização do intestino por *Serratia marcescens* também comprometeu a longevidade de fêmeas de *An. gambiae* (Bahia *et al.* 2014). As propriedades entomopatogênicas destas linhagens de *Chromobacterium* e *Serratia* sugerem a possibilidade de sua utilização futura no controle biológico de insetos vetores e pragas agrícolas (Ruiu 2015). Atualmente, variedades de *Bacillus thuringiensis* que produzem cristais tóxicos já são utilizadas no controle biológico de larvas de lepidópteros e mosquitos (Whalon e Wingerd 2003).

### **1.3.2. Influência da microbiota intestinal na competência vetorial**

Diante da influência da microbiota intestinal na biologia dos insetos, um dos aspectos que se destaca é a capacidade da comunidade microbiana de modular a infecção por organismos invasores, dentre eles patógenos transmitidos por vetores aos vertebrados (Azambuja *et al.* 2005; Cirimotich *et al.* 2011a). Após o tratamento com antibióticos, e consequente eliminação de parte da microbiota, *Ae. aegypti* e *An. gambiae* apresentaram maior susceptibilidade ao DENV e ao *Plasmodium*, respectivamente (Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009).

A proteção contra patógenos conferida pela microbiota pode ser resultado da ativação do sistema imune do inseto e/ou da interação direta das bactérias com o organismo invasor (Cirimotich *et al.* 2011a; Buffie e Palmer 2013). De maneira geral, o controle da proliferação da flora intestinal pode ocorrer através da produção de moléculas efetoras do sistema imunológico que também participam da resposta à infecção por microorganismos patogênicos, tais como reguladores das vias imunológicas, lectinas, peptídeos antimicrobianos, enzimas digestivas, óxido nítrico sintase e ativadores da cascata de profenoloxidase (Azambuja *et al.* 2005; Dong *et al.* 2006, 2009; Xi *et al.* 2008; Ramirez *et al.* 2012).

Considerando os culicídeos, Xi e colaboradores (2008) observaram que a comunidade microbiana intestinal de *Ae. aegypti* é capaz de induzir a expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos regulados por vias igualmente envolvidas na resposta antiviral ao DENV (Xi *et al.* 2008). De maneira similar, *An. gambiae* utiliza as mesmas moléculas efetoras do sistema imunológico (peptídeos antimicrobianos, lisozimas, receptores) para controlar a proliferação de bactérias e a infecção por *Plasmodium* (Dong *et al.* 2006, 2009). Em ambos os casos, a microbiota intestinal estimula um nível basal de ativação do sistema imune, o qual influencia a

susceptibilidade dos mosquitos aos patógenos e, conseqüentemente, a capacidade vetorial.

Além disso, os insetos vetores apresentam diferentes respostas à infecção de acordo com a diversidade de bactérias presentes no intestino (Cirimotich *et al.* 2011b; Apte-Deshpande *et al.* 2012, 2014; Ramirez *et al.* 2012, 2014; Bahia *et al.* 2014). A reintrodução dos gêneros *Paenibacillus*, *Proteus* e *Chromobacterium* em *Ae. aegypti* assépticos reduziu os níveis de infecção pelo DENV, fato atribuído ao aumento local e sistêmico da expressão de peptídeos antimicrobianos (Ramirez *et al.* 2012, 2014). Por outro lado, a colonização intestinal por *Aeromonas*, *Escherichia coli* e *S. marcescens* foi associada ao aumento da susceptibilidade ao DENV e/ou CHIKV no mesmo mosquito (Mourya *et al.* 2002; Apte-Deshpande *et al.* 2012, 2014). No caso da *S. marcescens*, os autores demonstraram que a proteína bacteriana P40 é capaz de interagir com receptores do epitélio intestinal possivelmente envolvidos no combate à infecção por DENV e CHIKV pelo mosquito. Desta maneira, o bloqueio destas moléculas pela P40 provavelmente permitiu que um maior número de partículas virais infectasse as células epiteliais do inseto (Apte-Deshpande *et al.* 2012, 2014).

Além da influência no sistema imune, bactérias intestinais também podem interagir diretamente com o patógeno, por exemplo, através da produção de toxinas, antimicrobianos, geração de radicais livres ou bloqueio físico de receptores no epitélio intestinal através da formação de biofilme (Azambuja *et al.* 2005; Cirimotich *et al.* 2011a). Uma linhagem do gênero *Enterobacter* foi capaz de inibir *in vitro* o desenvolvimento do *Plasmodium* através da produção de espécies reativas de oxigênio (Cirimotich *et al.* 2011b). Um efeito anti-*Plasmodium* similar foi observado em linhagens de *S. marcescens* e *Chromobacterium* por Bahia (2014) e Ramirez (2014) e colaboradores, respectivamente, porém os mecanismos moleculares envolvidos ainda

não foram esclarecidos. Ademais, estudos anteriores mostram que *S. marcensis* pode apresentar atividade tripanolítica, atribuída à produção do pigmento prodigiosina (Azambuja *et al.* 2004). Diversos gêneros bacterianos reduziram a infectividade do vírus La Crosse em cultura de células (Joyce *et al.* 2011) enquanto *Chromobacterium* mostrou atividade anti-DENV (Ramirez *et al.* 2014).

A percepção de que a susceptibilidade dos insetos vetores a patógenos pode variar de acordo com as bactérias presentes no lúmen intestinal pode auxiliar no entendimento da heterogeneidade intraespecífica na competência vetorial dos mosquitos. Seguindo este raciocínio, algumas populações ou indivíduos estariam mais aptos à transmissão de um dado patógeno de acordo com a composição da sua microbiota. Charan e colaboradores (2013) observaram que populações de *Ae. aegypti* selecionadas artificialmente para alta resistência e susceptibilidade ao DENV apresentam diferenças na composição da comunidade intestinal. Mesmo criados e mantidos em condições idênticas, os gêneros *Pedobacter* e *Janthinobacterium* foram recuperados exclusivamente da microbiota da população resistente ao passo que *Bacillus* foi detectado somente na população susceptível (Charan *et al.* 2013). Ademais, populações naturais de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, coletadas em áreas endêmicas e não-endêmicas para dengue na Índia, apresentaram diferenças na composição e níveis de diversidade da microbiota intestinal (Charan *et al.* 2016). Entretanto, nos dois casos, ainda é preciso investigar se tais diferenças se correlacionam com a capacidade vetorial.

O avanço no conhecimento acerca das interações envolvendo microbiota, patógeno e vetor vem estimulando a busca por novas ferramentas para reduzir a incidência de doenças, como arboviroses e malária. Uma vez que patógenos e bactérias compartilham o ambiente intestinal, a capacidade inata de alguns microorganismos em interferir na susceptibilidade do vetor poderia ser explorada para reduzir os níveis de

transmissão de arbovírus e *Plasmodium* (Azambuja *et al.* 2004; Cirimotich *et al.* 2011b; Ramirez *et al.* 2012, 2014; Bahia *et al.* 2014).

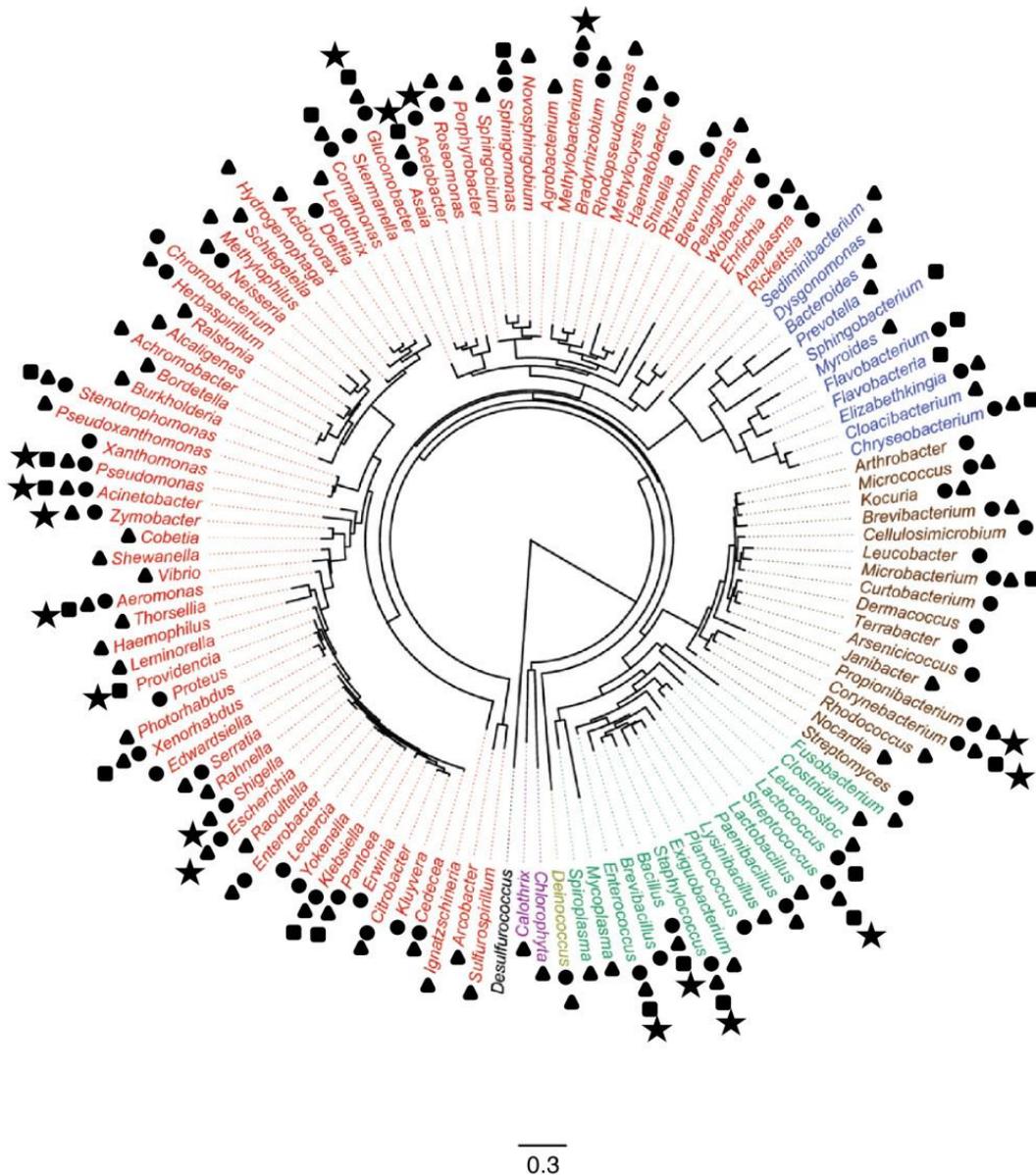
Uma segunda alternativa plausível é utilização de bactérias transformadas geneticamente para expressar e secretar moléculas antipatógeno no inseto vetor, abordagem conhecida como paratransgênese (Durvasula *et al.* 1997). Um repertório de proteínas efetoras anti-*Plasmodium* já foi identificado (Wang e Jacobs-Lorena 2013) e a expressão de algumas delas na bactéria *Pantoea agglomerans* reduziu a quantidade de oocistos em *An. gambiae* em até 94% (Wang *et al.* 2012). O maior desafio para aplicação da paratransgênese em campo ainda é a inserção em larga escala das bactérias nos mosquitos de populações naturais (Wang e Jacobs-Lorena 2013).

Buscando avançar neste sentido, a disseminação da bactéria *Asaia* transformada para expressar uma proteína fluorescente foi testada em *An. stephensi* e *An. gambiae* em condições de semi-campo (Mancini *et al.* 2016). Esta bactéria é considerada um bom candidato à paratransgênese devido à transmissão vertical, venérea e interestádios em *Anopheles* (Favia *et al.* 2007; Damiani *et al.* 2008). A liberação de machos infectados e a introdução de estações de alimentação açucarada contendo *Asaia* foram suficientes para que a bactéria fosse encontrada em 64-98% dos mosquitos adultos após 12-20 dias e em 78% das larvas da geração F1 (Mancini *et al.* 2016). Tais resultados demonstram a viabilidade do uso de bactérias da microbiota intestinal em estratégias de paratransgênese em ambientes confinados.

### **1.3.3. Determinantes da diversidade da microbiota intestinal de culicídeos**

Características fisiológicas e bioquímicas do sistema digestório das diferentes espécies de insetos, como condições de pH, potencial redox e enzimas digestivas, podem influenciar a composição da comunidade microbiana intestinal (Dillon e Dillon

2004). Ademais, a ecologia, ou seja, a distribuição geográfica, o hábitat, os tipos de criadouro larvar e os hospedeiros preferenciais dos culicídeos também são potencialmente relevantes, pois definiriam o perfil de nutrientes disponíveis no lúmen intestinal e quais grupos de bactérias o mosquito encontra no seu ambiente natural (Minard *et al.* 2013). A árvore filogenética elaborada por Minard e colaboradores (2013) apresenta os gêneros bacterianos identificados em mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* e *Mansonia* da família Culicidae (Figura 1.1).



- *Aedes* mosquitoes (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. bromeliae*, *Ae. triseriatus*)
- ▲ *Anopheles* mosquitoes (*An. albimanus*, *An. arabiensis*, *An. coustani*, *An. funestus*, *An. gambiae*, *An. maculipennis*, *An. stephensi*)
- *Culex* mosquitoes (*Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens*)
- ★ *Mansonia* mosquitoes (*M. africana*, *M. uniformis*)

Figura 1.1. Gêneros bacterianos indentificados em Culidade. A árvore foi construída com base na sequência do gene 16S rRNA. As cores dos ramos indicam os filos: Proteobacteria (vermelho), Bacteroidetes (azul), Actinobacteria (marrom), [Firmicutes, Tenericutes and Fusobacteria] (verde), Cyanobacteria (roxo) e Deinococcus-Thermus (amarelo). Adaptado de Minard *et al.* 2013.

Considerado um reservatório de diversidade microbiológica, o lúmen intestinal dos mosquitos é um ambiente dinâmico e sujeito a perturbações. De maneira geral, o tubo digestivo dos insetos pode ser dividido em intestinos anterior, médio e posterior. O primeiro e o último são de origem ectodérmica, por isso possuem um revestimento de cutícula, a qual é eliminada a cada ecdise (Clements 1992). Desta maneira, espera-se que a microbiota associada a estas regiões seja eliminada durante a metamorfose das fases imaturas.

Durante a fase de pupa, o canal alimentar da larva se degenera e origina o mecônio, uma estrutura envolvida por uma membrana que contém os restos do epitélio intestinal (Clements 1992), assim como microorganismos ali presentes anteriormente (Moll *et al.* 2001). O mecônio é eliminado 24-48h após a emergência do adulto (Romoser *et al.* 2000). Desta maneira, a forma alada emerge com intestino estéril ou contendo uma quantidade muito reduzida de bactérias (Moll *et al.* 2001; Lindh *et al.* 2008). Por outro lado, os túbulos de Malpighi, passam da larva para o adulto sem reorganização perceptível (Clements 1992) e parecem mediar a passagem de algumas bactérias da microbiota entre as diferentes fases do ciclo de vida dos mosquitos (Chavshin *et al.* 2015).

Outra característica do tubo digestivo de muitos insetos é a presença de uma membrana porosa e constituída de fibras de quitina embebidas em uma matriz de proteínas e carboidratos, denominada matriz ou membrana peritrófica (MP) (Terra 1990). São conhecidos dois tipos de MP (I e II), as quais apresentam mecanismos distintos de secreção. As larvas dos culicídeos possuem MP do tipo II, que é secretada continuamente por um grupo de células localizadas no início do intestino médio, formando um tubo contínuo que envolve o bolo alimentar. Já as fêmeas adultas

possuem a MP do tipo I, secretada por todo o epitélio intestinal e depositada ao redor do sangue ingerido (Terra 1990).

A MP divide o intestino em espaço endoperitrófico (região interna da MP) e ectoperitrófico (região entre a MP e o epitélio). Assim, a MP regula a passagem de moléculas entre estes compartimentos, concentra o alimento e as enzimas digestivas no mesmo local e protege o epitélio intestinal contra partículas abrasivas, toxinas e organismos patogênicos (Clements 1992; Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; Lehane 1997). Uma vez que os poros da MP permitem apenas a passagem de enzimas digestivas, nutrientes obtidos a partir da digestão do alimento e moléculas do sistema imune, os microorganismos que compõem a microbiota intestinal ficam restritos ao espaço endoperitrófico (Gusmão *et al.* 2010). Desta maneira, a MP protege o epitélio intestinal do contato direto com a microbiota, o que evitaria a ativação exacerbada do sistema imune do animal (Terra 1990; Engel e Noran 2013). Além disso, os insetos continuamente produzem e descartam a MP, o que possivelmente acarreta na eliminação frequente de parte da microbiota intestinal (Engel e Moran 2013).

O sistema imunológico é um dos principais moduladores da composição e abundância de bactérias presentes no tubo digestivo dos insetos (Azambuja *et al.* 2005; Engel e Moran 2015). A resposta imune dos invertebrados é comandada por três vias principais de sinalização: Toll, *Immune Deficiency* (IMD) e *Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK-STAT) (Lemaitre e Hoffman 2007). Dois mecanismos envolvidos na resposta humoral seriam majoritariamente ativados no epitélio intestinal na presença da microbiota: a expressão de peptídeos antimicrobianos (Lemaitre e Hoffman 2007; Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009; Vieira *et al.* 2014) e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Lemaitre e Hoffman 2007; Oliveira *et al.* 2013). Bactérias Gram-positivas e fungos ativam principalmente a via Toll, enquanto

bactérias Gram-negativas estimulam a via IMD, o que resulta na expressão de diferentes peptídeos antimicrobianos no tubo digestivo (Lemaitre e Hoffman 2007). Além disso, a geração regular de ROS no epitélio intestinal por proteínas Duox representa um mecanismo adicional de controle da proliferação de microorganismos (Lemaitre e Hoffman 2007; Oliveira *et al.* 2013).

O estágio de vida é outro importante determinante da composição da comunidade intestinal dos mosquitos (Rani *et al.* 2009; Kim *et al.* 2015), uma vez que larvas e adultos apresentam importantes diferenças quanto à sua fisiologia e o seu nicho ecológico: enquanto as primeiras são aquáticas e se alimentam de matéria orgânica, os últimos são terrestres e ingerem néctar e sangue (Clements 1992). Além disso, existem diferenças morfológicas e fisiológicas entre o sistema digestório das diferentes formas de vida dos culicídeos: as larvas, por exemplo, possuem expansões (cecos) localizadas no intestino anterior, as quais possuem células envolvidas na regulação osmótica. O lúmen do intestino médio das larvas de *Ae. aegypti* possui pH alcalino (pH  $\approx$  10) (Clements 1992; Boudko *et al.* 2001). Já os adultos possuem dois divertículos dorsais e um ventral (papo), cujas aberturas se localizam no final do intestino anterior. Diferentemente do sangue, a alimentação açucarada é estocada no divertículo ventral antes da digestão e absorção no intestino médio (Terra 1990; Clements 1992). O lúmen intestinal dos adultos de *Ae. aegypti* possui pH neutro a básico (pH = 7,4 a 8,0) (Billker *et al.* 2000), enquanto o divertículo ventral possui pH ligeiramente mais ácido (pH = 5,2 a 6,5) (Gusmão *et al.* 2007).

Assim, considerando um universo de 30 filos já descritos no domínio Eubacteria, a microbiota das larvas geralmente apresenta bactérias dos filos Cyanobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria enquanto a comunidade intestinal das fêmeas adultas é normalmente dominada por bactérias gram-negativas dos filos

Proteobacteria e Bacteroidetes (Wang *et al.* 2011; Dada *et al.* 2014; Kim *et al.* 2015). Além disso, algumas bactérias encontradas no tubo digestivo das larvas também são detectadas simultaneamente na água de seus criadouros, como os gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter* e *Escherichia*. Estes achados sugerem a influência do ambiente na composição da microbiota intestinal das formas imaturos (Wang *et al.* 2011; Coon *et al.* 2014; Dada *et al.* 2014; Kim *et al.* 2015).

A diversidade da microbiota também varia de acordo com o sexo dos mosquitos, possivelmente resultado de hábitos alimentares distintos (Rani *et al.* 2009; Zouache *et al.* 2011; Minard *et al.* 2012). Um estudo recente identificou os gêneros *Acinetobacter* e *Enterobacter* apenas em machos de *Ae. albopictus*, enquanto *Agrobacterium* foi encontrado somente em fêmeas da mesma espécie, por exemplo (Zouache *et al.* 2011).

Em *An. stephensi*, verificou-se a dominância do gênero *Paenibacillaceae* nos machos e de *S. marcescens* nas fêmeas (Rani *et al.* 2009).

Até mesmo a composição da comunidade intestinal de fêmeas adultas da mesma espécie se mostra variável entre as populações de mosquitos, sugerindo que pelo menos parte das bactérias é adquirida do ambiente, a partir do criadouro larvar e/ou fontes alimentares (Zouache *et al.* 2011; Kim *et al.* 2015). Por meio da avaliação individual da diversidade da microbiota de fêmeas de culicídeos, Osei-Poku e colaboradores (2012) concluíram que indivíduos da mesma espécie apresentam variações significativas na composição da microbiota, sem diferenças consistentes entre as espécies de mosquitos. Apesar dos fortes indícios da contribuição ambiental na diversidade da microbiota, ainda não se sabe quais parâmetros bióticos e abióticos do hábitat se correlacionariam com os taxa bacterianos presentes no tubo digestivo dos culicídeos.

A dieta também parece modular a microbiota intestinal, uma vez que a ingestão de sangue foi associada a uma redução da diversidade, ao aumento da abundância

relativa da família Enterobacteriaceae e à diminuição de Flavobacteriaceae em *An. gambiae* (Wang *et al.* 2011). Em *Ae. aegypti*, os gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* foram isolados apenas de fêmeas alimentadas com açúcar, enquanto *Serratia* e *Klebsiella* também foram recuperados ao longo da digestão do sangue (Gusmão *et al.* 2010).

A infecção por arbovírus também influencia a composição da comunidade microbiana do intestino. Zouache e colaboradores (2012) observaram que *Ae. albopictus* infectados por CHIKV possuem maior abundância relativa das classes bacterianas Beta- e Gammaproteobacteria e menor de Alphaproteobacteria. Já em *Culex pipiens*, a infecção pelo vírus do Oeste do Nilo (WNV) foi associada a um incremento nos índices de diversidade da microbiota intestinal, com o aumento consistente de *Serratia* nas fêmeas infectadas (Zink *et al.* 2015). Por fim, a diversidade genética de populações de *Ae. albopictus* foi correlacionada positivamente com a diversidade da comunidade microbiana associada a este mosquito, sugerindo a influência de fatores genéticos do hospedeiro na modulação da comunidade intestinal (Minard *et al.* 2015).

Apesar de alguns estudos descreverem variações na composição da microbiota dos culicídeos em função dos fatores supramencionados, ainda não se sabe qual o impacto destas mudanças no papel funcional das bactérias na biologia dos mosquitos. Além disso, contrastando com a complexidade aparentemente associada à formação da comunidade microbiana intestinal, certos gêneros de bactérias são frequentemente encontrados no intestino dos culicídeos, como, por exemplo, *Asaia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia* (Gusmão *et al.* 2010; Zouache *et al.* 2011; Ramirez *et al.* 2012; Terenius *et al.* 2012; Osei-Poku *et al.* 2012; Coon *et al.* 2014; Minard *et al.* 2015). Considerando o *Aedes aegypti*, estas bactérias têm sido detectadas tanto em imaturos e adultos mantidos em laboratório quanto em mosquitos coletados no campo (Tabelas 1.1 e 1.2).

Tabela 1.1. Gêneros bacterianos identificados na microbiota de *Ae. aegypti* aplicando-se de metodologias dependentes do cultivo bacteriano.

| Origem da população | Linhagem ou local de coleta | Fase do ciclo de vida | Sexo            | Meios de cultura/ Condições de incubação   | Tamanho amostral total          | Gêneros bacterianos identificados  | Referência bibliográfica          |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------|--|---------------------------------|--|-----------------------------------|
| Laboratório         | Rockefeller (Brasil)        | Adultos               | Fêmeas          | BHI-agar a 28°C                            | 35 divertículos ventrais        | <i>Bacillus, Pichia, Serratia</i>  | Gusmão <i>et al.</i> 2007         |
| Laboratório         | Rockefeller (Brasil)        | Adultos               | Fêmeas          | BHI-agar a 28°C                            | 300 intestinos médios           | <i>Asaia, Bacillus, Enterobacter, Enterococcus, Klebsiella, Pichia, Serratia</i>   | Gusmão <i>et al.</i> 2010         |
| Natural             | Madagascar                  | Adultos               | Machos e fêmeas | Meios LB-agar modificado e PYC-agar a 26°C | 04 indivíduos inteiros por sexo | <i>Bacillus</i>  | Zouache <i>et al.</i> 2010        |
| Natural             | Índia                       | Larvas L3 e L4        | -               | Nutriente-agar                             | 15 intestinos médios            | <i>Aeromonas, Bacillus, Brevibacillus, Burkholderia, Edwardsiella, Pantoea, Pseudomonas, Serratia</i>  | Apte-Deshpande <i>et al.</i> 2012 |
| Laboratório         | MCC, NCL e AFMC (Índia)     | Larvas L3 e L4        | -               | Nutriente-agar                             | 15 intestinos médios            | <i>Aeromonas, Burkholderia, Enterobacter, Microbacterium, Pantoea, Pseudomonas, Serratia</i>   | Apte-Deshpande <i>et al.</i> 2012 |
| Natural             | Panamá                      | Adultos               | Fêmeas          | LB-agar                                    | Não informado (intestino)       | <i>Acetobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Asaia, Bacillus, Chromobacterium, Chryseobacterium, Comamonas, Enterobacter, Lactococcus, Leclercia, Micrococcus, Paenibacillus, Pantoea, Proteus, Pseudomonas, Roseomonas, Serratia, Shigella, Shinella, Staphylococcus</i> | Ramirez <i>et al.</i> 2012        |
| Laboratório         | Rockefeller (USA)           | Adultos               | Fêmeas          | LB-agar                                    | Não informado (intestino)       | <i>Asaia, Elizabethkingia, Pantoea, Serratia</i>   | Ramirez <i>et al.</i> 2012        |

|             |             |         |        |  |                      |   |                             |
|-------------|-------------|---------|--------|--|----------------------|---|-----------------------------|
| Laboratório | Rockefeller | Adultos | Fêmeas | TSA sangue-agar  | 94 abdomens          | <i>Burkholderiaceae, Elizabethkingia, Enterococcus, Klebsiella, Pantoea, Serratia, Shingomonas</i>                              | Terenius <i>et al.</i> 2012 |
| Natural     | Índia       | Adultos | Fêmeas | Nutriente-agar   | 30 intestinos médios | <i>Aeromonas, Enterobacter, Klebsiella, Lysinibacillus, Micrococcus, Pantoea, Pseudomonas, Staphylococcus, Stenotrophomonas</i> | Yadav <i>et al.</i> 2015    |
| Natural     | Índia       | Adultos | Fêmeas | Caldo de lisogenia-agar, TSA-agar e Columbia sangue-agar | 31 intestinos médios | <i>Bacillus, Enterococcus, Exiguobacterium, Pseumonas, Staphylococcus, Yersinia</i>   | Charan <i>et al.</i> 2016   |

LB: Luria-Bertani; PYC: peptona, extrato de levedura e CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; BHI: *brain heart infusion*; TSA: triptona de soja agar.

Tabela 1.2. Gêneros bacterianos identificados na microbiota de *Ae. aegypti* aplicando-se de metodologias independentes do cultivo bacteriano.

| <b>Origem da população</b> | <b>Linhagem ou local de coleta</b> | <b>Fase do ciclo de vida</b> | <b>Sexo</b>     | <b>Método de identificação bacteriana</b> | <b>Tamanho amostral</b>        | <b>Gêneros bacterianos encontrados</b>  | <b>Referência bibliográfica</b> |
|----------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------|---|--------------------------------|---|---------------------------------|
| Natural                    | Madagascar                         | Adultos                      | Machos e fêmeas | PCR-DGGE                                  | 05 fêmeas e 04 machos inteiros | <i>Asaia, Acinetobacter, Enterobacter, Pseudomonas, Staphylococcus</i>  | Zouache <i>et al.</i> 2010      |
| Laboratório                | Brasil                             | Adultos                      | Fêmeas          | Clonagem                                  | 100 intestinos médios          | <i>Cedecea, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Kluyvera, Pantoea, Pichia, Serratia,</i>   | Gusmão <i>et al.</i> 2010       |
| Natural                    | Quênia                             | Adultos                      | Fêmeas          | Sequenciamento de alta vazão              | 10 intestinos médios           | <i>Acetobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Asaia, Bacillus, Chryseobacterium, Corynebacterium, Enterococcus, Escherichia/Shiguella, Gluconobacter, Lactococcus, Methylobacterium, Micrococcus, Pantoea, Propionibacterium, Providencia, Pseudomonas, Sphingomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Zymobacter</i> | Osei-Poku <i>et al.</i> 2012    |
| Laboratório                | Moyo (Quênia)                      | Adultos                      | Fêmeas          | Clonagem                                  | 15 intestinos médios           | <i>Bacillus, Pedobacter, Pseudomona, Rahnella,</i>  | Charan <i>et al.</i> 2013       |
| Laboratório                | Não informado                      | Larvas L4                    | -               | Sequenciamento de alta vazão              | 40 larvas inteiras             | Flavobacteriaceae, Microbacteriaceae, Sphingobacteriales*   | Coon <i>et al.</i> 2014         |
| Laboratório                | Não informado                      | Adultos                      | Fêmeas          | Sequenciamento de alta vazão              | 120 indivíduos inteiros        | Comamonadaceae, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Microbacteriaceae, Propionibacteriaceae, Paenibacillus, Sphingobacteriales*  | Coon <i>et al.</i> 2014         |
| Natural                    | Tailândia e                        | Larvas L4                    | -               | TTGE                                      | 18 amostras com                | <i>Brevibacillus, Clostridium,</i>  | Dada <i>et al.</i>              |

|         |       |         |        |          |                        |  |                           |
|---------|-------|---------|--------|----------|------------------------|--|---------------------------|
|         | Laos  |         |        |          | até 10 larvas inteiras |  | 2014                      |
| Natural | Índia | Adultos | Fêmeas | Clonagem | 31 intestinos médios   | <i>Aeromonas, Bacillus, Burkholderia, Moraxella, Pseudomonas, Sphingomonas, Serratia</i> | Charan <i>et al.</i> 2016 |

\*Classificação taxonômica indicada apenas ao nível de família, com exceção de *Paenibacillus*. DGGE: *Denaturing Gradient Gel*

*Electrophoresis*; TTGE: *Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis*.

## **1.4. Identificação da diversidade bacteriana da microbiota**

### **1.4.1. Identificação taxonômica de bactérias**

Um campo substancial do estudo das interações entre organismos superiores e sua microbiota associada envolve a descrição da diversidade de uma comunidade de microorganismos que habita em um determinado órgão ou compartimento do hospedeiro. A comunidade microbiana presente no trato digestivo dos culicídeos pode conter protozoários, fungos, arqueas e bactérias (Gusmão *et al.* 2010; Chandler *et al.* 2015). Entretanto, assume-se que este último grupo representa a maioria dos microorganismos presentes neste órgão (Engel e Moran 2015). Desta maneira, a maioria dos estudos envolve a determinação da identidade das bactérias da microbiota como membros de táxons já descritos ou de grupos taxonômicos ainda desconhecidos (ex: Gusmão *et al.* 2007, 2010; Rani *et al.* 2009; Bossière *et al.* 2012; Ramirez *et al.* 2012; Minard *et al.* 2014).

Atualmente, o estudo da filogenia e a classificação e identificação taxonômica de bactérias envolve o uso de marcadores moleculares, dentre os quais estão os genes ribossomais (Vandamme *et al.* 1996). O mais utilizado é o gene que codifica o 16S rRNA (~1500 pb) (Head *et al.* 1998), que compõe a subunidade menor (30S) do ribossomo dos procariotos (Alberts *et al.* 2008). Este gene é considerado um bom marcador molecular porque está universalmente distribuído nos procariotos, dado o seu caráter essencial à sobrevivência destes microorganismos (Head *et al.* 1998). Além disso, apresenta nove regiões variáveis com diversificação suficiente para permitir a utilização da sua sequência como ferramenta de classificação e identificação taxonômica, enquanto também possui regiões conservadas, que possibilitam o desenho de iniciadores "universais" ou até mesmo específicos para certos grupos taxonômicos de

bactérias (Head *et al.* 1998) (Figura 1.2). Desta maneira, a identificação da bactéria se daria através da comparação da sequências do gene 16S rRNA com sequências depositadas em bancos de dados de referência, como o *Ribosomal Database Project* (RDP), GenBank-NCBI, Greengenes e Silva.



Figura 1.2. Esquema do gene 16S rRNA ilustrando as regiões conservadas e as regiões variáveis V1-V9. Adaptado de <http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>

O gene 16S rRNA pode ser resolutivo quanto a família à, em alguns casos, ao gênero da bactéria (Stackebrandt e Goebel 1994; Rosselló-Mora e Amann 2001). A identificação molecular ao nível de espécie deverá envolver a análise de um conjunto mais amplo de genes ubíquos daquele taxa bacteriano. Uma das técnicas aplicadas para tal objetivo é a Análise de Sequências Multilocus (*Multilocus Sequence Analysis* - MLSA). Geralmente, as bactérias são identificadas primeiramente a partir da sequência do gene 16S rRNA para determinação do gênero, informação que definirá a quantidade e quais loci serão utilizados no MLSA. A sequência de diferentes genes continuamente expressos naquele taxa (ditos *housekeeping*) são amplificados, sequenciados e concatenados para a construção de árvores filogenéticas e a identificação das espécies (Glaeser e Kampfer 2015).

Assim, dada a complexidade na classificação e identificação de espécies bacterianas, a caracterização ecológica de comunidades de microorganismos é frequentemente realizada na prática por meio de classificação das linhagens ao nível taxonômico de família ou gênero com base na sequência do gene 16S rRNA. Além

disso, também é comum agrupar as bactérias em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) baseando-se em um nível arbitrário mínimo de similaridade na sequência do gene 16S rRNA. Geralmente, os fluxogramas padrão de análise de diversidade de comunidades bacterianas recomendam que sequências com até 3% de distância (ou 97% de similaridade mínima) sejam agrupadas em uma mesma UTO (Lozupone e Knight 2007; Schloss *et al.* 2009; Caporaso *et al.* 2010). Esta abordagem é especialmente útil quando se trata de microorganismos ainda não descritos, grupos candidatos e/ou não cultiváveis (Schloss e Westcott 2011).

#### **1.4.2. Análise da diversidade de comunidades bacterianas**

Atualmente, quantidade e abundância relativa de UTOs é a informação mais utilizada para análises ecológicas de comunidades de microorganismos, as quais incluem, por exemplo, a análise de rarefação, cálculo de métricas de diversidade e estimativas de riqueza total (Lozupone e Knight 2007; Minard *et al.* 2014). A curva de rarefação de uma amostra, por exemplo, representa a quantidade cumulativa de UTOs detectadas *versus* o esforço amostral, ou seja, o número de sequências do gene 16S rRNA geradas (Magurran 2004; Hughes e Hellmann 2005). Visto que a taxa de detecção de novos grupos de organismos diminui com o aumento do esforço amostral, assume-se a curva atinge a saturação (ou platô) quando a grande maioria das espécies já foi detectada (Magurran 2004; Gotelli e Cowell 2011). Além disso, também pode-se comparar visualmente a diversidade biológica de diferentes amostras, dado um certo esforço amostral (Hughes e Hellmann 2005).

A diversidade de uma comunidade de organismos é normalmente descrita através de medidas de riqueza de espécies (quantidade), heterogeneidade (abundância relativa) e métricas que combinam estas duas medidas em um único valor, denominadas

índices de diversidade (Magurran 2004). Apesar da informação taxonômica ao nível de espécies estar contido na maioria das fórmulas para os cálculo de diversidade, qualquer taxa ou agrupamento os indivíduos pode ser utilizado, inclusive UTOs, desde que se mantenha um padrão para todas as comunidades analisadas. Muitos índices estão disponíveis na literatura, mas, tradicionalmente, os mais utilizados são os índices de Shannon (H') e Simpson (D). O primeiro pode ser calculado através da fórmula:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

Onde  $p_i$  é a proporção de indivíduos da inésima espécie. Assim, quanto maior o número de espécies e menor a abundância relativa das mesmas, ou seja, mais heterogênea a comunidade, maior será o valor de H'. A partir de H' pode se obter o valor de equitabilidade (J'), uma medida de quão equilibrada é a distribuição das espécies na comunidade. A equitabilidade pode ser calculada através da fórmula:

$$J' = H'/H'_{\max} = H'/\ln S$$

Onde  $H'_{\max}$  é o valor máximo de H' para aquela riqueza de espécies (S), o qual seria obtido caso todas as espécies tivessem a mesma abundância, ou seja,  $\ln S$ . Já o índice de Simpson (D) indica a probabilidade de dois indivíduos amostrados ao acaso sejam da mesma espécie. Deste modo, quanto mais rica e heterogênea uma comunidade de organismos menor é o valor de D, calculdo através da fórmula:

$$D = -\sum p_i^2$$

Onde  $p_i$  é a proporção de indivíduos da inésima espécie. Para tornar a interpretação mais intuitiva, representa-se o inverso do índice de Simpson (1/D), onde quanto maior do valor de 1/D maior a diversidade da comunidade amostrada (Magurran 2004).

Por fim, uma vez que é virtualmente impossível amostrar todos os indivíduos de uma comunidade biológica, é possível estimar matematicamente a riqueza total de

espécies a partir de uma amostra de organismos (Magurran 2004; Gotelli e Cowell 2011). Dois tipos de dados podem ser utilizados para estimativas de riqueza: dados de abundância das diferentes espécies (Gotelli e Cowell 2011) e dados de incidência (presença ou ausência). Resumidamente, estimadores que utilizam dados de abundância se baseiam na proporção de espécies únicas ou raras em relação às espécies abundantes, ultrapassando mais o valor de riqueza observado (amostral) quanto maior for a proporção de espécies representadas por um ou poucos indivíduos. Em outras palavras, quanto melhor a qualidade do inventário, menor deve ser a proporção de grupos taxonômicos únicos ou raros, ou seja, mais a riqueza de espécies da amostra se aproximaria do valor real (Magurran 2004). Já os estimadores que utilizam dados de incidência se baseiam na proporção de espécies que são detectadas uma única vez em relação às espécies que são detectadas duas ou mais vezes em repetidas amostras de uma mesma comunidade (Gotelli e Cowell 2011).

#### **1.4.3. Abordagens metodológicas para o estudo da diversidade bacteriana**

Diferentes abordagens podem ser aplicadas com o objetivo de identificar a diversidade de bactérias de uma comunidade através da sequência do gene 16S rRNA, as quais podem ser divididas em dependentes e independentes do cultivo bacteriano (Zoetendal *et al.* 2004; Faher *et al.* 2012). O primeiro grupo corresponde ao isolamento das bactérias sob cultivo em variadas condições (meio de cultura, temperatura, tempo, por exemplo). As diferentes colônias, caracterizadas inicialmente por sua morfologia, podem ser identificadas ao nível de gênero através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA a partir de colônias puras preservadas (Roselló-Mora e Amman 2001; Allen-Vercoe 2013).

Entretanto, estima-se que uma fração minoritária das bactérias de um dado hábitat seja cultivável por meio das técnicas disponíveis atualmente (Rappé e Giovannoni 2003). Assim, as metodologias independentes do cultivo permitem acessar a composição taxonômica de uma comunidade bacteriana por meio da análise dos fragmentos do gene 16S rRNA presentes no DNA total das amostras, sem que haja a necessidade do cultivo bacteriano (Zoetendal *et al.* 2004; Faher *et al.* 2012). Deste modo, é possível inferir a diversidade de bactérias através de metodologias indiretas, como o *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) e *Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (TTGE) (Tabela 1.2), as quais permitem a obtenção de perfis por meio da separação por eletroforese dos fragmentos de DNA resultantes da amplificação do 16S rRNA, utilizando desnaturantes químicos ou gradientes de temperatura, respectivamente (Zoetendal *et al.* 2004; Faher *et al.* 2012).

A identificação taxonômica das bactérias também pode ser realizada diretamente através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Atualmente, a abordagem mais abrangente para tal objetivo é o sequenciamento de alto desempenho de bibliotecas de 16S rRNA (sequenciamento sítio-dirigido ou *amplicon-seq*), construídas por meio da amplificação de regiões variáveis deste gene utilizando-se iniciadores universais (Edwards *et al.* 2006; Claesson *et al.* 2010; Caporaso *et al.* 2011). Após a aplicação de filtros de qualidade, a diversidade de bactérias é determinada através da comparação das sequências obtidas com bancos de dados de 16S rRNA de referência, utilizando-se ferramentas de bioinformática (Schloss *et al.* 2009; Caporaso *et al.* 2010)

Uma outra metodologia cada vez mais utilizada é a recuperação de fragmentos do gene 16S rRNA a partir do sequenciamento do DNA total das amostras (sequenciamento metagenômico) (Logares *et al.* 2014; Chandler *et al.* 2015). Um estudo recente demonstrou que o sequenciamento metagenômico é capaz de fornecer

informações satisfatórias acerca da composição e diversidade microbiana, uma vez que evitaria o viés introduzido pelo anelamento diferencial de iniciadores com certos taxa de bactérias durante a etapa de PCR do gene 16S rRNA. Além disso, este tipo de análise também pode fornecer dados sobre a diversidade de fungos e protozoários, além de prover informações acerca do perfil funcional da comunidade microbiana (Logares *et al.* 2014; Chandler *et al.* 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

A emergência de arboviroses como um importante problema de saúde pública está em muito ligada a atividades antrópicas, que acabam por criar condições adequadas para a disseminação e proliferação de insetos vetores. Deste modo, o crescimento urbano desordenado leva a elevadas densidades humanas e à precariedade dos sistemas de saneamento básico, abastecimento de água e coleta de lixo. Tais condições favorecem uma grande disponibilidade de fontes sanguíneas e recipientes artificiais que podem servir como criadouros para que mosquitos antropofílicos depositem seus ovos (Gubler e Kuno 1997).

Dentre as espécies de culicídeos de maior impacto na saúde humana está o *Ae. aegypti*. Fêmeas desta espécie provavelmente estão envolvidas na transmissão vetorial de pelo menos três arbovírus no cenário urbano tropical e subtropical atual: DENV, CHIKV e ZIKV. Uma vez que ainda não há vacinas amplamente disponíveis para a imunização da população humana contra nenhum destes vírus, o único meio disponível para mitigar sua transmissão é o controle vetorial (Gubler 1998; Morrison *et al.* 2008).

Pelo menos nos últimos cem anos, programas de controle do *Ae. aegypti* foram pautados principalmente no uso de inseticidas químicos, o que levou à seleção de populações resistentes às principais classes de compostos disponíveis no mercado atualmente (Hemingway e Ranson 2000). Tal cenário revelou a necessidade urgente do desenvolvimento de novas estratégias que busquem reduzir a população de vetores e/ou sua capacidade de transmitir os arbovírus (Maciel-de-Freitas *et al.* 2012; McGraw e O' Neill 2013).

Dentre as estratégias inovadoras de redução da transmissão de arboviroses, está a substituição de populações naturais de *Ae. aegypti*, altamente competentes a arbovírus,

por populações de mosquitos menos susceptíveis à infecção (McGraw e O' Neill 2013). Dentre as abordagens mais discutidas atualmente está a soltura de insetos refratários geneticamente modificados (Franz *et al.* 2006) ou que carregam simbiontes capazes de interferir no curso da infecção viral, como a bactéria intracelular *Wolbachia* (Hoffman *et al.* 2011). Independentemente da abordagem de controle empregada, é imperativo desvendar os fatores que influenciam a CV dos mosquitos aos arbovírus, uma vez que esta representa o componente entomológico da taxa de reprodução básica da infecção viral.

Recentemente, a microbiota intestinal emergiu como um componente chave da competência vetorial a arbovírus, pois a resposta imunológica deflagrada pela presença de microorganismos comensais no tubo digestivo é mediada por genes envolvidos também na resposta antiviral (Xi *et al.* 2008). Além disso, o intestino de *Ae. aegypti* pode albergar certas bactérias com a habilidade inata de interferir direta ou indiretamente na replicação viral, como por exemplo linhagens dos gêneros *Paenibacillus*, *Proteus* e *Chromobacterium* (Ramirez *et al.* 2012, 2014). Neste cenário, a variabilidade populacional e individual da composição da microbiota de *Ae. aegypti* (Ramirez *et al.* 2012; Osei-Poku *et al.* 2012) tem o potencial de influenciar a heterogeneidade na competência vetorial deste mosquito (Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2004).

Apesar do aumento recente de estudos envolvendo as interações entre mosquito e microbiota, as consequências da colonização do intestino por bactérias na biologia, adaptabilidade e evolução de *Ae. aegypti* ainda é pouco explorada. Para avançar neste sentido, é necessário investigar também quais fatores bióticos e abióticos determinam a diversidade da microbiota intestinal, inclusive no contexto da emergência recente de arbovírus como CHIKV e ZIKV. Além disso, a comunidade microbiana intestinal dos

culicídeos vetores possui um alto potencial biotecnológico, pois consiste em uma possível fonte de microorganismos que podem ser aplicados no estudo da competência vetorial e futuramente na redução da transmissão de patógenos (Ricci *et al.* 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar aspectos das interações envolvendo o vetor *Ae. aegypti*, a microbiota intestinal e arbovírus.

#### **3.2. Objetivos específicos**

I. Investigar a diversidade bacteriana cultivável e não cultivável da microbiota intestinal de *Ae. aegypti*;

II. Investigar os possíveis efeitos do ambiente, dieta e idade de fêmeas de *Ae. aegypti* em condições naturais e de laboratório na diversidade da microbiota;

III. Avaliar a influência de bactérias recuperadas da microbiota intestinal na biologia do vetor;

IV. Estudar aspectos quantitativos da interação tripartite envolvendo *Ae. aegypti*, a microbiota intestinal e o vírus chikungunya.

## **4. CAPÍTULO I - Efeitos do ambiente, dieta e idade na microbiota do mosquito vetor do dengue: evidências da estabilidade da microbiota ao longo da vida adulta de *Aedes aegypti***

### **4.1. Justificativa**

A diversidade da microbiota de mosquitos adultos do gênero *Aedes* foi associada à dieta (Gusmão *et al.* 2010; Terenius *et al.* 2012) e ao status de infecção pelo CHIKV (Zouache *et al.* 2012), em laboratório, e à diversidade genética da população de hospedeiros em condições naturais (Minard *et al.* 2015). O hábitat também é um importante determinante da composição da comunidade intestinal, uma vez que a variação intraespecífica da microbiota é atribuída à aquisição de bactérias do ambiente (Zouache *et al.* 2011; Osei-Poku *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015).

Buscando conhecer melhor a dinâmica da microbiota em condições naturais, o presente estudo investigou a diversidade bacteriana intestinal ao longo da vida adulta de fêmeas de *Ae. aegypti*. Visto que o ambiente parece ser um importante determinante desta diversidade (Zouache *et al.* 2011; Osei-Poku *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015), nós investigamos se a liberação em ambiente urbano de mosquitos criados em condições padronizadas no laboratório, resultaria em mudanças significativas na diversidade da comunidade intestinal ao longo do tempo. Para tal, foi empregado um experimento de marcação-soltura-recaptura, uma poderosa ferramenta adequada ao estudo da ecologia de uma espécie no seu hábitat natural. Nós também caracterizamos a diversidade da microbiota de acordo com a dieta (apenas açúcar ou acrescido de ingestão de sangue) e a idade em laboratório, assim como em insetos provenientes da população selvagem, ou seja, oriundos de criadouros naturais de *Ae. aegypti*.

## 4.2. Metodologia

**Área de estudo.** O estudo foi conduzido em uma seção de 15 quarteirões em Vila Valqueire, um bairro de classe média da zona norte da cidade do Rio de Janeiro (22°53'09"S; 43°21'59" O). A região é circundada por uma floresta secundária, possui ruas asfaltadas e abastecimento de água e coleta de lixo regulares. A área de estudo possui 410 casas, a sua maioria com 3-4 quartos e quintal amplo. A densidade humana é de 74,2 habitantes/hectare. Historicamente, a região é altamente infestada pelo *Ae. aegypti* com epidemias de dengue a cada 3-4 anos. O monitoramento semanal da infestação por dois anos consecutivos indicou uma infestação média de 4,0 e 9,7 fêmeas de *Ae. aegypti* por residência por semana nas estações seca (maio-setembro) e chuvosa (novembro-março), respectivamente. Caixas d'água e baldes foram os criadouros mais produtivos para esta espécie (Dutra *et al.* 2015).

**Experimento de marcação-soltura-recaptura.** Mosquitos *Ae. aegypti* (geração F1) foram derivados de uma colônia de laboratório estabelecida após a coleta de ovos em Vila Valqueire. Para tal, foram distribuídas uniformemente no bairro 40 armadilhas de ovos (ovitampas) com o objetivo de coletar uma amostra representativa da variabilidade genética da população local. As larvas foram alimentadas com ração comercial para peixe (Tetramin®). Os adultos foram alimentados *ad libitum* com uma solução 10% de sacarose. Machos e fêmeas foram mantidos na mesma gaiola por 72 horas no laboratório (25 ± 5°C e 60 ± 10% UR) para estimular a cópula.

Antes da soltura, fêmeas de três dias de idade, alimentadas apenas com açúcar, foram pintadas com pó fluorescente (Day-Glo Color Corp, Cleveland, OH, USA) e liberadas logo em seguida em uma praça em Vila Valqueire. As coletas diárias foram realizadas com aspiradores costais (John W. Hock, Gainesville, FL, USA) e começaram

no dia seguinte à soltura. Diariamente, 15 casas em um raio de 500m a partir do ponto de soltura foram selecionadas aleatoriamente para aspiração por 15-20 minutos cada, incluindo o ambiente peridoméstico. As fêmeas capturadas foram transportadas vivas para o laboratório, anestesiadas em gelo e checadas em luz UV para a presença da marcação fluorescente. As capturas cessaram quando nenhuma fêmea marcada foi capturada por três dias consecutivos.

**Amostras da microbiota intestinal.** A diversidade bacteriana da microbiota de fêmeas de *Ae. aegypti* coletadas no campo foi avaliada através do pirosequenciamento do gene do 16S rRNA em (a) fêmeas marcadas e recapturadas (MSR) em dois, quatro, seis, sete e oito dias após a soltura (DAS) e (b) fêmeas selvagens de Vila Valqueire (SV). A investigação em insetos selvagens, ou seja, não marcados, foi realizada para avaliar os efeitos da criação das fêmeas em laboratório na composição da microbiota. A maioria dos insetos recapturados durante o experimento (81%) apresentou traços de sangue no intestino médio, o que se tornou uma condição para a investigação da microbiota. O isolamento bacteriano foi feito em todos os grupos, exceto SV (Tabela 4.1).

Mosquitos da mesma geração e criação utilizada na soltura no campo foram mantidos em laboratório, onde se avaliou a microbiota de (c) fêmeas jovens (três dias pós-emersão) alimentadas com açúcar (FJA), (b) fêmeas jovens alimentadas com açúcar e 24h após a ingestão de sangue (FJS), (c) fêmeas senis (38 dias pós-emersão) alimentadas apenas com açúcar (FSA) (Tabela 4.1). Este desenho experimental permitiu estudar o efeito da dieta na diversidade da microbiota. Além disso, pretendíamos também investigar o efeito da idade na diversidade da microbiota; para tanto, optamos por amostrar adultos mantidos exclusivamente no laboratório 38 dias pós-emersão, já

que as capturas em experimentos de marcação-soltura-recaptura raramente ocorrem por mais de 10 dias.

Tabela 4.1. Caracterização dos grupos de *Ae. aegypti* selecionados para investigação da diversidade da microbiota intestinal através do pirosequenciamento do gene 16S rRNA e isolamento bacteriano.

| Grupo (sigla)                                       | Idade (dias)  | Dieta           | N amostras | Mosquitos analisados | Identificação das amostras   |
|---|---------------|-----------------|------------|----------------------|--|
| Fêmeas jovens alimentadas com açúcar (FJA)          | 3             | Açúcar          | 4          | 8                    | FJA1, FJA2, FJA3, FJA4   |
| Fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue (FJS) | 3             | Açúcar + sangue | 2          | 4                    | FJS1, FJS2   |
| Fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar (FSA)    | 38            | Açúcar          | 4          | 8                    | FSA1, FSA2, FSA3, FSA4   |
| Fêmeas marcadas e recapturadas (MSR) *              | 5 a 11        | Açúcar + sangue | 8          | 15                   | DoisDAS1, DoisDAS2, QuatroDAS1, QuatroDAS2, SeisDAS1, SeisDAS2, SeteDAS, OitoDAS |
| Selvagens (SV) **                                   | Indeterminado | Indeterminado   | 4          | 8                    | SV1, SV2, SV3, SV4   |

\*Amostras dos dias dois, quatro, seis, sete e oito dias após a soltura (DAS). Cada amostra consistiu em dois intestinos, com exceção de uma amostra do grupo MSR (OitoDAS), na qual apenas uma fêmea estava disponível. O isolamento bacteriano foi feito nas amostras de quatro, sete e oito DAS.

\*\*Não foi realizado isolamento bacteriano.

**Dissecção do intestino médio.** Os mosquitos anestesiados tiveram a superfície externa esterilizada em etanol 70% por um minuto e foram lavados em PBS (tampão fosfato

salino). Logo após o processo de esterilização, os insetos foram mergulhados em 01 ml de PBS estéril do qual uma alíquota de 200µl foi plaqueada em meio Luria-Bertania Agar (LBA) e mantida em temperatura ambiente por sete dias. Caso houvesse crescimento bacteriano, a amostra era descartada, pois havia indícios de contaminação por bactérias da superfície externa do mosquito. O intestino médio foi removido em uma lâmina estéril e macerado em 200µl de PBS. As fêmeas recapturadas durante o experimento de marcação-soltura-recaptura foram agrupadas de acordo com a data de coleta e a presença de sangue no intestino.

**Isolamento bacteriano.** Logo após a dissecação, cada amostra foi diluída 10x e plaqueada em meio de cultura LBA e Triptona de Soja Agar (TSA). Nas 72 horas seguintes, as colônias bacterianas foram classificadas em morfotipos de acordo com tamanho, formato, cor, margem, opacidade, elevação e consistência e foram preservadas a -70°C. Posteriormente, o DNA foi extraído através de choque térmico. Um seguimento do gene 16S rRNA (~519 bp), entre as regiões hipervariáveis V1 e V3 foi amplificada utilizando iniciadores universais (PaF 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 519R 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'). Quando necessário para permitir a identificação taxonômica, um fragmento de ~1000bp entre as regiões V1-V5 foi amplificado (PaF 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1093R 5'-GTTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'). A PCR foi realizada com a enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) em condições padrão. Os produtos foram purificados com o kit Illustra PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, BUX, UK) e sequenciados com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no sequenciador ABI 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A identificação taxonômica dos isolados foi determinada com o programa Ribossomal Data Project Classifier (RDP, <https://rdp.cme.msu.edu/classifier>, Versão 2.10) com uma confiança mínima de 80% ao nível de gênero. Todas as sequências foram submetidas ao repositório público GenBank do NCBI. Uma árvore de agrupamento do tipo *neighbor joining* foi elaborada com sequências representativas de cada gênero e dados de presença e ausência nos grupos estudados (Letunic e Bork 2011).

**Construção de bibliotecas do gene 16S rRNA e pirosequenciamento.** O DNA total das amostras foi extraído com o kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Redwood City, CA, USA). As regiões hipervariáveis V3 a V5 do gene 16S rRNA foram amplificadas com os iniciadores universais 926R 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3' e 357F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' acoplados em adaptadores para o pirosequenciamento e sequências índice para posterior identificação das amostras. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com a enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com a desnaturação inicial a 95°C/2 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 95°C/20 segundos, anelamento a 50°C/30 segundos e extensão a 72°C/5 minutos (HMP Consortium, 2010). Cada biblioteca do gene 16S rRNA foi construída a partir de três PCRs independentes. Os produtos foram purificados com o kit Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). No total, 24 bibliotecas foram obtidas: 22 a partir de amostras da microbiota e dois controles (DNA de origem estabelecida). O pirosequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho/Fiocruz no aparelho 454 Genome Sequencer Junior System (Roche, Basel, Suíça). As sequências estão

depositadas no banco público Sequence Reads Archive (SRA) do NCBI (número de acesso SRR2916651).

**Análise bioinformática.** As sequências obtidas foram editadas, filtradas e analisadas utilizando-se o pacote Mothur v.1.31.2 (Schloss *et al.* 2009). Os dados foram agrupados em arquivos específicos de acordo com a amostra de origem, permitindo-se no máximo dois erros na sequência do iniciador e um erro no índice. Adicionalmente, as extremidades das sequências foram excluídas obtendo-se um comprimento máximo de 450 *flows*. Após este processo de edição, sequências com menos de 200 pares de base (bp) foram descartados. Finalmente, potenciais quimeras foram detectadas e removidas com auxílio da ferramenta UCHIME implementada no Mothur (Edgar *et al.* 2011). As sequências únicas foram alinhadas ao banco de referência Silva (versão 119) e identificadas através de um classificador Bayesiano independente (Wang *et al.* 2007). A classificação taxonômica foi baseada nos arquivos de referência (Training Set v.9) do repositório público Ribossomal Data Project (RDP), aplicando-se uma confiança mínima de 80%.

Sequências com uma distância de até 3% foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). UTOs compostas por uma única sequência ou detectadas em uma abundância inferior a 10 vezes os controles foram descartadas (Minard *et al.* 2015). A cobertura das amostras foi avaliada através de curvas de rarefação, as quais descrevem o número de UTOs em função do número de sequências gerado. O esforço de amostragem foi padronizado por meio da sorteio do menor número de sequências obtido dentre todas as amostras.

**Análises de diversidade e testes estatísticos.** A diversidade de cada amostra (diversidade alfa) de UTOs foi avaliada através da riqueza (S), do Estimador de Riqueza

com Base em Abundância (*Abundance-based Cover Estimator* - ACE), Índice de Shannon (H'), Índice de Simpson Inverso (1/D) e equitabilidade (J). As estimativas de diversidade foram comparadas entre os grupos aplicando-se a Análise de Variância de Um Fator (com teste posterior de Tuckey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido por teste de Dunn), a depender da verificação da distribuição normal dos dados através do teste Shapiro-Wilk. A correção do p-valor para múltiplas comparações seguiu o método de Bonferroni (Morettin e Bussab 2010).

Diferenças globais na estrutura das comunidades microbianas foram avaliadas entre os grupos de amostras (Tabela 4.1) através de uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e uma Análise Multivariada Não-Paramétrica de Variância (NPMANOVA ou “adonis”) a partir de uma matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis. NPMANOVA testa para diferenças entre médias ou centroides através da comparação da variabilidade intra e intergrupos considerando bancos de dados com muitas variáveis resposta (neste caso UTOs a 3% de distância máxima), sem assumir uma distribuição normal (Anderson 2001). Para o cálculo das métricas de diversidade e as análises de ordenação e estatísticas foi utilizado o pacote "vegan" no ambiente R (Oksanen *et al.* 2013).

A composição da microbiota foi comparada entre os grupos de fêmeas de *Ae. aegypti* através de (1) uma árvore de agrupamento do tipo *neighbor joining* contendo sequências do gene 16S rRNA representativas dos taxa bacterianos (famílias ou gêneros) e informações de presença e ausência (Letunic e Bork 2011), (2) um diagrama de Venn e (3) comparações estatísticas dos taxa contendo > 2% de abundância relativa em pelo menos um grupo, aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis com teste posterior de Dunn. Além disso, a abundância também foi comparada entre fêmeas alimentadas apenas com açúcar (FJA, FSA) e com sangue (FJS e MSR) (Tabela 4.1). A correção do

p-valor para múltiplas comparações seguiu os métodos de Benjamini-Hochberg e Bonferroni. As análises estatísticas foram feitas no software R (R Development Core Team 2008).

**Predição funcional da microbiota.** Com a finalidade de investigar se alterações na diversidade estariam associadas a mudanças no perfil funcional da microbiota de *Ae. aegypti*, a composição funcional do metagenoma da comunidade intestinal foi predita com a ferramenta PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*) (Langille *et al.* 2013) na plataforma online Galaxy. Resumidamente, esta abordagem bioinformática incorpora um gene marcador (no caso o 16S rDNA) e um banco de genomas de referência e infere, por reconstrução de ancestralidade, o perfil funcional de uma comunidade associada a um hospedeiro ou ambiental (Langille *et al.* 2013). O Índice de Taxon Mais Próximo Sequenciado (*Nearest Sequenced Taxon Index - NSTI*) indica a acurácia da predição metagenômica, a qual aumenta quanto menor for o valor de NSTI. Nossas amostras demonstraram um valor de NSTI de  $0,02 \pm 0,002$ , considerado adequado às predições pelo PICRUSt (Langille *et al.* 2013). Os genes preditos são anotados utilizando a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG*). Os grupos funcionais de nível 2 com abundância relativa  $>2\%$  foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis seguido por teste de Dunn no ambiente R (R Development Core Team 2008). O método de Benjamini-Hochberg foi aplicado para correção de p-valor.

**Aspectos éticos.** O Comitê de Ética da Fiocruz e a Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro aprovaram a realização do experimento de soltura-marcação-recaptura em Vila Valqueire (CEP: 22286313.7.0000.5248). Previamente às capturas no interior das

residências, um dos membros da equipe de campo explicava aos moradores a natureza do estudo e obtia o consentimento escrito de participação. Nenhum caso de dengue foi registrado na região durante a realização do experimento.

### 4.3. Resultados

**Análises de bioinformática e métricas de diversidade.** O pirosequenciamento da região hipervariável V3-V5 do gene 16S rRNA produziu ~360.000 sequências a partir das amostras intestinais de *Ae. aegypti*. Após a retirada dos iniciadores e indexes, filtragem de tamanho e qualidade e exclusão de quimeras, 245.647 sequências (de 241 a 307 bp) foram consideradas de boa qualidade para a análise taxonômica. Sequências pertencentes ao domínio Bacteria variaram entre as amostras, de 4.599 a 16.935. No total, foram 90 UTOs com até 3% de distância na sequência do gene 16S rRNA. A cobertura de sequenciamento foi estimada por meio de curvas de rarefação, as quais mostram uma redução acentuada na inclinação, mas sem atingir um platô. Este perfil sugere que a maioria das UTOs foi amostrada, mas, eventualmente, algumas não foram detectadas (Figura 4.1).

Uma vez que nosso tamanho amostral foi limitado pela baixa taxa de recaptura do experimento de marcação-soltura-recaptura [foram soltas 1.730 *Ae. aegypti* e foram recapturados 67 (~4%) deles utilizando aspiradores costais, das quais 54% foram capturadas nos dois primeiros dias de coleta] e por procedimentos metodológicos (apenas mosquitos vivos foram utilizados), nós optamos por utilizar todas as amostras na análise e padronizamos o esforço amostral em 4.599 sequências. A riqueza (S) média de UTOs por amostra variou de 20,75 (FSA) a 24,5 (FJS). A riqueza total estimada pelo método ACE variou de 25,3 (FSA) a 33,47 (FJS) (Tabela 4.2). Não houve diferenças significativas entre os grupos considerando estes parâmetros. Por outro lado, FSA mostraram índices de Shannon ( $H'$ ) ( $z=3,48$ ,  $p$ -valor  $< 0,01$ ), Simpson inverso ( $1/D$ ) ( $z=3,15$ ,  $p$ -valor  $< 0,01$ ) e equitabilidade ( $J'$ ) ( $z=3,81$ ,  $p$ -valor  $< 0,01$ ) significativamente mais elevados que SV (Tabela 4.2).



|     |            |            |           |           |           |
|-----|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| MSR | 22,25±3,92 | 27,55±6,75 | 1,32±0,13 | 2,40±0,30 | 0,43±0,03 |
| SV  | 21,25±1,26 | 29,88±5,03 | 1,14±0,05 | 2,10±0,10 | 0,37±0,02 |

S, riqueza (número de UTOs); ACE, estimador de riqueza; H', Índice de Shannon (H'); 1/D, Índice de Simpson inverso; J', Equitabilidade. FJA, fêmeas jovens alimentadas com açúcar; FJS, fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue; FSA, fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar; MSR, fêmeas marcadas recapturadas; SV, fêmeas selvagens.

A PCoA indicou um único grupo formado por FJA (duas amostras), FJS, MSR (exceto DoisDAS1) e SV, enquanto que entre as amostras restantes (FJA e FSA) foi detectado um maior grau de variabilidade intra e intergrupo na estrutura da microbiota (Figura 4.2). As diferenças na composição da microbiota entre os grupos foram suportadas pela análise estatística (NPMANOVA:  $R^2=0,62$ , p-valor < 0,01).

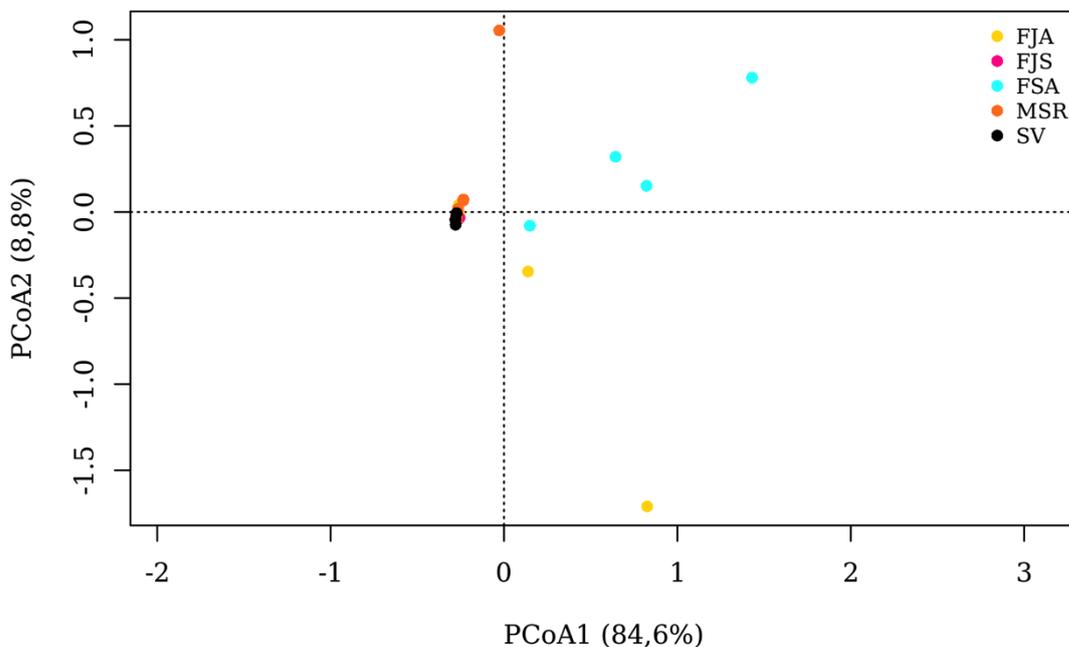


Figura 4.2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) da distância de Bray-Curtis entre as comunidades intestinais de *Ae. aegypti*. A matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis foi calculada a partir dos dados de UTOs (3% de distância máxima). FJA, fêmeas jovens alimentadas com açúcar; FJS, fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue; FSA, fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar; MSR, fêmeas marcadas recapturadas; SV, fêmeas selvagens. Cada eixo indica a porcentagem de variação explicada.

**Identificação taxonômica e composição da microbiota.** No geral, 99% e 76% das sequências foram identificadas ao nível de família e gênero, respectivamente. Apenas taxa com mais de uma sequência foram incluídos nas análises. Um total de quatro filos, 23 famílias e 32 gêneros bacterianos foram detectados na microbiota de *Ae. aegypti*. A comunidade intestinal das fêmeas foi composta pelos filos Proteobacteria (43,7 a 99,9%), seguido de Bacteroidetes (0 a 56.3%), Firmicutes (0 a 0.3%) e Actinobacteria (0 a <0,1%). A composição detalhada de famílias e gêneros de bactérias por amostra pode ser encontrada na Figura 4.3.

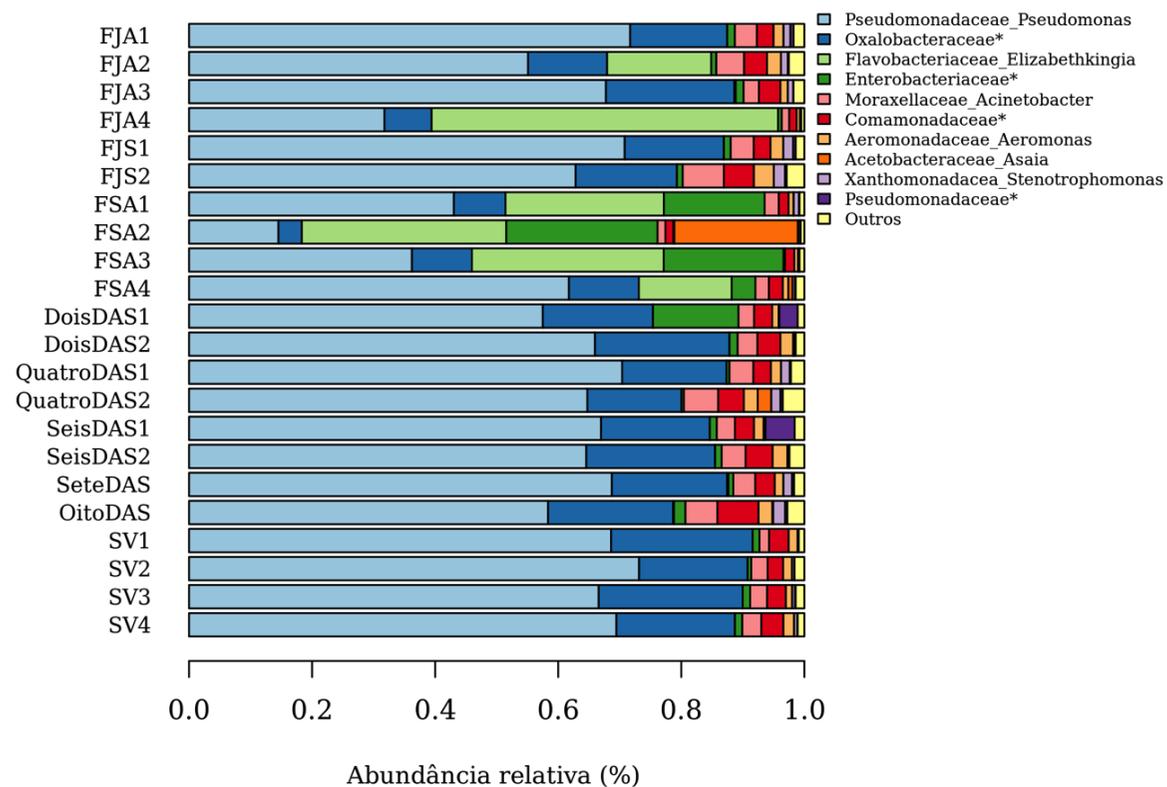


Figura 4.3. Composição da microbiota de *Ae. aegypti* por amostra. A diversidade de bactérias presente no intestino de fêmeas adultas de *Ae. aegypti* foi determinada via sequenciamento de alta vazão do gene 16S rRNA. FJA, fêmeas jovens alimentadas com açúcar; FJS, fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue; FSA, fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar; DAS, dias após a soltura; SV, fêmeas selvagens. Taxa com < 2% de abundância estão agrupados em "Outros". \*Não discriminado ao nível de gênero.

A microbiota compartilhada (formada por taxa presente em todos os grupos) foi constituída por 19/41 (~ 46%) dos grupos bacterianos (Figuras 4.4 e 4.5), contendo de ~46 a 99% da microbiota. *Pseudomonas* foi o gênero mais abundante entre os grupos, com até mais de 70% nas fêmeas SV (Figura 4.6). O número total de taxa por grupo foi de 23 para FJA, 24 para FJS, 25 para FSA, 32 para MSR e 30 para SV (Figura 4.4). No total, 26% (11/41) dos taxa bacterianos foram encontrados exclusivamente em mosquitos oriundos do campo (MSR e/ou SV) enquanto apenas 9% (4/41) foram encontrados apenas em amostras de laboratório (FJA, FJS e FSA) (Figuras 4.4 e 4.5).

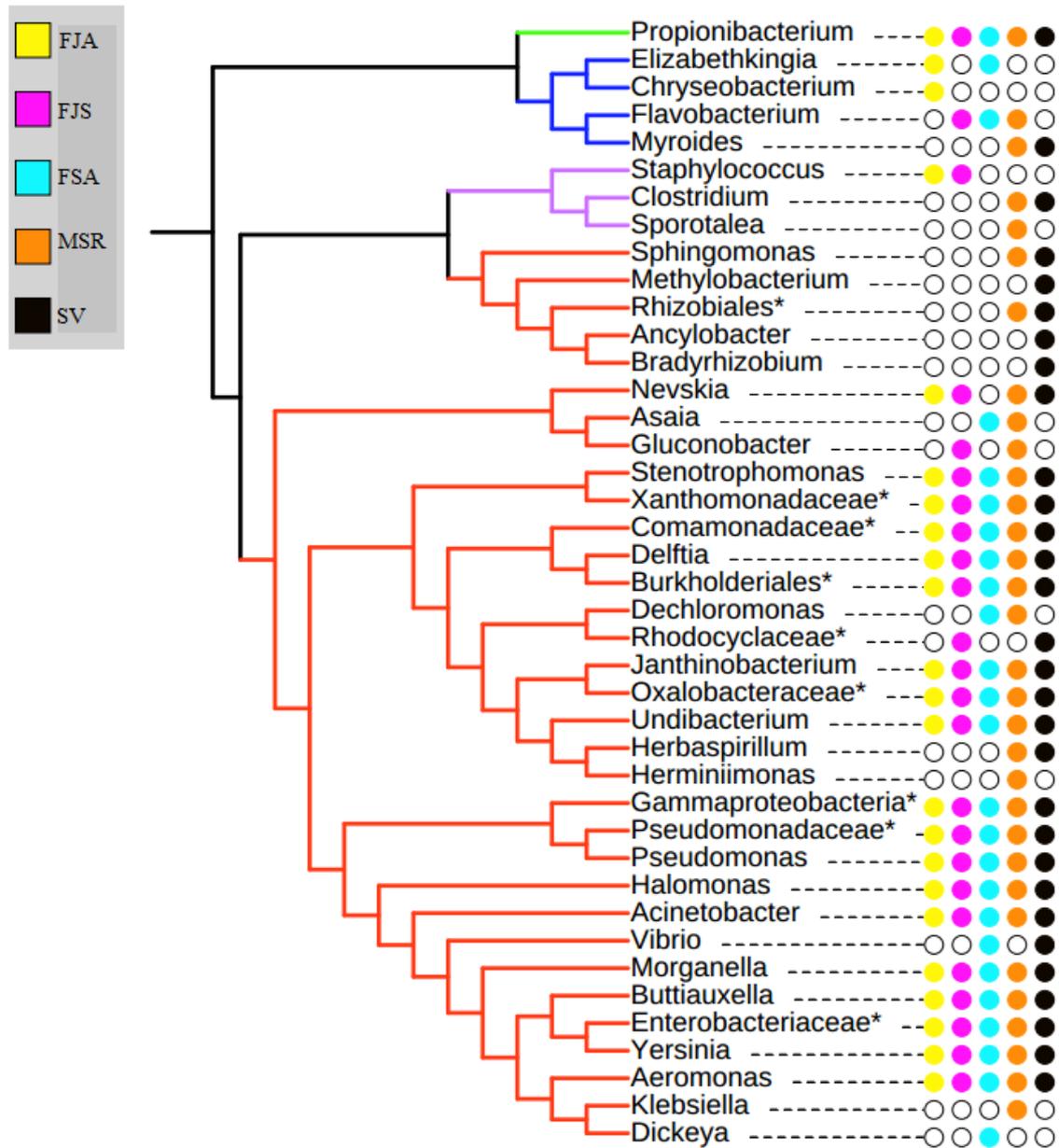


Figura 4.4. Árvore filogenética dos taxa bacterianos detectados no intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti* via sequenciamento de alta vazão do gene 16S rRNA. Os círculos amarelos indicam taxa identificados nas fêmeas jovens alimentadas com açúcar (FJA), rosa em fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue (FJS); azuis-claros em fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar (FSA); laranja em fêmeas marcadas recapturadas (MSR) e pretos em fêmeas selvagens (SV). Os taxa foram classificados de acordo com

o filo: Bacteroidetes (azul), Actinobacteria (verde), Firmicutes (roxo) e Proteobacteria (vermelho). \*não discriminado ao nível de gênero.

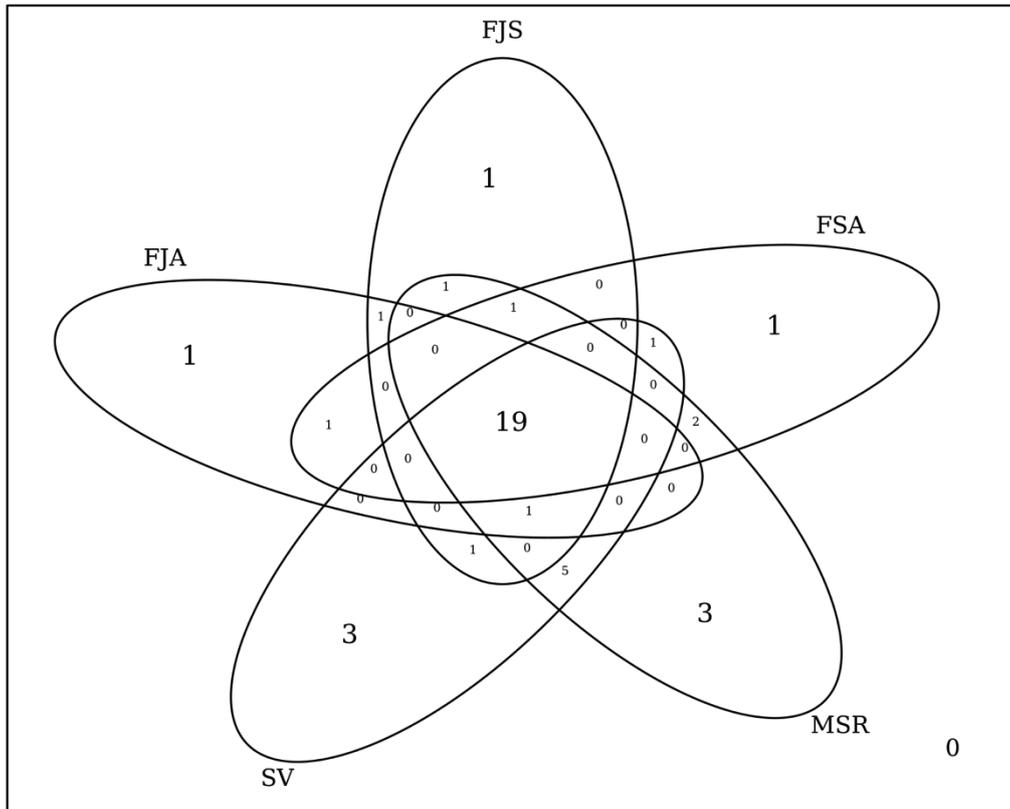


Figura 4.5. Diagrama de Venn mostrando o número de taxa identificados na microbiota de *Ae. aegypti* via pirosequenciamento do gene 16S rRNA. FJA, fêmeas jovens alimentadas com açúcar; FJS, fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue; FSA, fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar; DAS, dias após a soltura; SV, fêmeas selvagens.

Não foram observadas mudanças significativas na composição da microbiota entre os grupos MSR e FJS, SV e FJA, apesar da alta abundância do gênero *Elizabethkingia* em duas amostras de FJA. Por outro lado, FSA, com 38 dias de idade, apresentaram uma abundância significativamente maior de *Elizabethkingia* (vs. FJS:  $z=$

-2,44, p-valor < 0,05; vs. MSR:  $z=-2,91$ , p-valor < 0,01; vs. SV:  $z=2,99$ , p-valor < 0,05) e *Asaia* (vs. SFY:  $z=3,01$ , p-valor < 0,05; vs. FJS:  $z=-2,46$ , p-valor < 0,05; vs. MSR:  $z=-2,58$ , p-valor < 0,05; vs. SV:  $z=3,01$ , p-valor < 0,01). Além disso, a microbiota de FSA mostrou uma menor abundância relativa de *Pseudomonas* (vs. SV:  $z=-2,88$ , p-valor < 0,05), Oxalobacteraceae (vs. MSR:  $z=2,82$ , p-valor < 0,05; vs. SV:  $z=-3,15$ , p-valor < 0,01), Acinetobacter (vs. FJS:  $z=2,71$ , p-valor < 0,05; vs. MSR:  $z=2,89$ , p-valor < 0,05), Comamonadaceae (vs. MSR:  $z=2,98$ , p-valor < 0,05) e Aeromonas (vs. FJS:  $z=2,84$ , p-valor < 0,05; vs. MSR:  $z=2,84$ , p-valor < 0,05) (Figure 4.6). Considerando a dieta, mosquitos alimentados apenas com açúcar (FJA e FSA) apresentaram maior abundância relativa de *Elizabethkingia* na microbiota em relação àqueles alimentados também com sangue (FJS e MSR) (chi-quadrado=10,1, d.f.=1, p-valor < 0,05).

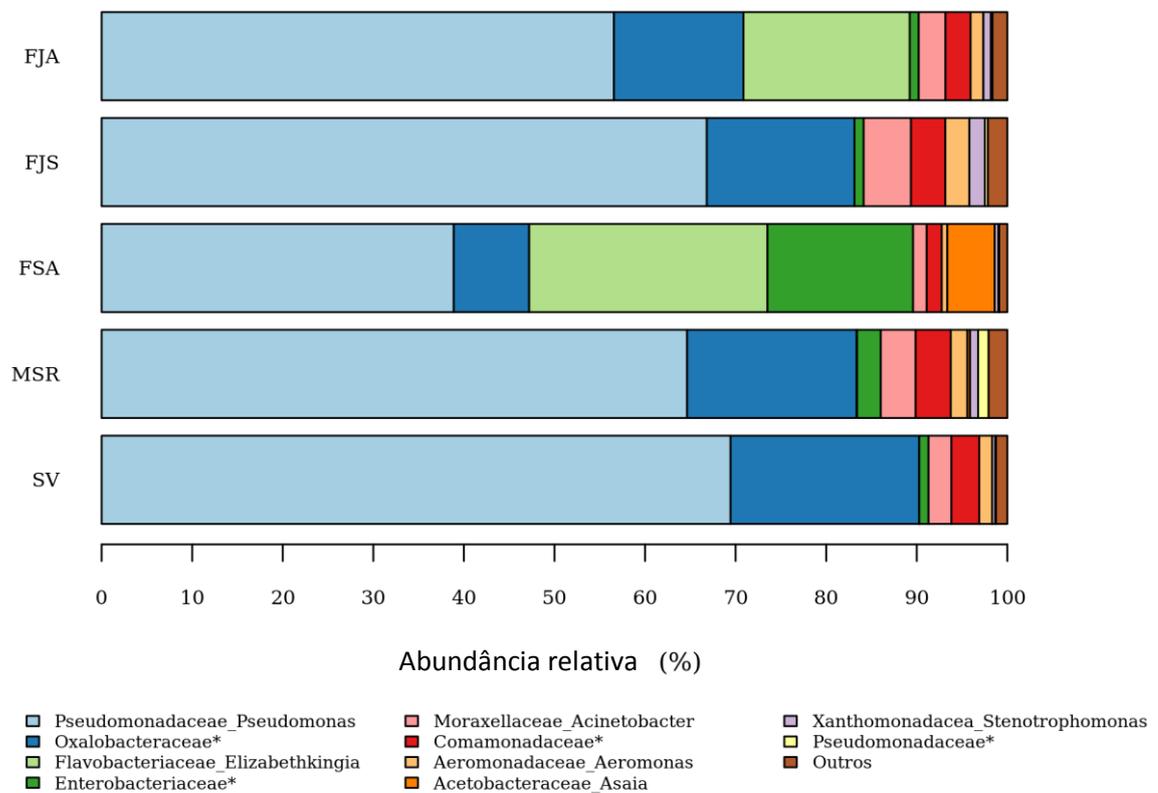


Figura 4.6. Composição da microbiota de *Ae. aegypti* por grupo. A composição taxonômica foi determinada através do sequenciamento de alta vazão do gene 16S rRNA. FJA, fêmeas jovens alimentadas com açúcar; FJS, fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue; FSA, fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar; MSR, fêmeas marcadas recapturadas; SV, fêmeas selvagens. Taxa com < 2% de abundância estão agrupados em "Outros". \*Não discriminado ao nível de gênero.

**Potenciais funções da microbiota.** O grupo FSA de *Ae. aegypti* demonstrou mudanças significativas na composição da microbiota intestinal quando compara a FJS, MSR e SV, com o aumento dos gêneros *Elizabethkingia* e *Asaia* e redução de *Oxalobacteraceae*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*. A partir da aplicação da ferramenta

PICRUSt para fazer inferências acerca do perfil funcional das comunidades microbianas, foram encontradas 13 famílias gênicas que estariam diferencialmente representadas em fêmeas de FSA em relação à SV (p-valor < 0,05). Além disso, algumas funções previstas também mostraram diferenças significativas com relação à MSR (p-valor < 0,05) (Figura 4.7).

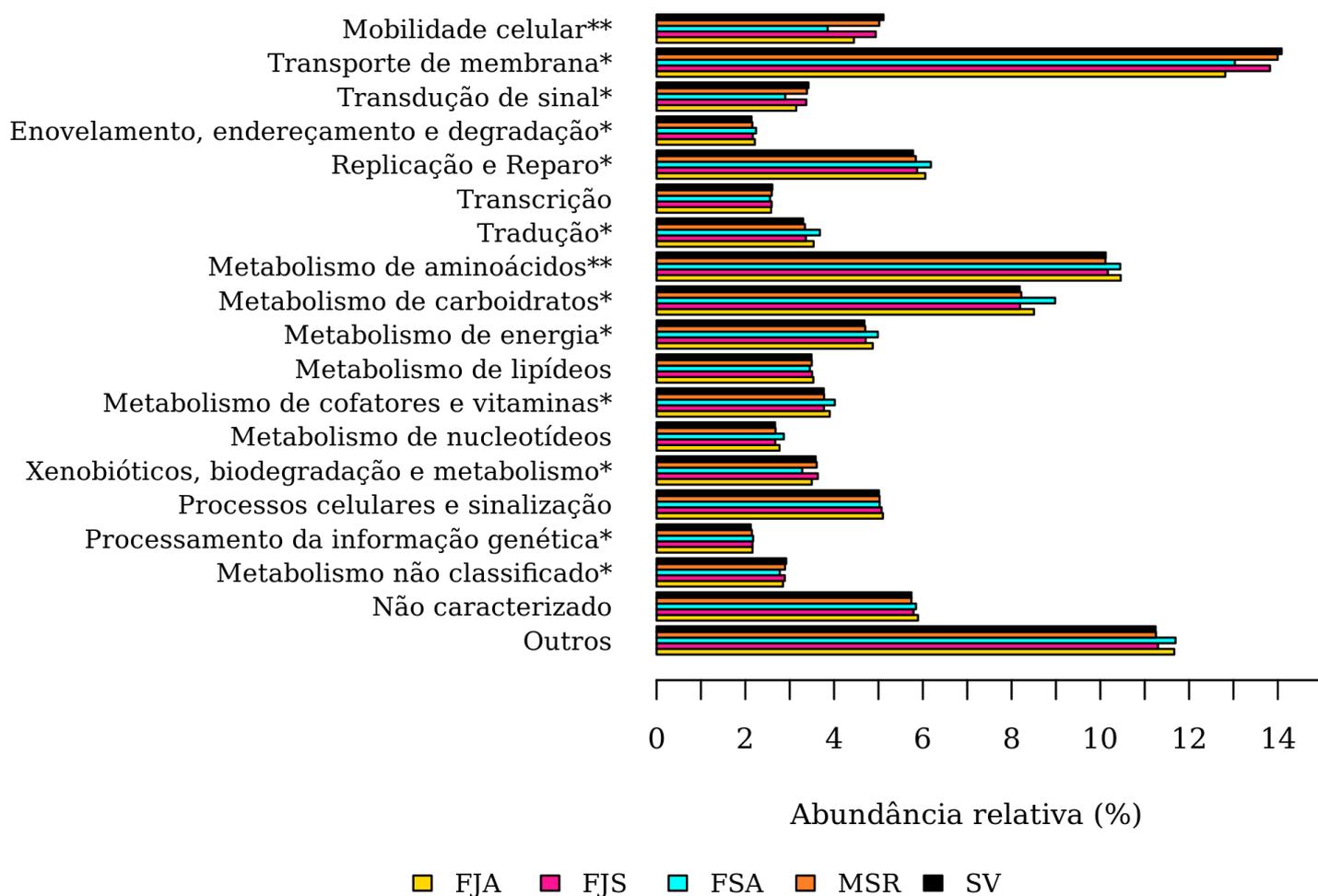


Figura 4.7. Funções metabólicas previstas para as comunidades microbianas encontradas no intestino de fêmeas adultas de *Ae. aegypti*. As barras amarelas indicam as vias metabólicas de KEEG previstas para a microbiota de fêmeas jovens alimentadas com açúcar (FJA), rosa de fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue (FJS); azuis-

claros de fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar (FSA); laranja de fêmeas marcadas recapturadas (MSR) e pretos de fêmeas selvagens (SV). \*Indica categorias significativamente diferentes entre mosquitos FSA e SV. \*\* Indica categorias significativamente diferentes entre mosquitos FSA e SV e entre FSA e MSR. (teste de Kruskal-Wallis, p-valor corrigido < 0,05).

**Diversidade de bactérias cultiváveis.** A diversidade da microbiota cultivável foi representada por 39 colônias, as quais correspondem a 24 morfotipos. A maioria destes foi isolada tanto de LBA quanto de TSA (Tabela 4.3). A identificação dos gêneros foi baseada na sequência do gene 16S rRNA considerando o banco de dados *Ribosomal Database Project* (RDP). Foram recuperadas bactérias pertencentes a três filos, oito famílias e nove gêneros (Tabela 4.3, Figura 4.8). A maioria dos gêneros pertence ao filo Proteobacteria (Figura 4.8). Considerando os grupos FJA e FJS, *Elizabethkingia* e *Enterobacter* foram isolados do primeiro, enquanto apenas *Pseudomonas* foi isolado do segundo. Mosquitos do grupo FSA também apresentavam *Elizabethkingia* e *Enterobacter*, além de *Serratia*. Uma mudança expressiva foi detectada na microbiota cultivável das fêmeas MSR, as quais possuíam *Asaia*, *Azorhizobium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* (QuatroDAS) e *Herbaspirillum* (OitoDAR), enquanto *Enterobacter* e *Elizabethkingia* não foram mais detectadas. *Pseudomonas* foi o único gênero compartilhado pelos grupos de mosquitos alimentados com sangue, tanto coletados no campo (MSR) quanto no laboratório (FJS) (Tabela 4.3, Figura 4.8).

Tabela 4.3. Identificação taxonômica das bactérias isoladas da microbiota de fêmeas de *Ae. aegypti* soltas e recapturadas no campo (MSR) ou submetidas a regimes de dieta no laboratório (FJA, FJA e FSA).

| Filo           | Classe              | Família            | Gênero (RDP classifier) | Acesso no Genbank   | Meio de isolamento | Fonte                |
|----------------|---------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Microbacteriaceae  | <i>Microbacterium</i>   | KU096905, KU096906  | LB, TSA 0,1x       | MSR (QuatroDAS)      |
| Bacteroidetes  | Flavobacteria       | Flavobacteriaceae  | <i>Elizabethkingia</i>  | KU096882 - KU096890 | LB, TSA 0,1x       | FJA; FSA             |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Acetobacteraceae   | <i>Asaia</i>            | KU096907 - KU096910 | LB, TSA 0,1x       | MSR (QuatroDAS)      |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Xanthobacteraceae  | <i>Azorhizobium</i>     | KU096911            | LB                 | MSR (QuatroDAS)      |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacteraceae   | <i>Paracoccus</i>       | KU096912 - KU096915 | LB, TSA 0,1x       | MSR (QuatroDAS)      |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria  | Oxalobacteraceae   | <i>Herbaspirillum</i>   | KU096916            | LB                 | MSR (OitoDAR)        |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriaceae | <i>Enterobacter</i>     | KU096891 - KU096894 | LB, TSA 0,1x       | FJA; FSA             |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadaceae   | <i>Pseudomonas</i>      | KU096895 - KU096904 | LB, TSA 0,1x       | FJS; MSR (QuatroDAS) |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriaceae | <i>Serratia</i>         | KU096917            | LB                 | FSA                  |

FJA, fêmeas jovens alimentadas com açúcar; FJS, fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue; FSA, fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar; MSR, fêmeas marcadas recapturadas.

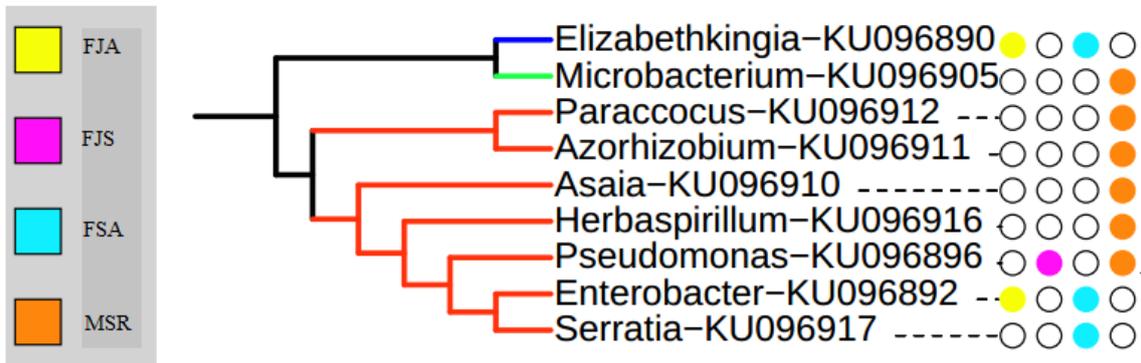


Figura 4.8. Árvore filogenética de gêneros bacterianos isolados do intestino de fêmeas de *Ae. aegypti*. FJA, fêmeas jovens alimentadas com açúcar (amarelo); FJS, fêmeas jovens alimentadas com açúcar e sangue (rosa); FSA, fêmeas senis alimentadas apenas com açúcar (azul-claro); MSR, fêmeas marcadas recapturadas (laranja). Os taxa foram classificados de acordo com o filo: Bacteroidetes (azul), Actinobacteria (verde), Firmicutes (rosa) e Proteobacteria (vermelho).

#### 4.4. Discussão

A composição da microbiota de *Aedes* varia em função de aspectos como a genética, comportamento alimentar e hábitat do mosquito (clima, criadouro larvar, hospedeiros vertebrados, por exemplo) (Zouache *et al.* 2011; Osei-Poku *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015; Buck *et al.* 2016). Contudo, a ecologia da comunidade microbiana intestinal ainda é pouco investigada no contexto das interações dos mosquitos no seu ambiente natural. Neste sentido, o presente estudo investigou em condições naturais a diversidade e a dinâmica da microbiota de *Ae. aegypti*, utilizando um experimento de marcação-soltura-recaptura. Desta maneira, nós mostramos evidências que fêmeas desta espécie apresentam uma microbiota compartilhada ao longo da vida adulta, ou seja, a colonização pela maioria dos grupos de bactérias que compõem esta comunidade permaneceu estável após a soltura dos mosquitos no ambiente urbano. Esta estabilidade é, de certo modo, surpreendente, uma vez que após sua liberação, as fêmeas de *Ae. aegypti* entraram em contato com uma variedade de hospedeiros e plantas e serão expostos a variedades ambientais mais marcadas que em condições de insetário. Entretanto, nós também mostramos que a dieta e a idade das fêmeas de *Ae. aegypti* estão associadas à abundância de alguns taxa bacterianos na microbiota intestinal.

Após a soltura, as fêmeas de *Ae. aegypti* presumidamente se alimentaram em uma variedade de hospedeiros vertebrados. Apesar desta espécie ingerir açúcares com pouca frequência (Edman *et al.* 1992), também é possível que as fêmeas tenham se alimentado de fontes de carboidratos presentes na área de estudo. Deste modo, animais, flores e frutos poderiam representar potenciais locais de aquisição de bactérias ao longo da vida adulta dos mosquitos. Além disso, diferentemente da alimentação sanguínea, as refeições açucaradas não vão direto para o intestino médio, sendo armazenadas no

divertículo como reservas alimentares (Clements 1992). Nele podem ser encontradas bactérias que também já foram detectadas no intestino médio, como *Bacillus*, *Serratia* e *Pichia* (Gusmão *et al.* 2007, 2010). Assim, é possível que bactérias adquiridas de fontes de carboidratos sejam transferidas para o intestino médio juntamente com o alimento, quando conveniente (Gusmão *et al.* 2007).

Considerando grupos bacterianos com > 2% de abundância relativa, a microbiota de fêmeas MSR não foi diferente daquela de insetos mantidos no laboratório, nos regimes FJA e FJS, apesar de duas amostras de FJA apresentarem altos níveis do gênero *Elizabethkingia*. Além disso, a composição da microbiota foi similar entre mosquitos criados no laboratório (FJA, FJS e MSR) e aqueles nascidos no campo (SV), apesar das diferentes condições da criação no laboratório e nos criadouros naturais, como características bioquímicas da água, microclima, presença de microorganismos e tipo de alimento. A estabilidade da composição da comunidade microbiana intestinal nos mosquitos adultos pode refletir um ambiente de competição entre as bactérias já estabelecidas, o que pode dificultar a colonização de novas taxa em quantidades expressivas (Terenius *et al.* 2012) e esta característica é de alta significância para a aplicação da microbiota intestinal em estratégias de controle de doenças, uma vez que a associação com as bactérias deve ser constante ao longo da vida do inseto (Capone *et al.* 2013).

A detecção de bactérias (< 2% abundância) exclusivas dos grupos MSR e SV sugere que estas tenham sido adquiridas no hábitat natural. A microbiota das fêmeas FSA, as quais permaneceram no laboratório por 35 dias, apresentaram poucas diferenças em relação à microbiota de FJA e FJS, sugerindo que a aquisição de bactérias não acontece com a mesma magnitude dentro do laboratório. Em geral, a microbiota de MSR foi mais similar à microbiota de SV e FJS, do que de FJA e FSA (Figura 4.2), o

que sugere que o ambiente e a dieta podem sinergicamente modular a presença de alguns grupos de bactérias.

Fêmeas alimentadas apenas com açúcar (FJA e FSA) mostraram uma maior abundância do gênero *Elizabethkingia* (Flavobacteriaceae), ausente ou indetectável em fêmeas alimentadas com sangue (FJS e MSR) e do grupo SV. Uma redução similar em *Elizabethkingia* foi observada em *An. gambiae* após a ingestão de sangue, por meio da mesma abordagem independente do cultivo (Wang *et al.* 2011). Com relação ao isolamento bacteriano, nós recuperamos o gênero *Serratia* de fêmeas alimentadas com açúcar (FSA), enquanto um estudo anterior relatou a dominância deste gênero no intestino de *Ae. aegypti* após a alimentação açucarada e durante toda a digestão do sangue (Gusmão *et al.* 2010). O gênero *Asaia* havia sido isolado anteriormente de mosquitos alimentados com açúcar e no início da digestão do sangue (Gusmão *et al.* 2010), enquanto nós recuperamos este grupo de fêmeas coletadas quatro dias após a soltura, com sangue no tubo digestivo. Assim, linhagens do mesmo gênero obtidas de diferentes populações de mosquito podem diferir em sua capacidade de crescimento no lúmen intestinal e/ou dependendo do meio de isolamento.

Diferentemente da estabilidade da composição da microbiota das primeiras semanas pós-emersão do adulto, foi detectado um aumento significativo de *Elizabethkingia* (Flavobacteriaceae) e *Asaia* (Acetobacteraceae) no grupo FSA. Além disso, análises preditivas indicaram possíveis alterações funcionais e metabólicas na microbiota das fêmeas do grupo FSA *versus* SV e MSR. Mudanças na comunidade microbiana intestinal ao longo de tempo podem estar relacionadas à capacidade dos mosquitos em controlar a proliferação de bactérias (Hillyer *et al.* 2005), à disponibilidade de nutrientes no tubo digestivo (Montagna *et al.* 2015) e/ou a interação direta entre as bactérias que colonizam este ambiente, como competição.

Um estudos anteriores observou uma redução da capacidade de controlar infecções por *Escherichia coli* com o aumento da idade em *Ae. aegypti*. Porém, houve redução da quantidade de hemócitos circulando na hemolinfa mas não na expressão de peptídeos antimicrobianos (Hillyer *et al.* 2005), principais responsáveis pelo controle da microbiota no lúmen intestinal dos insetos (Dong *et al.* 2009; Garcia *et al.* 2010; Vieira *et al.* 2014). Em *Drosophila*, foi demonstrado aumento no nível de transcrição de diferentes peptídeos antimicrobianos em insetos mais velhos, refutando a hipótese imunológica como uma possível explicação para mudanças temporais na composição da microbiota em *Ae. aegypti* (Eleftherianos e Castillo 2012).

Outra possível explicação para o aumento relativo de *Elizabethkingia* e *Asaia* em fêmeas senis de *Ae. aegypti* é a interação direta entre as bactérias, que poderiam apresentar vantagens competitivas no ambiente intestinal, como, por exemplo através da secreção de fatores antimicrobianos (Dong *et al.* 2009). A linhagem de *Elizabethkingia* recuperada durante este estudo possui 99% de identidade do gene 16S rRNA (~1020 bp) com a linhagem Che01 (acesso no GenBank: JX067927), obtida a partir do intestino de *An. stephensi*. Os extratos de etil-acetato e acetona produzidos pela Che01 apresentam propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antiplasmodiais, as quais parecem explicar a dominância desta bactéria na microbiota de *An. stephensi* (Ngwa *et al.* 2013).

Investigações futuras poderão determinar se a linhagem isolada de *Ae. aegypti* possui capacidades similares.

Foi demonstrado recentemente que uma linhagem do gênero *Asaia* é capaz de inibir a transmissão materna de *Wolbachia* em *An. gambiae* (Hughes *et al.* 2014). Adicionalmente, espécies de mosquito naturalmente desprovidas de *Wolbachia*, como o *Ae. aegypti*, albergam *Asaia* em diferentes órgãos, incluindo as gônadas (Rossi *et al.* 2015). Tal observação levantou a hipótese de que *Asaia* pode ser capaz de excluir a

*Wolbachia* dos órgãos reprodutivos de algumas espécies de mosquitos, reforçando o conceito de que a competição pode ser uma força mandatória na determinação da composição da microbiota dos insetos (Hughes *et al.* 2014; Rossi *et al.* 2015).

Considerando a influência da microbiota na fisiologia e adaptabilidade do hospedeiro, a composição taxonômica da microbiota pode determinar o perfil funcional e as atividades metabólicas das bactérias intestinais. Além de mudanças significativas na composição da microbiota nas fêmeas senis, também foram preditas algumas alterações funcionais e metabólicas na comunidade intestinal de FSA versus SV e MSR. A interpretação destes achados ainda é desafiadora, pois poucos estudos metagenômicos relacionam o perfil funcional da microbiota e a biologia dos insetos. Mesmo assim, por exemplo, Montagna e colaboradores (2015) observaram, utilizando a mesma ferramenta preditiva, um possível aumento no metabolismo de carboidratos na microbiota de *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) alimentados com uma dieta rica em açúcares em comparação com besouros que se alimentaram de tecidos de palmeira. Deste modo, sob a perspectiva dos impactos da microbiota na fisiologia e evolução do hospedeiro, moduladores da diversidade, como o ambiente, a dieta ou a idade, também possuem potenciais implicações na funcionalidade genética do consórcio bacteriano presente no intestino dos mosquitos.

Uma limitação do nosso estudo é o baixo número de mosquitos analisados, devido principalmente à baixa taxa de recaptura dos mosquitos marcados e ao elevado custo do pirosequenciamento. No entanto, outros estudos que investigaram a microbiota de mosquitos utilizando esta mesma abordagem empregaram tamanho amostral similar. Osei-Poku e colaboradores (2013) identificaram a diversidade da microbiota de diferentes culicídeos a partir de 1 a 13 insetos por espécie enquanto Coon *et al.* (2014) analisaram dois grupos de mosquitos com 40 insetos em cada (alimentados e não-

alimentados com sangue, respectivamente). Além disso, a homogeneidade apresentada pelos dados, mesmo com poucos mosquitos analisados, corrobora a estabilidade da microbiota nos diferentes grupos de *Ae. aegypti* analisados. Assim, acreditamos que as conclusões aqui obtidas contribuem para o entendimento da dinâmica da microbiota deste mosquito considerando diferentes condições de criação (laboratório ou criadouro natural), dieta (açúcar ou sangue) e a idade.

Estudos sobre a microbiota cultivável de *Ae. aegypti* frequentemente recuperaram os gêneros *Asaia*, *Elizabethkingia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia* de colônias de laboratório (Gusmão *et al.* 2010; Terenius *et al.* 2012), assim como de populações naturais do Panamá (Ramirez *et al.* 2012). Adicionalmente, 50% dos gêneros aqui detectados por meio do sequenciamento de alta vazão do gene 16S rRNA também o foram em *Ae. aegypti* do Quênia, com a mesma abordagem (Osei-Poku *et al.* 2012). As sobreposições na composição da microbiota intestinal de populações de *Ae. aegypti* de origem geograficamente distinta sugerem uma microbiota compartilhada associada a esta espécie, adquirida através de mecanismos de transmissão vertical e/ou exposição ambiental constante (Zouache *et al.* 2011). O mosquito *Ae. aegypti* utiliza quase que exclusivamente criadouros larvares domésticos comuns ao redor do mundo, como pneus e recipientes plásticos, onde muitos destes gêneros bacterianos têm sido encontrados (Ponnusamy *et al.* 2008; Dada *et al.* 2014). Este fato pode explicar, ao menos parcialmente, as similaridades encontradas na microbiota de populações de diferentes localidades.

Running title: Stable Microbiota Over mosquito Lifespan

Effects of Environment, Dietary Regime and Ageing on the  
Dengue Vector Microbiota: Evidence for a Core Microbiota  
Throughout the *Aedes aegypti* Lifespan

Mariana Rocha David<sup>1</sup>, Lilha Maria Barbosa dos Santos<sup>1</sup>, Ana Carolina Paulo Vicente<sup>2</sup>,  
Rafael Maciel-de-Freitas\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio  
de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Instituto Oswaldo Cruz,  
Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

\*Corresponding author: Rafael Maciel de Freitas  
freitas@ioc.fiocruz.br

Key words: *Aedes*, Microbiota, Diversity, Mark-release-recapture

## Artigo aceito para publicação na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

----- Mensagem original -----

**Assunto:**MIOC-2016-0238.R1 Accept Submission  
**Data:**27/06/2016 15:42  
**De:**Memórias do Instituto Oswaldo Cruz  
<onbehalfof+memorias.artigo+fiocruz.br@manuscriptcentral.com  
>  
**Para:**freitas@ioc.fiocruz.br  
**Responder para:**memorias.artigo@fiocruz.br

27-Jun-2016

Dear Dr. Freitas:

We are pleased to inform you that submission manuscript entitled "Effects of Environment, Dietary Regime and Ageing on the Dengue Vector Microbiota: Evidence for a Core Microbiota Throughout the Aedes aegypti Lifespan" received favorable comments from the Editors of the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

The final acceptance of your manuscript depends on its adequacy to the Memorias format/style and documents. Please check the following:

- A) Your manuscript still needs to be carefully revised on format/style.
- 1) The corresponding author name informed in the summary login page is different from that informed in the text file. We will equalize them.
  - 2) You must include between 3-6 key words in the text.
  - 3) Please include the "call" for supplementary table in the text.
  - 4) Tables and Supplementary Tables must be created in Word Process using table features. Tables created as images and inserted within the text will cause improper corrections during editing process, causing delays. To assure your table is published as requested, you must use Word Process table function. We kindly ask you to resubmit your manuscript with your tables.
  - 5) References must be created in Word Process. To assure your references is published as requested, you must don't use Hyperlink of Mendeley or similar. References created with edition marks will cause improper corrections during editing process, causing delays.
  - 6) Do not cite references in brackets on the text, for example, "[1]" or "[2-5]" Please, cite the author-date system, in chronological order;
  - 7) The references, at the end, the names of journals should be with international abbreviations.
  - 8) The references, at the end, with more than six authors should list the first six author names, followed by et al.
  - 9) The references at the end should be presented in alphabetical order.
  - 10) The references should be presented in Vancouver style. Please, see [https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)  
ex.:

Alves SN, Tibúrcio JD, de Melo AL. Susceptibilidade de larvas de *Culex quinquefasciatus* a diferentes inseticidas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44(4): 486-9.

Bisset JA, Marín R, Rodríguez MM, Severson DW, Ricardo Y, French L, et al. Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *J Med Entomol*. 2013; 50(2): 352-61.

B) Please, check whether the final uploaded Word version of your manuscript includes in one single file: (a) text, (b) figure legends and (c) tables and table legends. Please, send by e-mail to [memorias.artigo@fiocruz.br](mailto:memorias.artigo@fiocruz.br)

C) Please find attached the Creative Common License and Affidavit forms. The affidavit form must be signed by each author. Authors from different countries or institutions may sign in separate sheets containing the same basic statement (which may be sent by e-mail to [memorias.artigo@fiocruz.br](mailto:memorias.artigo@fiocruz.br)) The Creative Common License form must be signed and returned by the corresponding author. Please use [memorias.artigo@fiocruz.br](mailto:memorias.artigo@fiocruz.br) and send to this email within 7 days.

Please inform if any of the images have been previous published in a Journal.

If your paper is not returned within June 29, it will be automatically cancelled.

If you have a colour photograph (10 cm x 10 cm) that illustrates an aspect of the present manuscript and would like to submit it for consideration to illustrate the cover, please include it when you send the final version of this manuscript.

1. TIFF file format
2. 300 dpi
3. Size up to 4Mb

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Dra. Claude Pirmez  
Handling Editor  
*Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

## Abstract

Mosquito midgut microbiota has been pointed as a key component of vector competence as gut bacteria can disturb pathogen development. In this study, we address the microbiota composition over *Ae. aegypti* lifespan under field conditions. We also investigate the possible effects of the environment, dietary regime and ageing in the gut community composition. We employ culture independent and dependent approaches to characterize vector microbiota. There was evidence of lifelong stable core microbiota after mosquito release in an urban settlement where they presumably fed on a range of vertebrate hosts and carbohydrate sources. This core was formed mainly by bacteria belonging to the genera *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* and *Stenotrophomonas* and to the families Oxalobacteraceae, Enterobacteriaceae and Comamonadaceae. However, we show that both dietary regime and age are associated with the abundance of some bacterial groups in the *Ae. aegypti* microbiota. The majority of the bacterial groups we identified have been detected in the midgut of *Ae. aegypti* from laboratory and wild populations, indicating a possible core microbiota associated with this mosquito species. Our findings suggest *Ae. aegypti* harbor a stable bacterial community during adult life, similar to mosquito populations of distinct geographic areas, which may be further explored in arbovirus biocontrol strategies.

## Introduction

The microbial communities colonizing cells and organs of higher organisms (the microbiota) interact with hosts in a continuum of ecological interactions ranging from parasitism to mutualism. The microbiota is believed to provide the host valuable capabilities which influence physiology and improve fitness (Rosenberg & Rosenberg 2008). The insect digestive tract harbors microbial communities comprised of viruses, bacteria, yeast and protists. Insect vector bacterial microbiota, especially of mosquitoes, is known to play an important role in host nutrition, reproduction, development, immunity and protection against pathogens (Minard et al. 2013).

Recent reports have demonstrated that mosquito midgut microbiota is a key component of vector competence as gut bacteria can inhibit the development of pathogens including *Plasmodium* and dengue virus (DENV) (Xi et al. 2008, Dong et al. 2009, Ramirez et al. 2012, Ramirez et al. 2014). These findings suggest the introduction of particular bacteria strains harboring innate or engineered anti-pathogen activity into the mosquito gut as a novel disease control strategy (Gusmão et al. 2010, Ramirez et al. 2012, Ramirez et al. 2014, Villegas & Pimenta 2014). For the proper application of this approach in the field, it is mandatory to know which factors influence the microbiota diversity of the target vector species, specially under natural conditions.

Under the laboratory environment, the dietary regime (Gusmão et al. 2010, Terenius et al. 2012) and the Chikungunya virus infection (Zouache et al. 2012) influenced the microbiota diversity in adult *Aedes* mosquitoes. Regarding wild populations, the host genetic diversity (Minard et al. 2015) and the habitat (Zouache et al. 2011, Osei-Poku et al. 2012, Kim et al. 2015) were interpreted to modulate the

midgut community composition. In this scenario, the understanding of the midgut bacterial community dynamics throughout the *Aedes aegypti* lifespan under natural conditions is still imperative.

The objective of this study is to profile the midgut diversity throughout the *Ae. aegypti* lifespan and address possible determinants of microbiota structure in adult females. Since the environment is believed to influence midgut community composition in mosquitoes (Zouache et al. 2011, Osei-Poku et al. 2012, Kim et al. 2015), we investigated whether the release of laboratory reared females in the urban environment would result in changes in microbiota composition over time. Therefore, we performed a mark-release-recapture experiment, a reliable tool for the ecological study of a target species on its natural habitat. We identified gut bacteria employing culture-independent (deep-sequencing) and dependent approaches in female mosquitoes recaptured on different days after release. We also characterized the microbiota diversity according to diet (sugar or blood) and mosquito age in the laboratory, as well as in wild insects.

## **Materials and Methods**

**Study area.** The study was conducted in a section of 15 blocks in Vila Valqueire, a middle class suburban district located in the northeast of Rio de Janeiro city (22°53'09"S; 43°21'59"W), a sparsely populated area surrounded by a secondary forest with paved streets, regular municipal water supply and garbage collection. The region contains 410 houses, the majority with 3-4 bedrooms and extended yards, with human density of 74.17 inhabitants/ha. This neighborhood was chosen for the mark-release-recapture experiment because it offered the highest mosquito collection rates among the five locations in Rio de Janeiro monitored by our group with dengue outbreaks occurring every 3-4 years. Weekly sampling for two consecutive years in Vila

Valqueire revealed an average of 1.3 female mosquitoes per house per day. Water tanks and buckets are pointed out as the most productive *Ae. aegypti* breeding-container types (Dutra et al. 2015).

**Mark-Release-Recapture experiment.** The *Ae. aegypti* mosquitoes (F1 generation) were derived from a laboratory colony established from eggs collected in Vila Valqueire with 40 ovitraps uniformly distributed throughout the neighborhood in order to collect a representative sample of the genetic variation in the population. Larvae for the experiment were fed with commercial fish food (Tetramin<sup>®</sup>). Adults were fed *ad libitum* with 10% sucrose up to the release day. Males and females were maintained in the same cage for 72h under laboratory conditions ( $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$  and  $60 \pm 8\%$  RH) to stimulate mating.

Before releasing, mated and sugar-fed 3 day-old females were marked with fluorescent dust (Day-Glo Color Corp, Cleveland, OH, USA) and soon released outdoors at a local square in order to help mosquito dispersal through the neighborhood. Daily captures were performed with backpack aspirators (John W. Hock, Gainesville, FL, USA), starting on the following day after release. Daily, 15 houses were randomly selected for insect aspiration for 15-20 min per house including the peridomestic area. Mosquitoes were recaptured in a range of 0.5 km according to the short flight range usually observed for *Ae. aegypti* (McDonald 1977, Harrington et al. 2005, Maciel-de-Freitas et al. 2007).

The recaptured females were transported alive to the laboratory in order to preserve DNA quality, anesthetized on ice and checked for the fluorescent marking. Marked females were identified under UV light. Captures ended when no marked females were collected over three consecutive days.

**Ethics Statements.** Fiocruz Ethical Committee approved the mark-release-recapture experiment in Vila Valqueire (CEP protocol number 22286313.7.0000.5248), permission also obtained from the Rio de Janeiro Department of Health. In order to recapture marked mosquitoes inside dwellings, local residents received a full explanation of the project from at least one of the co-authors. In addition, mosquito collection is vector surveillance routine in Rio de Janeiro, many residents being used to receiving health agents in their houses. Collections were performed after obtaining formal written consent from the householders. There were no releases during dengue outbreaks or if dengue cases were reported in that neighborhood.

**Midgut microbiota samples.** The diversity of midgut microbiota of *Ae. aegypti* females collected from the field was evaluated by 16s rDNA gene pyrosequencing in (a) females mosquitoes released and recaptured (MRR) two, four, six, seven and eight days after release (DAR) and (b) wild females (WD). The profiling of wild insects, i.e. unmarked, was conducted to control for the effect of laboratory rearing in female gut microbiota. The majority of females recaptured during the mark-release-recapture assay (81%) had blood content in the midgut, a condition for microbiota investigation. Bacteria isolation was performed in all groups except WD (Table 1). Since the likelihood of collecting naturally infected mosquitoes during an inter-epidemic period is low, we did not conduct any assay to test whether captured mosquitoes were infected with DENV.

A portion of mosquitoes from the same generation/batch not released in the natural environment was maintained in the lab, where we assessed the microbiota of (c) sugar-fed young (SFY), (d) blood-fed young (BFY) and (e) sugar-fed old (SFO) females (Table 1). This allowed us to study the effect of diet regime on microbiota composition

before and after blood-feeding. In addition, since we seldom recapture females after ~10 days post release, we also sampled 38 day-old laboratory insects to evaluate the effect of ageing in microbiota diversity.

**Midgut dissection.** Only live insects were processed in order to preserve DNA quality for microbiota investigation. Ice-anesthetized mosquitoes were surface-sterilized in 70% ethanol for 1 min and rinsed in sterile PBS. Soon after surface sterilization mosquitoes were submerged in sterile PBS which had an aliquot plated in Luria-Bertani Agar media (LBA) and kept in room temperature for 7 days. This procedure was conducted as a control of mosquito external surface sterilization. Whenever bacterial growth occurred we discarded the corresponding samples since they were potentially contaminated by bacteria from the external surface of mosquitoes. Midguts were removed a sterile glass slide and macerated in sterile PBS. Each sample consisted of two midguts. Females from the mark-release-recapture experiment were coupled according to recapture day and the presence of blood in the intestinal tract.

**16s rDNA library construction and 454 pyrosequencing.** Total DNA from the midgut samples was extracted with the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Redwood City, CA, USA). The hypervariable regions (V3 to V5) of bacterial 16S rRNA gene were amplified with 926R 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGT-3' and 357F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' primers added to 454 sequencing adapters and Multiplex Identifier (MID) tags, affording the multiplexing of samples (HMP Consortium, 2010). PCR was performed with Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with an initial denaturation at 95°C/2 min, 30 cycles with a denaturation step at 95°C/20 sec, an annealing step at 50°C/30 sec and an extension step at 72°C/5 min (HMP Consortium, 2010). Each 16s rRNA amplicon

library was constructed from three independent PCRs. PCR products were purified with the Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Twenty-four libraries were constructed: 22 from midgut samples and two controls. Pyrosequencing was performed in high-throughput platform/Illumina with the 454 Genome Sequencer Junior System (Roche, Basel, Switzerland). Sequences were deposited in the NCBI Sequence Reads Archive (SRA) (accession number SRR2916651).

**Bioinformatics and operational taxonomic unit (OTU) assignment.** Data were trimmed, filtered and analyzed with the Mothur package v.1.31.2 (Schloss et al. 2009). Sequence reads were sorted in appropriate files according to MID tags, allowing two errors on the primer sequence and one on the barcode sequence. Additionally, sequences were trimmed to 450 flowgrams. After the trimming process, reads with less than 200bp were discarded. Finally, potential chimeric sequences were removed with UCHIME implemented on Mothur software (Edgar et al. 2011). All unique sequences were aligned to the SILVA-database reference alignment (release 119) and classified with the Mothur implementation of the naïve Bayesian classifier (Wang et al. 2007). Taxonomic assignment was based on the Ribosomal Data Project (RDP) reference files (Training Set v.9) with a bootstrap cutoff of 80%. Pyrosequencing produced ~360,000 sequence reads from *Ae. aegypti* midgut samples. After primer and barcode removal, quality trimming, size filtering and chimera exclusion, 245,647 reads (ranging from 241 to 307 bp) were considered of good quality for taxonomic analysis.

Sequence reads with maximum 3% distance were clustered into OTUs. The OTUs represented by a single read or detected in control samples in abundance smaller than 10 times greater than in controls were discarded (Minard et al. 2015). Sample coverage was evaluated through rarefaction curves which describe the number of OTUs

detected as a function of sequenced generated reads. The sampling effort across samples was standardized by randomly selecting the smallest number of sequences among all samples.

**Diversity and statistical analysis.** Alpha diversity was evaluated with OTU clustering through richness (S), Abundance-based Cover Estimator (ACE), Shannon (H), Inverse Simpson (1/D) and Evenness (H'). Diversity metrics were compared between groups with one-way ANOVA (followed by Tukey post-hoc test) or Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's test) depending upon normal distribution verification with the Shapiro-Wilk test. P-values were adjusted for multiple comparisons by the Bonferroni criteria.

Principal Coordinates Analysis (PCoA) and Non-parametric Multivariate Analysis of Variance (NPMANOVA or “adonis”), both with a Bray-Curtis dissimilarity matrix, were employed to assess overall dissimilarity in community structure over the groups of samples (Table 1). NPMANOVA tests for the difference between means or centroids by comparing the variability within groups versus the variability among groups for data presenting many response variables (i.e. OTUs at 3% distance) without assuming a multivariate normal distribution (Anderson 2001). Diversity metrics calculation, ordination and statistical analysis were performed in the R 'vegan' package (Oksanen et al. 2013).

Microbiota composition among the groups of *Ae. aegypti* females was compared by performing (a) a neighbor joining tree with representative 16S rRNA gene sequences of bacterial taxa (families or genera), coupled with presence/absence data (Letunic & Bork 2011), (b) a Venn diagram and (c) abundance statistical comparison of taxa exhibiting > 2% of relative abundance by the Kruskal-Wallis test followed by pairwise

comparisons with the Dunn's test, if necessary. P-values were adjusted controlling the false discovery rate (FDR) by the method of Benjamini-Hochberg. Additionally, relative abundance was also compared among sugar-fed (SFY, SFO) and blood-fed samples (BFY, MRR) (Table 1). P-values were adjusted by the Bonferroni method. We used a level of significance for corrected p-values  $< 0.05$ . All statistical analysis were performed in R environment (R 2008).

**Prediction of potential microbial function.** In order to assess whether or not diversity changes were associated with differences in the functional profile of *Ae. aegypti* female microbiota, the functional composition of the gut community was predicted with PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) (Langille et al. 2013) on the online Galaxy interface. Briefly, this bioinformatics approach incorporates a marker gene (16S rDNA) and a database of reference genomes to infer, by ancestral-state reconstruction, the functional profile of host-associated and environmental communities (Langille et al. 2013). The Nearest Sequenced Taxon Index (NSTI) indicates the accuracy of metagenome predictions, accuracy increasing with decreasing NSTI. Our samples had NSTI of  $0.02 \pm 0.002$ , considered to be tractable for PICRUSt prediction (Langille et al. 2013). The predicted genes were annotated using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database. Level 2 KEGG Orthology groups with more than 2% of relative abundance were compared by the Kruskal-Wallis test followed by pairwise comparisons with the Dunn's test, if necessary, in R environment (R 2008). P-values were adjusted controlling the false discovery rate (FDR) by the method of Benjamini-Hochberg.

**Isolation of midgut bacteria.** The bacterial isolation was conducted with the aim to provide an overview of the culturable microbiota of the Vila Valqueire *Ae. aegypti*

population. We selected four samples from each group, with the exception of the blood-fed young (BFY) in which two samples were available. In the MRR samples isolation was conducted every 3-4 days of collection. Isolation was not performed in wild insects due to logistic issues. Soon after the dissection, each sample was 10-fold diluted and plated on LBA agar and 10-fold diluted Tryptone Soya Agar (TSA). For the ensuing 72h, bacteria colonies were screened based on morphology and samples of each morphotype cryopreserved.

Bacterial DNA was extracted by a boiling and freezing procedure. A 16S rRNA gene segment (~519 bp) between the V1-V3 hypervariable regions was amplified using the 16S universal primers (forward 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and reverse 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'). This segment allows the identification at genus level for the majority of bacteria groups. Regarding those families with high similarity in 16S rDNA sequence (e.g. Enterobacteriaceae), we sequenced a larger fragment (~1000bp) between the V1-V5 hypervariable gene regions (forward 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and reverse 5'-GTTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'). PCR was performed with GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) under standard conditions. Amplicons were purified with the Illustra PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, BUX, UK), then sequenced with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, carried out on the ABI 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Bacteria identification was determined with the Ribosomal Data Project classifier program (RDP, <https://rdp.cme.msu.edu/classifier>, Version 2.10) with a confidence threshold of 80% at genus level. All sequences were submitted to GenBank. A neighbor joining tree was elaborated with a representative 16S rRNA gene sequence for each bacterial genera, coupled with presence/absence data (Letunic & Bork 2011).

## Results

The midgut diversity throughout the *Ae. aegypti* lifespan was investigated after the release of laboratory reread females in the urban environment. The microbiota of recaptured specimens was contrasted with the microbiota of laboratory females from different diet and mosquito age groups, as well as with wild insects from natural breeding sites employing deep-sequencing of bacterial 16S rRNA gene and bacteria isolation (Table 1).

**Bioinformatics processing and diversity metrics.** Sequences assigned to the Bacteria domain varied over conditions from 4,599 to 16,935. In total, sequence reads clustered at maximum 3% distance into 90 non-singletons OTUs. Sequencing coverage for each group was assessed through rarefaction curves. The curves leveled off without reaching a plateau, suggesting most microbiota OTUs were detected but some possibly remaining undiscovered (Figure 1).

As the sample size was constrained by the low recapture rate of the mark-release-recapture experiment (we released 1,730 *Ae. aegypti* and recaptured 67 (~4%) of them using backpack aspirators, with ~54% in the first two days of collection) and by the methodological procedures (only alive females were dissected), we opted to keep all the samples in the analysis and standardize the sampling effort to 4,599 reads. Average richness of OTUs (*S*) per group ranged from 20.75 (SFO) to 24.5 (BFY). Estimated total richness by ACE varied from 25.3 (SFO) to 33.47 (BFY) (Table 2). There were significant differences among groups for neither observed nor estimated richness. On the other hand, SFO mosquitoes presented significant higher Shannon (*H*) ( $z=3.48$ ,  $p$ -value  $< 0.01$ ), Inverse Simpson ( $1/D$ ) ( $z=3.15$ ,  $p$ -value  $< 0.01$ ) and Evenness ( $H'$ ) ( $z=3.81$ ,  $p$ -value  $< 0.01$ ) than WD mosquitoes (Table 2).

PCoA displayed a single cluster among two SFY samples, BFY, MRR (except TwoDAR1) and WD, while there was a higher intra and inter-group variability in bacterial community structure between two SFY and SFO samples (Figure 2). Differences in microbiota community structure among groups were supported by statistical analysis (NPMANOVA:  $R^2=0.62$ ,  $p$ -value < 0.01).

**Taxonomic assignment and microbiota composition.** In total, more than 99% and 76% of the reads were assigned to family and genus level, respectively. Only non-singleton taxa were considered for further analysis. A total of 4 bacteria phyla, 23 families and 32 genera were successfully identified in the *Ae. aegypti* gut microbiota. The bacterial communities colonizing female midguts were composed of Proteobacteria (43.7 to 99.9%), followed by Bacteroidetes (0 to 56.3%), Firmicutes (0 to 0.3%) and Actinobacteria (0 to <0.1%). Detailed community composition per sample at family and genus levels are represented in Figure 3 and Supplementary Table 1.

A core microbiota (taxa present in all groups) was formed by 19/41 (~ 46%) of bacterial taxa (Figures 4 and 5), comprising from ~46 to 99% of microbiota. *Pseudomonas* was the most abundant genus in groups, up to ~70% of midgut bacteria in WD females (Figure 6). The total number of taxa per group was 23 for SFY, 24 for BFY, 25 for SFO, 32 for MRR and 30 for WD mosquitoes (Figure 4). Together, MRR and WD females contained 11/41 (~26%) taxa present only in those groups contrasting with 4/41 taxa (~9%) exclusive to SFY, BFY and/or SFO mosquitoes together (Figures 4 and 5).

There were no significant changes in microbiota composition among MRR and BFY, WD or SFY females, despite the higher abundance of the *Elizabethkingia* genus in two SFY samples. On the other hand, SFO specimens, 38 days old, presented higher

abundance of *Elizabethkingia* (vs. BFY:  $z = -2.44$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ; vs. MRR:  $z = -2.91$ ,  $p\text{-value} < 0.01$ ; vs. WD:  $z = 2.99$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ) and *Asaia* (vs. SFY:  $z = 3.01$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ; vs. BFY:  $z = -2.46$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ; vs. MRR:  $z = -2.58$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ; vs. WD:  $z = 3.01$ ,  $p\text{-value} < 0.01$ ). Furthermore, the microbiota SFO insects displayed lower abundance of *Pseudomonas* (vs. WD:  $z = -2.88$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ), Oxalobacteraceae (vs. MRR:  $z = 2.82$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ; vs. WD:  $z = -3.15$ ,  $p\text{-value} < 0.01$ ), *Acinetobacter* (vs. BFY:  $z = 2.71$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ; vs. MRR:  $z = 2.89$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ), Comamonadaceae (vs. MRR:  $z = 2.98$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ) and *Aeromonas* (vs. BFY:  $z = 2.84$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ; vs. MRR:  $z = 2.84$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ) (Figure 6). Regarding dietary regime, strictly sugar-fed mosquitoes (SFY, SFO) exhibited significantly more *Elizabethkingia* than those blood-fed (BFY, MRR) in the microbiota ( $\chi^2 = 10.1$ ,  $d.f. = 1$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ).

**Potential microbial function.** SFO *Ae. aegypti* demonstrated significant differences in microbiota composition when compared to BFY, MRR and WD *Ae. aegypti* females, with an increase of *Elizabethkingia* and *Asaia* in addition to a reduction in Oxalobacteraceae, *Acinetobacter* and *Aeromonas* bacteria. With PICRUSt to make exploratory inferences of the microbial function, we encountered 13 gene families predicted to be differentially represented in SFO in relation to WD females ( $p\text{-value} < 0.05$ ). In addition, two of these predicted functions also showed statistically significant differences between SFO and MRR females ( $p\text{-value} < 0.05$ ) (Figure 7).

**Diversity of culturable bacteria.** The culturable midgut microbiota was represented by 39 bacterial colonies, corresponding to 24 morphotypes. Most morphotypes were isolated from both LBA and TSA media (Table 3). The identification to the genus level was based on the 16S rRNA gene sequence. We recovered bacteria belonging to three phyla, eight families and nine genera (Table 3, Figure 8). The majority of genera

belonged to the Proteobacteria phylum (Figure 8). Considering SFY and BFY groups, *Elizabethkingia* and *Enterobacter* were recovered from the former, whereas only *Pseudomonas* was isolated from the latter. SFO females still carried *Elizabethkingia* and *Enterobacter* 35 days later, but *Serratia* was detected in tested specimens. An expressive change was observed in the culturable microbiota composition after release since MRR females presented *Asaia*, *Azorhizobium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* (FourDAR) and *Herbaspirillum* (EightDAR), while *Enterobacter* and *Elizabethkingia* were no longer cultivated. *Pseudomonas* was the only genus shared between blood-fed mosquitoes, from both MRR and laboratory (BFY) (Table 3, Figure 8).

## **Discussion**

The midgut microbiota of mosquitoes is supposedly to be a function of host intrinsic factors (e.g. genetics), feeding behavior and environment (e.g. climate, larval habitats, vertebrates hosts) (Zouache et al. 2011, Osei-Poku et al. 2012, Hedge et al. 2015). Nevertheless, gut community ecology is still poorly investigated from the standpoint of the mosquito interactions within its natural environment. In this way, the present study assesses the diversity and the dynamics of *Ae. aegypti* microbiota under natural conditions using the mark-release-recapture experiment. Herein, we offer evidence for *Ae. aegypti* female lifelong core microbiota, i.e. the community composition comprising the majority of microbiota was stable after mosquitoes were released in the urban settlement. However, we show that the female dietary regime and mosquito age were associated with the abundance of some bacterial groups in the *Ae. aegypti* microbiota.

After release, the *Ae. aegypti* females presumably blood-fed on a range of vertebrate hosts with diet supplements of different carbohydrate sources (fruits and flowers), which could represent potential sources for bacteria acquisition during their adult life. Differently from the blood-meals, the sugar-meals do not go directly to the midgut being storage in the crop as food reserve (Clements 1992). This structure harbors bacteria (Gusmão et al. 2007), which have been also detected in the midgut such as *Bacillus*, *Serratia* and *Pichia* (Gusmão et al. 2010). Therefore, it is suggested that the bacteria acquired from sugar sources can be transferred to the midgut along with food when convenient (Gusmão et al. 2007).

Regarding > 2% abundant bacteria, MRR female microbiota composition was not different from the specimens maintained in the laboratory under SFY or BFY regimes despite two SFY samples presenting high levels of the *Elizabethkingia* genus. In addition, microbiota was similar between laboratory reared (SFY, BFY, MRR) and WD mosquitoes, regardless of the different conditions in the laboratory and the natural breeding sites, i.e. water biogeochemical characteristics, microclimate and food type. This relatively constant midgut community composition in adult mosquitoes may reflect a competitive environment (Terenius et al. 2012) and is of great significance for the application of midgut microbiota in disease control approaches, as bacteria association with host must be steady over the adult lifetime (Capone et al. 2013).

MRR females exclusively shared < 2% abundant bacteria taxa with WD insects suggesting their acquisition in the natural habitat after release. SFO females, which remained in the laboratory for 35 days, displayed fewer differences in microbiota composition in relation to SFY and BFY mosquitoes, indicating this apparent midgut bacteria acquisition did not take place at the same magnitude within the laboratory environment. In general, MRR female microbiota was structurally more similar to WD

and BFY than to SFY and SFO midgut communities (Fig. 2), suggesting that the environment and the feeding behavior can synergistically modulate the presence of some bacteria groups.

Sugar-fed females (SFY and SFO) harbored the *Elizabethkingia* (Flavobacteriaceae) genus, absent or undetectable in blood-fed (BFY and MRR) and WD specimens. A reduction in *Elizabethkingia* was observed after blood-feeding in *Anopheles gambiae*, applying the same deep-sequencing approach (Wang et al. 2011). Regarding bacteria isolation, we recovered *Serratia* from sugar-fed (SFO) females, while a previous study reported this genus was dominant inside the *Ae. aegypti* midgut after sugar-feeding and during the whole blood digestion (Gusmão et al. 2010). *Asaia* was previously isolated from sugar-fed *Ae. aegypti* and upon initial at blood digestion (Gusmão et al. 2010), while we recovered this genus in blood-fed MRR mosquitoes four days after release. Thus, strains isolated from distinct mosquito populations might differ in their growth characteristics inside the midgut environment and/or in the isolation media.

Contrasting the stability of microbiota composition in the first weeks after adult emergence, the microbiota of SFO females revealed a remarkable increase of *Elizabethkingia* (Flavobacteriaceae) and, to a lesser extent, *Asaia* (Acetobacteraceae). In addition, significant functional and metabolic alterations were predicted in the microbiota of SFO *versus* WD and MRR females. Microbial community shifts over time could be related to the mosquito immune capacity in controlling proliferation of certain bacteria (Hillyer et al 2011), nutrient availability in the gut environment (Montagna et al. 2015) and/or result from direct interaction among colonizing bacteria (e.g. competition) (Dong et al. 2009).

The *Elizabethkingia* strains recovered in this study share 99% of identity in 16S rRNA gene sequence (1020pb) with the Che01 strain (GenBank accession JX067927) isolated from the midgut of *An. stephensi*. The ethyl acetate and acetone extracts produced by the Che01 strain presented antibacterial, antifungal and antiplasmodial activities, which might explain this bacteria dominance in the microbiota of *An. stephensi* (Ngwa et al. 2013). Similarly, *Asaia* have been shown to inhibit the colonization and the maternal transmission of the intracellular bacteria *Wolbachia* (Hughes et al. 2014). Further investigation is required in order to determine whether the *Ae. aegypti* strains possesses similar capabilities.

Studies on the microbiota of *Ae. aegypti* females recovered *Asaia*, *Elizabethkingia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Serratia* genera from laboratory colonies (Gusmão et al. 2010, Terenius et al. 2012), as well as wild populations from Panama (Ramirez et al. 2012). Additionally, 50% of genera detected through deep-sequencing were also found in *Ae. aegypti* from Kenya applying the same approach (Osei-Poku et al. 2012). The overlapping microbiota composition among *Ae. aegypti* populations from distinct geographic regions suggest a core microbiota stably associated with this species, acquired through mechanisms of vertical transmission and/or constant environmental exposition (Zouache et al. 2011). *Ae. aegypti* breeds almost exclusively in domestic containers recurrent across the globe such as discarded tires and plastic buckets, in which several of this bacteria taxa have been detected (Ponnusamy et al. 2008, Dada et al. 2014). This could partially explain the similarities found in the microbiota of geographically distant populations.

## Conclusions

The present study shows that: *i*) the dominant bacteria were ubiquitous in the female mosquito midgut during the first weeks after emergence. This core microbiota was independent of rearing conditions (laboratory or natural breeding site), diet regime (sugar or blood) and after the release in the natural habitat where females fed on natural blood and carbohydrate sources, *ii*) the *Elizabethkingia* (Flavobacteriaceae) genera was associated with sugar-fed females, *iii*) the microbiota structure changed in older mosquitoes, *iv*) the shifts in the microbiota of older *Ae. aegypti* females were predicted to influence the functional and metabolic profile of the midgut community and *v*) the microbiota identified during this study shared many bacteria taxa with *Ae. aegypti* from distinct geographic locations, suggesting a core microbiota associated with this mosquito species. The investigation of the factors influencing microbiota dynamic in *Ae. aegypti* open new perspectives to the understanding of bacterial community impacts in mosquito biology and evolution, which can be hereafter explored for the development of new disease control tools.

## Acknowledgments

We are grateful to Roberto Costa Peres for field assistance, to Fernanda Freitas and Érica Miranda for providing technical support for bacterial isolation and identification, to Michel Marin for bioinformatics support and to the Oswaldo Cruz Institute high-throughput sequencing platform. This work was supported by CNPq, FAPERJ, Fiocruz and CAPES.

## References

- Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 2001; 26: 32–46.
- Capone A, Ricci I, Damiani C, Mosca M, Rossi P, Scuppa P, et al. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasit Vectors.* 2013; 6(1): 182. doi: 10.1186/1756-3305-6-182.
- Clements AN. *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction.* 1st ed. Wallingford: CABI Publishing; 1992.
- Dada N, Jumas-Bilak E, Manguin S, Seidu R, Stenström TA, Overgaard HJ. Comparative assessment of the bacterial communities associated with *Aedes aegypti* larvae and water from domestic water storage containers. *Parasit Vectors.* 2014; 7:391. doi: 10.1186/1756-3305-7-391.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5):e1000423. doi: 10.1371/journal.ppat.1000423.
- Dutra HL, Dos Santos LM, Caragata EP, Silva JB, Villela DA, Maciel-de-Freitas R, et al. From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(4):e0003689. doi: 10.1371/journal.pntd.0003689.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011; 27(16):2194-200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381.

Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Bacci M Jr, Berbert-Molina MA, Lemos FJ. 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*. 2010; 115: 275-281.

Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Russo Ede S, Peixoto AM, Bacci Júnior M, 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*. 2007; 102(8): 919-24.

Harrington LC, Scott TW, Lerdthusnee K, Coleman RC, Costero A, Clark GG, et al. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72(2): 209-20.

Hegde S, Rasgon JL, Hughes GL. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Curr Opin Virol*. 2015; 15:97-102. doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.011.

Hillyer JF, Schmidt SL, Fuchs JF, Boyle JP, Christensen BM. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cell Microbiol*. 2005; 7(1): 39-51.

Hughes GL, Dodson BL1, Johnson RM, Murdock CC, Tsujimoto H, Suzuki Y, et al. Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(34):12498-503. doi: 10.1073/pnas.1408888111.

Kim CH, Lampman LR, Muturi EJ. Bacterial communities and midgut microbiota associated with mosquito populations from waste tires in East-Central Illinois. *J Med Entomol.* 2015; 52(1): 63-75.

Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(9): 814-21. doi: 10.1038/nbt.2676.

Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(Web Server issue):W475-8. doi: 10.1093/nar/gkr201.

Maciel-de-Freitas R, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R. Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(4): 659-565.

McDonald PT. Population characteristics of domestic *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) in villages on the Kenya coast. II. Dispersal within and between villages. *J Med Entomol.* 1977; 14(1): 49-53.

Minard G, Mavingui P, Moro CV. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors.* 2013; 6:146. doi: 10.1186/1756-3305-6-146.

Minard G, Tran FH, Van VT, Goubert C, Bellet C, Lambert G, et al. French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. *Front Microbiol.* 2015; 6:970. doi: 10.3389/fmicb.2015.00970.

Montagna M, Chouaia B, Mazza G, Prosdocimi EM, Crotti E, Mereghetti V, et al.

Effects of the diet on the microbiota of the red palm weevil (Coleoptera:

Dryophthoridae). PLoS One. 2015; 10(1):e0117439. doi:

10.1371/journal.pone.0117439.

Ngwa CJ, Glöckner V, Abdelmohsen UR, Scheuermayer M, Fischer R, Hentschel U, 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. 2013; 50(2): 404-14.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, et al. vegan:

community ecology package. R package version 2.1-26/r2441 [software]. 2013 [cited

2016 Jun 28]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM. Deep sequencing reveals extensive

variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. Mol Ecol. 2012;

21(20):5138-50. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05759.x.

Ponnusamy L, Xu N, Stav G, Wesson DM, Schal C, Apperson CS. Diversity of

bacterial communities in container habitats of mosquitoes. Microb Ecol. 2008;

56(4):593-603. doi: 10.1007/s00248-008-9379-6.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R

Foundation for Statistical Computing. Version 3.2.3 [software]. 2015 [cited 2016 Jun

28]. Available from: <https://www.R-project.org/>.

Ramirez JL, Short SM, Bahia AC, Saraiva RG, Dong Y, Kang S, et al.

*Chromobacterium* Csp\_P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes

and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. PLoS Pathog. 2014; 10(10):e1004398. doi: 10.1371/journal.ppat.1004398.

Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, et al. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(3):e1561. doi: 10.1371/journal.pntd.0001561.

Rosenberg ZI, Rosenberg E 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. FEMS Microbiol Rev. 2008; 32(5):723-35. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(23):7537-41. doi: 10.1128/AEM.01541-09.

Terenius O, Lindh JM, Eriksson-Gonzales K, Bussière L, Laugen AT, Bergquist H, et al. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. FEMS Microbiol Ecol. 2012; 80(3):556-65. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01317.x.

Villegas LM, Pimenta PF 2014. Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. Mem Inst Oswaldo Cruz 109(5): 672-684.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(16): 5261-5267.

Wang Y, Gilbreath TM 3rd, Kikutla P, Yan G, Xu J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. 2011; 6(9):e24767. doi: 10.1371/journal.pone.0024767.

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog. 2008; 4(7):e1000098. doi: 10.1371/journal.ppat.1000098.

Zouache K, Michelland RJ, Failloux AB, Grundmann GL, Mavingui P. Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. Mol Ecol. 2012; 21(9):2297-309. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05526.x.

Zouache K, Raharimalala FN, Raquin V, Tran-Van V, Raveloson LH, Ravelonandro P, et al. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. FEMS Microbiol Ecol. 2011; 75(3):377-89. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x.

**Table 1. Characterization of *Ae. aegypti* microbiota groups selected for diversity investigation via 16S rRNA gene pyrosequencing and bacteria isolation.**

| <b>Group (abbreviation)</b>    | <b>Age (days)</b> | <b>Diet</b>   | <b>N samples</b> | <b>Mosquitoes analyzed</b> | <b>Sample IDs</b>   |
|--------------------------------|-------------------|---------------|------------------|----------------------------|---|
| Sugar-fed young (SFY)          | 3                 | Sugar         | 4                | 8                          | SFY1, SFY2, SFY3, SFY4  |
| Blood-fed young (BFY)          | 3                 | Sugar + Blood | 2                | 4                          | BFY1, BFY2  |
| Sugar-fed old (SFO)            | 38                | Sugar         | 4                | 8                          | SFO1, SFO2, SFO3, SFO4  |
| Mark-release-recaptured (MRR)* | 5 to 11           | Sugar + Blood | 8                | 15                         | TwoDAR1, TwoDAR2,<br>FourDAR1, FourDAR2,<br>SixDAR1, SixDAR2,<br>SevenDAR, EightDAR |
| Wild (WD)**                    | Unknown           | Unknown       | 4                | 8                          | WD1, WD2, WD3, WD4  |

\*Samples from two, four, six, seven and eight days after release (DAR). Each sample consisted of 2 pooled midguts with the exception of one sample from MRR (EightDAR) in which only 1 female was available. Bacteria isolation from samples four, seven and eight DAR.

\*\*Bacteria isolation not performed.

**Table 2. Average  $\pm$  SD of diversity metrics calculated for the bacterial communities associated with the analyzed *Ae. aegypti* groups.**

| <b>Group</b> | <b>S</b>         | <b>ACE</b>       | <b>H</b>        | <b>1/D</b>      | <b>H'</b>       |
|--------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| SFY          | 21.25 $\pm$ 3.20 | 27.21 $\pm$ 6.2  | 1.29 $\pm$ 0.21 | 2.46 $\pm$ 0.51 | 0.42 $\pm$ 0.05 |
| BFY          | 24.50 $\pm$ 2.12 | 33.47 $\pm$ 2.16 | 1.34 $\pm$ 0.17 | 2.38 $\pm$ 0.36 | 0.42 $\pm$ 0.04 |
| SFO          | 20.75 $\pm$ 0.96 | 25.30 $\pm$ 1.89 | 1.58 $\pm$ 0.10 | 3.66 $\pm$ 0.69 | 0.52 $\pm$ 0.03 |
| MRR          | 22.25 $\pm$ 3.92 | 27.55 $\pm$ 6.75 | 1.32 $\pm$ 0.13 | 2.40 $\pm$ 0.30 | 0.43 $\pm$ 0.03 |
| WD           | 21.25 $\pm$ 1.26 | 29.88 $\pm$ 5.03 | 1.14 $\pm$ 0.05 | 2.10 $\pm$ 0.10 | 0.37 $\pm$ 0.02 |

S, richness (number of OTUs); ACE, Abundance-based Cover Estimator; H, Shannon Index; 1/D, inverse Simpson Index; H', Evenness. SFY, Sugar-fed young; BFY, blood-fed young; SFO, sugar-fed old; MRR, mark-released-recaptured; WD, wild.

**Table 3. Taxonomic affiliation of strains isolated from *Ae. aegypti* females released in the natural habitat (MRR) and submitted to different dietary regimes in the laboratory (SFY, BFY and SFO).**

| Phylum         | Class               | Family             | Presumable genera (RDP classifier) | Genbank accession numbers | Isolation media | Source                |
|----------------|---------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------|
| Bacteroidetes  | Flavobacteria       | Flavobacteriaceae  | <i>Elizabethkingia</i>             | KU096882 - KU096890       | LB, TSA<br>0.1x | SFY; SFO              |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriaceae | <i>Enterobacter</i>                | KU096891 - KU096894       | LB, TSA<br>0.1x | SFY; SFO              |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadaceae   | <i>Pseudomonas</i>                 | KU096895 - KU096904       | LB, TSA<br>0.1x | BFY; MRR<br>(FourDAR) |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Microbacteriaceae  | <i>Microbacterium</i>              | KU096905, KU096906        | LB, TSA<br>0.1x | MRR<br>(FourDAR)      |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Acetobacteraceae   | <i>Asaia</i>                       | KU096907 - KU096910       | LB, TSA<br>0.1x | MRR<br>(FourDAR)      |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Xanthobacteraceae  | <i>Azorhizobium</i>                | KU096911                  | LB              | MRR<br>(FourDAR)      |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodobacteraceae   | <i>Paracoccus</i>                  | KU096912 - KU096915       | LB, TSA<br>0.1x | MRR<br>(FourDAR)      |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria  | Oxalobacteraceae   | <i>Herbaspirillum</i>              | KU096916                  | LB              | MRR<br>(EightDAR)     |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriaceae | <i>Serratia</i>                    | KU096917                  | LB              | SFO                   |

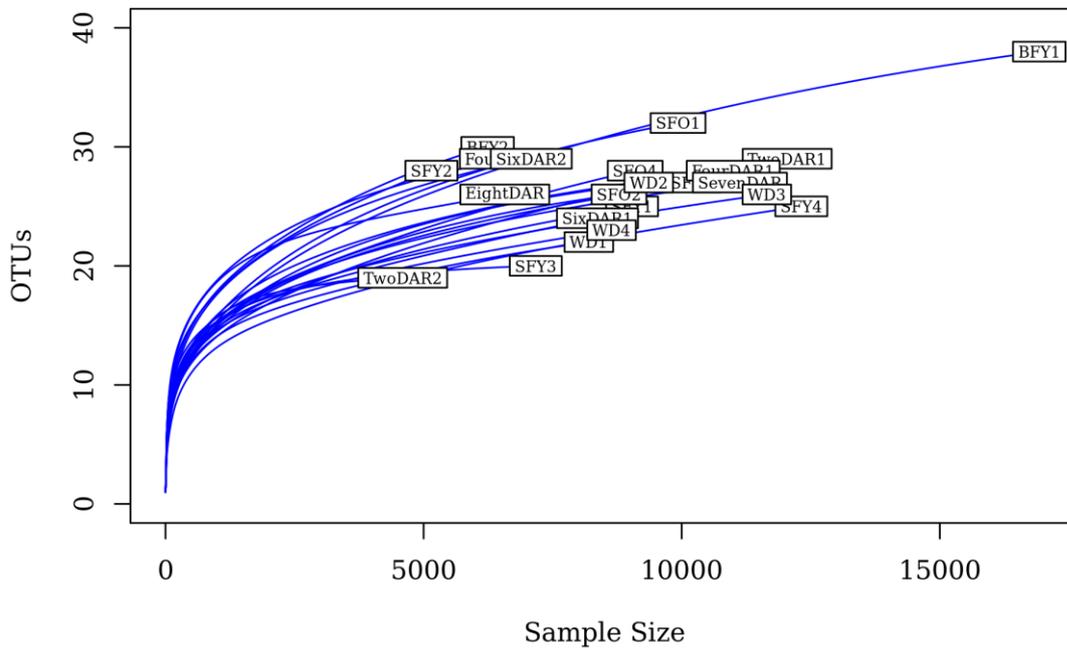
SFY, Sugar-fed young; BFY, blood-fed young; SFO, sugar-fed old; DAR, days after release in the mark-release-recapture experiment.

**Supplementary Table 1. *Ae. aegypti* microbiota composition (number of reads) per sample.**

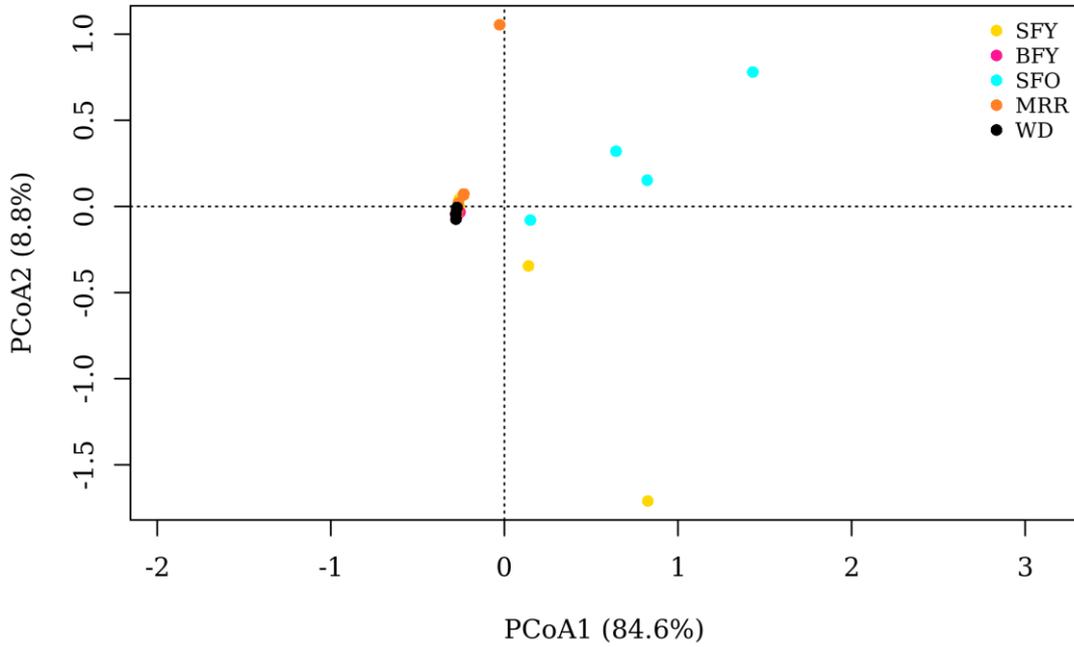
| Phyla          | Class               | Order             | Family             | Genus                   | SF<br>Y_<br>1 | SF<br>Y_<br>2 | SF<br>Y_<br>3 | SF<br>Y_<br>4 | BF<br>Y_<br>1 | BF<br>Y_<br>2 | SF<br>O_<br>1 | SF<br>O_<br>2 | SF<br>O_<br>3 | SF<br>O_<br>4 | TwoD<br>AR_1 | TwoD<br>AR_2 | Four<br>DAR_<br>1 | Four<br>DAR_<br>2 | SixD<br>AR_<br>1 | SixD<br>AR_<br>2 | Seve<br>nDA<br>R | Eight<br>DAR | W<br>D_<br>1 | W<br>D_<br>2 | W<br>D_<br>3 | W<br>D_<br>4 |
|----------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Bacteroidetes  | Flavobacteria       | Flavobacteriales  | Flavobacteriaceae  | <i>Elizabethkingia</i>  | 0             | 788           | 13            | 2631          | 0             | 0             | 1174          | 1560          | 1423          | 701           | 0            | 0            | 0                 | 0                 | 0                | 0                | 7                | 4            | 0            | 0            | 0            | 0            |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Rhodospirillales  | Acetobacteraceae   | <i>Asaia</i>            | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 2             | 941           | 10            | 39            | 0            | 0            | 0                 | 87                | 0                | 0                | 0                | 5            | 0            | 0            | 0            | 0            |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria  | Burkholderiales   | Comamonadaceae     | *                       | 112           | 162           | 162           | 43            | 109           | 228           | 64            | 58            | 60            | 96            | 129          | 171          | 133               | 194               | 128              | 193              | 162              | 329          | 123          | 111          | 150          | 152          |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria  | Burkholderiales   | Oxalobacteraceae   | *                       | 728           | 587           | 914           | 358           | 766           | 763           | 402           | 160           | 474           | 564           | 853          | 1006         | 786               | 679               | 803              | 965              | 878              | 913          | 1114         | 812          | 1061         | 897          |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Aeromonadales     | Aeromonadaceae     | <i>Aeromonas</i>        | 87            | 105           | 54            | 28            | 95            | 154           | 40            | 7             | 27            | 44            | 53           | 96           | 92                | 112               | 66               | 116              | 66               | 122          | 72           | 55           | 57           | 63           |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriales | Enterobacteriaceae | *                       | 67            | 35            | 60            | 19            | 36            | 34            | 745           | 1124          | 912           | 166           | 675          | 61           | 26                | 22                | 47               | 41               | 34               | 88           | 53           | 24           | 45           | 58           |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadales   | Pseudomonadaceae   | <i>Pseudomonas</i>      | 3289          | 2524          | 3148          | 1434          | 3260          | 2869          | 1980          | 646           | 1639          | 2777          | 2598         | 3034         | 3215              | 3007              | 3126             | 2963             | 3130             | 2664         | 3114         | 3386         | 3050         | 3185         |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadales   | Moraxellaceae      | <i>Acinetobacter</i>    | 156           | 217           | 119           | 51            | 178           | 309           | 109           | 55            | 17            | 115           | 105          | 148          | 173               | 251               | 121              | 182              | 155              | 250          | 67           | 118          | 146          | 148          |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadales   | Pseudomonadaceae   | *                       | 19            | 9             | 4             | 1             | 15            | 18            | 8             | 4             | 2             | 4             | 137          | 8            | 8                 | 21                | 209              | 8                | 18               | 16           | 5            | 4            | 2            | 4            |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Xanthomonadales   | Xanthomonadaceae   | <i>Stenotrophomonas</i> | 68            | 51            | 46            | 14            | 85            | 88            | 39            | 18            | 4             | 21            | 2            | 10           | 68                | 71                | 14               | 13               | 74               | 85           | 2            | 18           | 16           | 24           |
| Other          | Other               | Other             | Other              | Other                   | 73            | 121           | 79            | 20            | 55            | 136           | 36            | 26            | 31            | 72            | 47           | 65           | 98                | 155               | 85               | 118              | 75               | 123          | 49           | 71           | 72           | 68           |

SFY, sugar-fed young; BFY, blood-fed young; SFO, sugar-fed old; DAR, days after release in the mark-release-recapture experiment; WD, wild. Taxa with

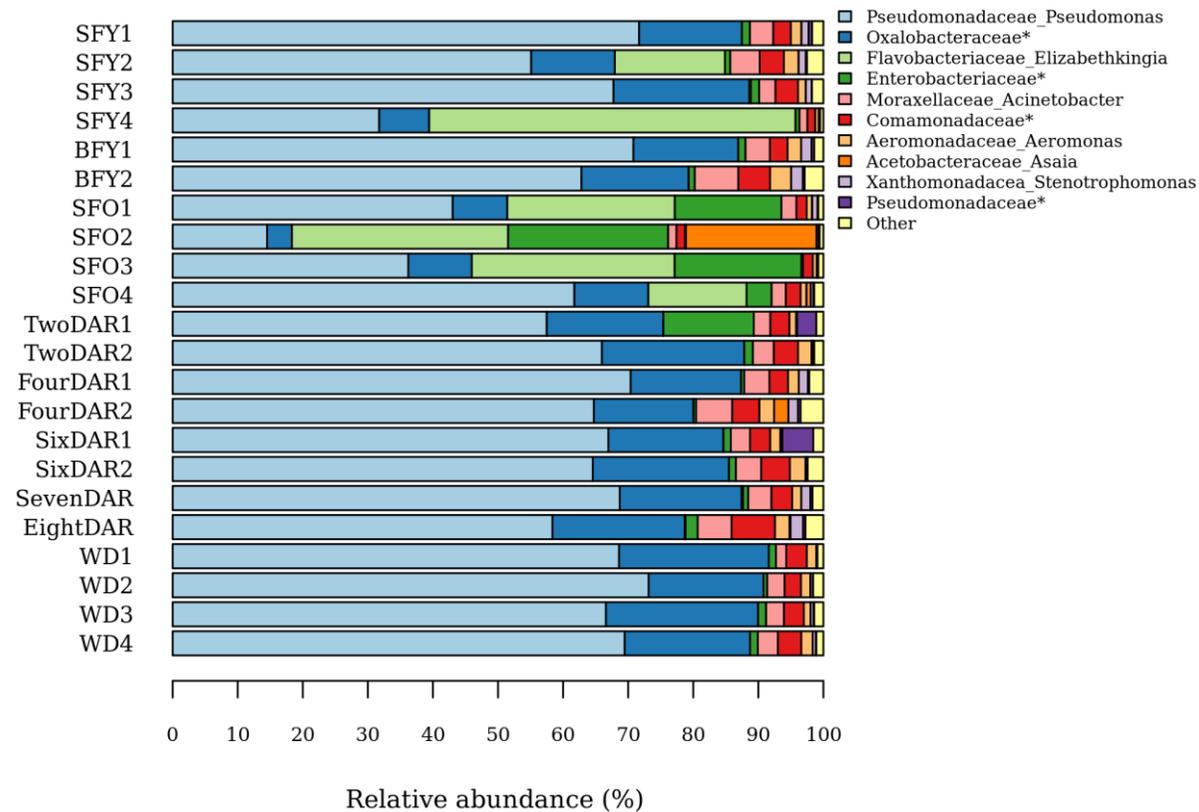
<2% of relative abundance were pooled as “Other”. \* not discriminated at genus level.



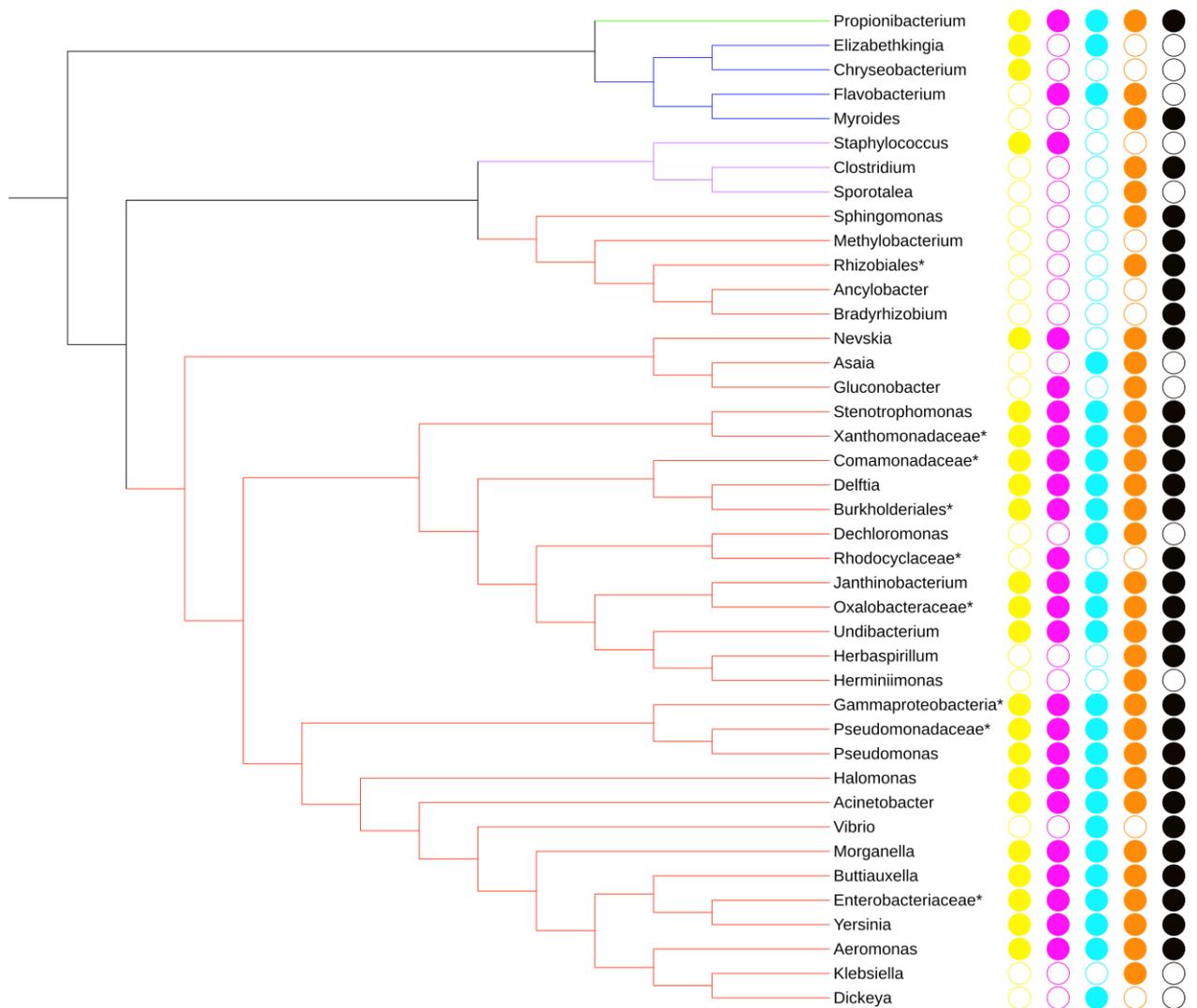
**Figure 1. Rarefaction curves for each sample.** OTUs at 3% distance were plotted for each sample against the number of sequences generated through 454-pyrosequencing (Sample Size). SFY, sugar-fed young; BFY, blood-fed young; SFO, sugar-fed old; DAR, days after release in the mark-release-recapture experiment; WD, wild.



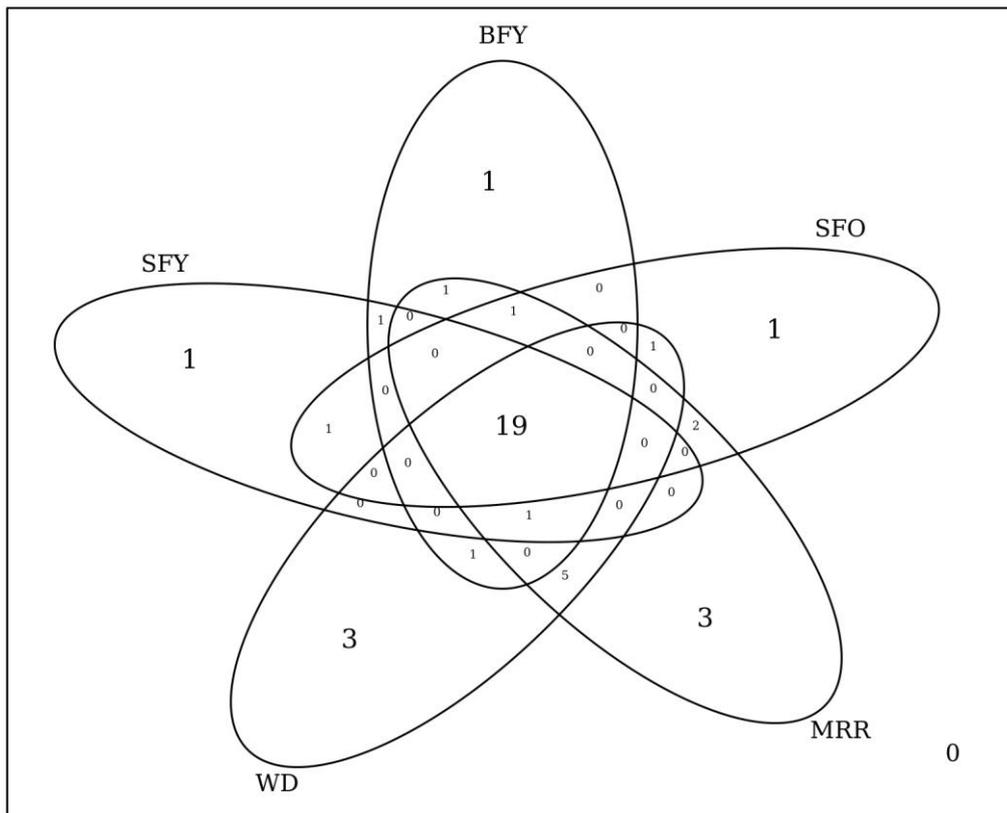
**Figure 2. Principal Coordinate Analysis (PCoA) of Bray-Curtis distances among *Ae. aegypti* microbiota samples.** Bray-Curtis distance was calculated with OTUs at 3% maximum distance. SFY, sugar-fed young (yellow); BFY, blood-fed young (pink); SFO, sugar-fed old (blue); MRR, mark-released-recaptured (orange); WD, wild (black). Each axis shows percentage of variation explained.



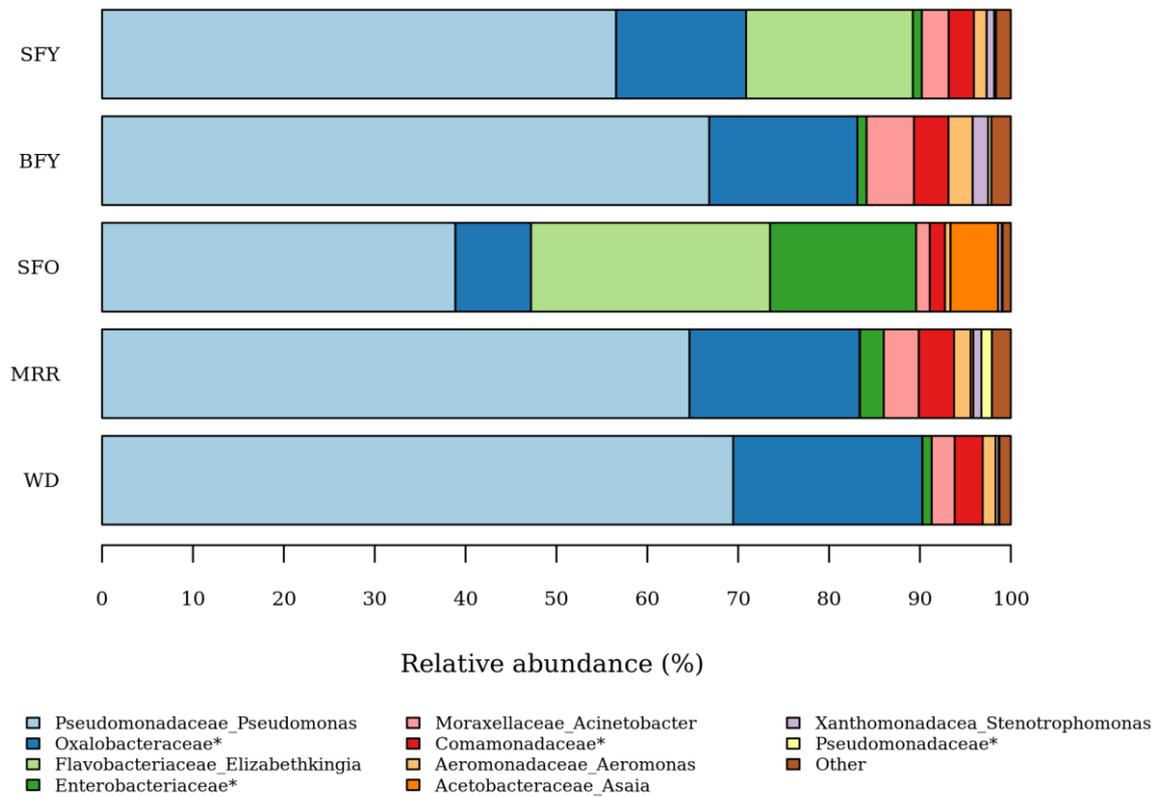
**Figure 3. *Ae. aegypti* microbiota composition per sample.** Gut bacterial taxonomic composition of *Ae. aegypti* adult females was determined via 16S rRNA gene deep-sequencing. SFY, sugar-fed young; BFY, blood-fed young; SFO, sugar-fed old; DAR, days after release in the mark-release-recapture experiment; WD, wild. Taxa with <2% of relative abundance were pooled as “Other”. \* not discriminated at genus level.



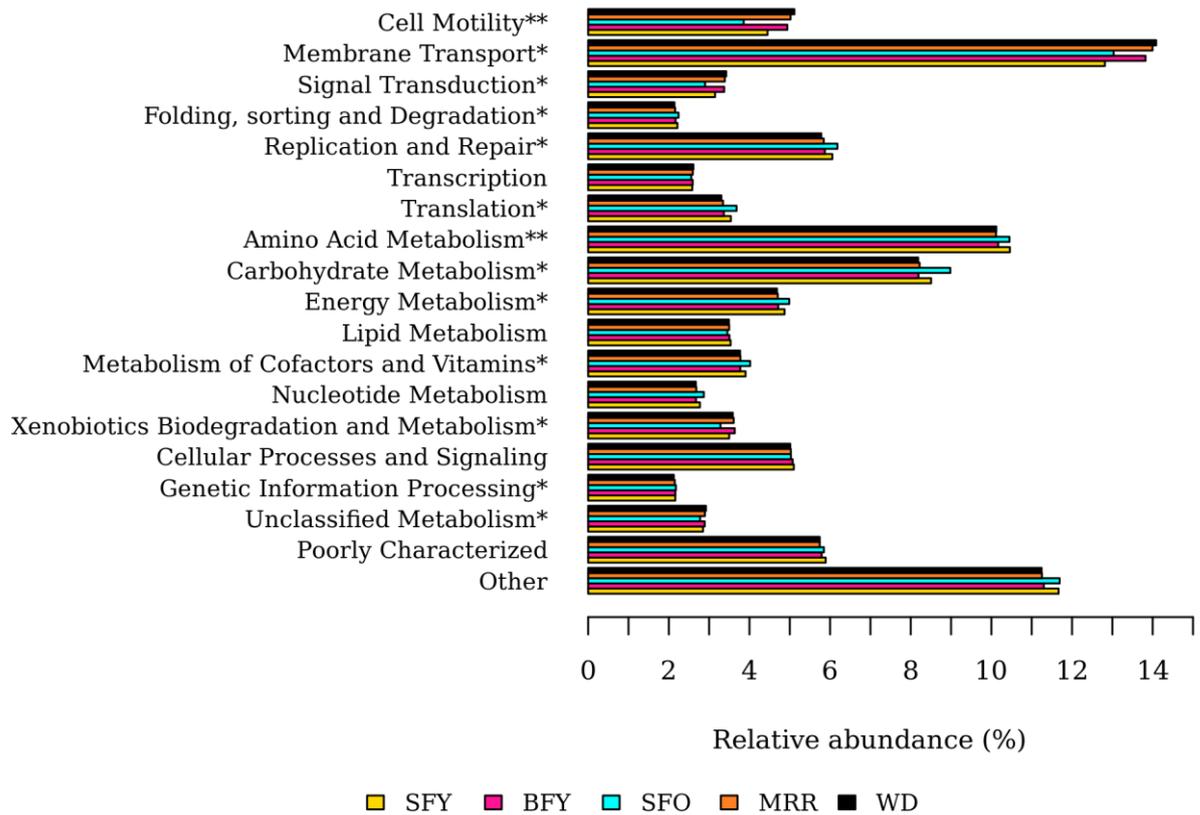
**Figure 4. Phylogenetic tree of bacterial taxa detected in *Ae. aegypti* female midgut via 16S rRNA gene deep-sequencing.** Yellow circles indicate taxa identified in sugar-fed young females (SFY), pink circles in blood-fed young (BFY), light-blue in sugar-fed old (SFO), orange in mark-released-recaptured (MRR) and black in wild (WD) females. Taxa were classified according to their phyla: Bacteroidetes (blue), Actinobacteria (green), Firmicutes (purple) and Proteobacteria (red). \* not discriminated at genus level.



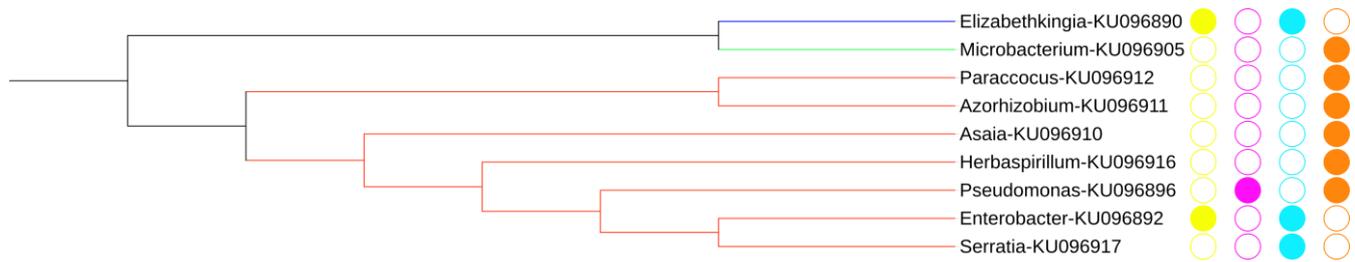
**Figure 5. Venn diagram showing the number of bacterial taxa identified in the *Ae. aegypti* microbiota via 16S rRNA gene deep-sequencing. SFY, sugar-fed young; BFY, blood-fed young; SFO, sugar-fed old; MRR, mark-released-recaptured; WD, wild.**



**Figure 6. *Ae. aegypti* microbiota composition per groups.** Gut bacterial taxonomic composition of *Ae. aegypti* adult females was determined via 16S rRNA gene deep-sequencing. SFY, sugar-fed young; BFY, blood-fed young; SFO, sugar-fed old; MRR, mark-released-recaptured; WD, wild. Taxa with <2% of relative abundance were pooled as “Other”. \* not discriminated at genus level.



**Figure 7. Predicted functions of the bacterial communities found in *Ae. aegypti* adult females.** Yellow bars indicate metabolic KEGG pathways predicted in the microbiota of sugar-fed young females (SFY), pink bars in blood-fed young (BFY), light-blue in sugar-fed old (SFO), orange in mark-released-recaptured (MRR) and black in wild females (WD). \* indicates gene categories significantly different between SFO and WD mosquitoes. \*\* indicates gene categories significantly different among SFO and both MRR and WD mosquitoes (Kruskal-Wallis test, BH corrected p-value < 0.05).



**Figure 8. Phylogenetic tree of culturable bacterial genera recovered from *Ae.***

***aegypti* females.** SFY, sugar-fed young (yellow); BFY, blood-fed young (pink); SFO, sugar-fed old (blue); MRR, marked-released-recaptured (orange). Bacteria genera were classified according to their phyla: Bacteroidetes (blue), Actinobacteria (green) and Proteobacteria (red).

## 5. CAPÍTULO II - Influência de *Asaia* e *Elizabethkingia* no desenvolvimento larvar de *Aedes aegypti*

### 5.1. Justificativa

O lúmen intestinal dos mosquitos representa o primeiro local de interações vetor-patógeno e também alberga uma comunidade microbiana, capaz de proteger o inseto de infecções por arbovírus (Xi *et al.* 2008; Ramirez *et al.* 2012, 2014). Neste contexto, as bactérias naturalmente presentes no tubo digestivo podem, de alguma forma, interagir direta ou indiretamente com patógenos e se tornar potenciais agentes para mitigar a transmissão de arboviroses. Além disso, genes que expressam moléculas capazes de bloquear ou reduzir a infecção do inseto por patógenos podem ser inseridos artificialmente no genoma de microorganismos que fazem parte da microbiota intestinal, abordagem conhecida como paratransgênese (Durvasula *et al.* 1997; Favia *et al.* 2007).

Uma etapa importante para a utilização da microbiota no controle biológico de arboviroses é o conhecimento de como as bactérias influenciam a biologia e a adaptabilidade dos artrópodes vetores (Minard *et al.* 2013a). Sabe-se que, em *Ae. aegypti*, a microbiota é funcionalmente importante para o desenvolvimento das formas imaturas (Coon *et al.* 2014), digestão do sangue e produção de ovos (Gaio *et al.* 2011), etapas cruciais para o ciclo de vida do inseto. Entretanto, a influência de bactérias específicas da microbiota na biologia das formas imaturas deste mosquito ainda é pouco explorada. Até o momento, uma linhagem de *Chromobacterium*, isolada do intestino de mosquitos coletados no Panamá, reduziu consideravelmente a sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti* (Ramirez *et al.* 2014).

Investigações sobre o impacto de bactérias específicas da microbiota na biologia dos insetos requerem a identificação e preservação de membros da comunidade intestinal através de abordagens dependentes do cultivo (Hedge *et al.* 2015). A microbiota cultivável de *Ae. aegypti* tem sido investigada em larvas e adultos provenientes de colônias de laboratório (Gusmão *et al.* 2010; Terenius *et al.* 2012; Coon *et al.* 2014) e populações do campo (Zouache *et al.* 2011; Ramirez *et al.* 2012). Em geral, a composição da microbiota apresenta variações, o que sugere que pelo menos parte das bactérias é adquirida do ambiente, de criadouros e/ou fontes alimentares, por exemplo (Zouache *et al.* 2011). Mesmo assim alguns grupos parecem ser mais comumente encontrados, como *Asaia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia* (Gusmão *et al.* 2010; Zouache *et al.* 2011; Ramirez *et al.* 2012; Terenius *et al.* 2012; Coon *et al.* 2014). Alguns destes gêneros são candidatos promissores à aplicação no controle da transmissão de patógenos por mosquitos devido à sua associação recorrente com estes insetos e/ou transmissão vertical e interestádios, por exemplo (Crotti *et al.* 2009; Cirimotich *et al.* 2011b; Capone *et al.* 2013).

Desta maneira, o presente teve como objetivo isolar e identificar bactérias cultiváveis do intestino de indivíduos provenientes de duas populações de *Ae. aegypti*: uma colônia de laboratório (Paea) e uma proveniente de uma área endêmica para dengue (Colônia Z-10). Em seguida, nós avaliamos os efeitos de bactérias no desenvolvimento e sobrevivência de larvas, assim como no tamanho do adulto gerado. A seleção das linhagens microbianas testadas foi feita com base em estudos anteriores que apontaram algumas bactérias como possíveis candidatos à aplicação em estratégias de controle de doenças transmitidas por vetores (Crotti *et al.* 2009; Ngwa *et al.* 2013). Duas linhagens isoladas do intestino de *Ae. aegypti* durante esta tese foram selecionadas para os experimentos. A linhagem AE\_06 (acesso GenBank: KR703670) pertence ao

gênero *Asaia* (Proteobacteria: Acetobacteraceae) e foi isolada do intestino de fêmeas de *Paea*. *Asaia* é uma acetobactéria frequentemente encontrada em associação com insetos que se alimentam de néctar, incluindo várias espécies de mosquitos, entre elas *Ae. aegypti* (revisado em Crotti *et al.* 2010). A outra linhagem selecionada foi a VV\_01, isolada de *Ae. aegypti* coletados em Vila Valqueire (22°53'09"S; 43°21'59" O), Rio de Janeiro, Brasil por David e colaboradores (2016 - Capítulo I). Esta linhagem pertence ao gênero *Elizabethkingia* (Bacteroidetes: Flavobacteriaceae) (acesso GenBank: KU096882). Bactérias deste grupo já foram isoladas de *Ae. aegypti* (Ramirez *et al.* 2012; Terenius *et al.* 2012) e *Anopheles* (Rani *et al.* 2009; Ngwa *et al.* 2013).

## 5.2. Metodologia

**Mosquitos.** Nesse experimento foram utilizados mosquitos de duas origens distintas: uma colônia de laboratório e uma população de campo. Como representante da colônia de laboratório usamos a cepa Paea, cuja primeira geração foi coletada na Polinésia Francesa em 1994 e mantida em laboratório desde então (Vazeille-Falcoz *et al.* 1999). As larvas foram alimentadas com ração comercial para peixe (Tetramin®) e criadas a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Como representante da população de campo usamos insetos selvagens coletados na localidade Colônia Z-10 ( $22^\circ49'23.50''\text{S}$ ;  $43^\circ10'42.93''\text{O}$ ), uma comunidade de pescadores localizada no Rio de Janeiro, Brasil. Larvas L3-L4, pupas, a água e o sedimento de dois criadouros naturais foram coletados, trazidos para o laboratório e acondicionados em copos plásticos limpos. Os copos foram preenchidos apenas com a água do criadouro, sem adição de alimento, e foram mantidas a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  até a emergência dos adultos, os quais foram alimentados *ad libitum* com uma solução 10% de glicose esterilizada.

**Isolamento e identificação das bactérias.** Larvas (L4) e fêmeas adultas escolhidas aleatoriamente foram esterilizadas em etanol 70% por 1 minuto e enxaguadas em PBS estéril. Uma alíquota deste PBS foi plaqueada em LBA e amostras cujo crescimento bacteriano foi verificado foram descartadas, pois as amostras poderiam estar contaminadas por bactérias da superfície externa dos mosquitos. O procedimento para as larvas foi realizado em gelo para evitar a ingestão do etanol. O intestino médio de cada indivíduo foi retirado em condições estéreis e macerado em PBS.

Um alíquota de 50 $\mu\text{l}$  do macerado intestinal de cinco fêmeas de *Ae. aegypti* da população Paea foi individualmente diluído dez vezes e 100 $\mu\text{l}$  foi semeado em cada placa de cultura contendo TSA, TSA (0,1x), Nutriente Agar (NA), MacConkey Agar

(MCA) ou LBA com a finalidade de selecionar os meios de crescimento capazes de recuperar a maior diversidade de bactérias. As placas foram mantidas a 25 ou 35°C por sete dias consecutivos, durante os quais amostras das colônias bacterianas foram coletadas com base na morfologia para identificação taxonômica. A partir destes resultados (Tabela 5.1), foram utilizados os meios LBA e TSA (0,1x) a 25°C por 72 horas nos isolamentos de amostras do intestino de larvas de *Paea* (N=6) e de fêmeas adultas da Colônia Z-10 (N=8). Amostras de cada morfotipo foram criopreservadas.

Tabela 5.1. As amostras do intestino de fêmeas de *Ae. aegypti* da colônia *Paea* foram diluídas, semeadas em diferentes meios de cultura e incubadas a 25 ou 35°C por sete dias. Ao longo deste período, isolados bacterianos foram preservados de acordo com a morfologia. A identificação taxonômica foi baseada na sequência das regiões hipervariáveis V1-V3 do gene 16S rRNA.

| Meio de cultura | Concentração* | 25°C   | 35°C                                   |
|-----------------|---------------|--|--|
| TSA             | 1x            | <i>Erwinia</i> ,<br>Enterobacteriaceae,<br><i>Pseudomonas</i>                | <i>Pseudomonas</i>                     |
| TSA             | 0,1x          | <i>Asaia</i> , <i>Erwinia</i> ,<br>Enterobacteriaceae,<br><i>Pseudomonas</i> | -                                      |
| Nutriente Agar  | 0,1x          | Enterobacteriaceae,<br><i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i>                   | <i>Pseudomonas</i>                     |
| MacConkay Agar  | 1x            | <i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i>  | <i>Pseudomonas</i>                     |
| LBA             | 1x            | Enterobacteriaceae,<br><i>Erwinia</i> , <i>Pseudomonas</i>                   | <i>Erwinia</i> ,<br><i>Pseudomonas</i> |

\* De acordo com as instruções do fabricante.

O DNA foi extraído através de choque térmico. Um seguimento do gene 16S rRNA (~519 bp), entre as regiões hipervariáveis V1 e V3 foi amplificada utilizando iniciadores universais (PaF 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 519R 5'-

GTATTACCGCGGCTGCTG-3'). A PCR foi realizada com a enzima GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) em condições padrão. Os produtos foram purificados com o uso do kit Illustra PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, BUX, UK) e sequenciados com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no sequenciador ABI 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A identificação taxonômica dos isolados foi determinada com o programa Ribossomal Data Project Classifier (RDP, <https://rdp.cme.msu.edu/classifier>, Versão 2.10) com uma confiança mínima de 80% ao nível de gênero. Todas as sequências foram submetidas ao repositório público GenBank do NCBI e isolados de cada gênero foram depositados na Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

**Exposição das larvas e monitoramento do desenvolvimento.** Larvas L1 com 24 horas pós-eclosão dos ovos foram colocadas individualmente em poços de placas de cultura (N=36/grupo). Cada poço recebeu 4 ml de água desclorada, 3 mg de ração comercial para peixe (Tetramin®) e 100 µl de cultura de *Asaia* ou *Elizabethkingia* suspensas em PBS estéril após três lavagens (OD<sub>600</sub>=1). Os controles receberam 100µl de PBS. O desenvolvimento larvar foi monitorado através de três observações diárias (08:00, 13:00 e 17:00), durante as quais foram registradas a mortalidade e a mudança de estágio para cada indivíduo, até que os imaturos alcançassem a fase alada. Os indivíduos mortos foram computados e retirados, assim como as exúvias. Para cada adulto resultante foi registrado o sexo e o comprimento da asa. Todo o experimento foi realizado no insetário a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para verificar a colonização de *Asaia* e *Elizabethkingia* no tubo digestivo das larvas, uma amostra de cada grupo de larvas L4 foi dissecada conforme descrito

anteriormente, homogeneizado e semeado em meio LBA e meio específico para isolamento de *Asaia* (AIM) (Yamada *et al.* 2000).

**Análise estatística.** A análise de sobrevivência não paramétrica de Kaplan-Meier foi aplicada para determinar a influência da exposição à *Asaia* e *Elizabethkingia* no tempo total de desenvolvimento larvar (L1 ao adulto), na duração dos estádios larvares (L1, L2, L3 e L4) e pupa e na sobrevivência das larvas. Diferenças globais entre os grupos Controle, +*Asaia* e +*Elizabethkingia* foram testadas pelo teste Log-Rank. Em caso de significância estatística, os grupos experimentais foram comparados através de testes pareados com o controle. O nível de significância foi corrigido de acordo com o critério de Bonferroni. O comprimento das asas foi comparado através do teste de Kruskal-Wallis. As análises estatísticas foram realizadas no R (version 3.2.3) (R Core Team 2008).

### 5.3. Resultados

**Isolamento e identificação das bactérias da microbiota.** A microbiota cultivável de larvas (Paea) e fêmeas adultas (Paea e Colônia Z-10) foi representada por 114 morfotipos bacterianos, os quais totalizaram 149 isolados. No total, 83% (124) destes foram identificados até o nível de gênero e 17% (25) até família com base no sequenciamento da região hipervariável V1-V3 do gene 16S rRNA. Foram obtidas linhagens pertencentes a quatro filos, 12 famílias e 16 diferentes gêneros bacterianos. As linhagens recuperadas das larvas pertencem aos gêneros *Microbacterium* (Actinobacteria), *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Sphingobacterium* (Bacteroidetes), *Bacillus*, *Paenibacillus* (Firmicutes) e *Pseudomonas* (Proteobacteria). Já os taxa *Asaia*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas* e Enterobacteriaceae, todos do filo Proteobacteria, foram isolados de fêmeas adultas da colônia de laboratório Paea. Considerando as fêmeas oriundas do campo (Colônia Z-10), além de linhagens de Proteobacteria (*Comamonas*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Hydrogenophilus*, *Providencia*, *Pseudomonas* e Enterobacteriaceae), um membro do filo Firmicutes (*Staphylococcus*) também foi recuperado. O gênero *Pseudomonas* foi o único ubíquo em todos os grupos analisados (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Identificação taxonômica das bactérias isoladas da microbiota intestinal de larvas da colônia de laboratório Paea (LP) e fêmeas adultas de Paea (FP) e da localidade Colônia Z-10 (FC) a partir da sequência das regiões hipervariáveis V1-V3 do gene 16S rRNA.

| Filo           | Classe              | Família             | Gênero<br>(RDP classifier) | Acesso no Genbank   | Fonte |    |    |
|----------------|---------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|-------|----|----|
|                |                     |                     |                            |                     | LP    | FP | FC |
| Actinobacteria | Actinobacteria      | Microbacteriaceae   | <i>Microbacterium</i>      | KR703689 - KR703696 | X     |    |    |
| Bacteroidetes  | Flavobacteria       | Flavobacteriaceae   | <i>Chryseobacterium</i>    | KR703697 - KR703703 | X     |    |    |
| Bacteroidetes  | Flavobacteria       | Flavobacteriaceae   | <i>Flavobacterium</i>      | KR703704            | X     |    |    |
| Bacteroidetes  | Sphingobacteria     | Sphingobacteriaceae | <i>Sphingobacterium</i>    | KR703709 - KR703711 | X     |    |    |
| Firmicutes     | Bacilli             | Bacillaceae         | <i>Bacillus</i>            | KR703712 - KR703717 | X     |    |    |
| Firmicutes     | Bacilli             | Paenibacillaceae    | <i>Paenibacillus</i>       | KR703705            | X     |    |    |
| Firmicutes     | Bacilli             | Staphylococcaceae   | <i>Staphylococcus</i>      | KR703707            |       |    | X  |
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Acetobacteraceae    | <i>Asaia</i>               | KR703670 - KR703688 |       | X  |    |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria  | Comamonadaceae      | <i>Comamonas</i>           | KR703809 - KR703810 |       |    | X  |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriaceae  | <i>Enterobacter</i>        | KR703813 - KR703818 |       |    | X  |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriaceae  | <i>Erwinia</i>             | KR703759 - KR703783 |       | X  |    |

|                |                     |                    |                        |                     |   |   |   |
|----------------|---------------------|--------------------|------------------------|---------------------|---|---|---|
| Proteobacteria | Alphaproteobacteria | Acetobacteraceae   | <i>Gluconobacter</i>   | KR703758            |   | X |   |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria  | Oxalobacteraceae   | <i>Herbaspirillum</i>  | KR703706            |   |   | X |
| Proteobacteria | Betaproteobacteria  | Burkholderiaceae   | <i>Hydrogenophilus</i> | KR703708            |   |   | X |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriaceae | <i>Providencia</i>     | KR703811 - KR703812 |   |   | X |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadaceae   | <i>Pseudomonas</i>     | KR703718 - KR703757 | X | X | X |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriaceae | (*)                    | KR703784 - KR703808 |   | X | X |

(\*) Alguns gêneros da família Enterobacteriaceae não podem ser discriminados nas condições atuais

**Efeitos de *Asaia* e *Elizabethkingia* no desenvolvimento e mortalidade larvar e tamanho do adulto.** O tempo total de desenvolvimento (L1 ao adulto) médio foi 180,87, 173,23 e 171,04 horas para os grupos Controle, +*Asaia* e +*Elizabethkingia*, respectivamente (Tabela 5.3). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no desenvolvimento das larvas expostas a *Asaia* em relação ao grupo controle (Figuras 5.1 e 5.2, Tabelas 5.3 e 5.4). Por outro lado, larvas do grupo +*Elizabethkingia* se desenvolveram mais rápido do estágio L1 a L2 e também de L1 ao adulto (Figuras 5.1A e 5.2, Tabelas 5.3 e 5.4). Os grupos Controle, +*Asaia* e +*Elizabethkingia* apresentaram 15, 8 e 23% de mortalidade, respectivamente (Tabela 5.3). A sobrevivência (Figura 5.3, Tabela 5.3) e o comprimento da asa (KW=0,3; d.f.=2; p-valor > 0,05) (Tabela 5.3) não foram considerados diferentes entre os três grupos monitorados.

Tabela 5.3. Mediana, média e desvio-padrão (DP) das durações de cada estágio larvar e de pupa (horas), desenvolvimento total (horas), comprimento de asa (mm) e sobrevivência (intervalo de confiança 95%) de *Ae. aegypti* expostos aos gêneros *Asaia* e *Elizabethkingia*.

|                               | Control           |        |       | + <i>Asaia</i>  |        |       | + <i>Elizabethkingia</i> |        |      |
|-------------------------------|-------------------|--------|-------|-----------------|--------|-------|--------------------------|--------|------|
|                               | Mediana           | Média  | DP    | Mediana         | Média  | DP    | Mediana                  | Média  | DP   |
| <b>L1 (h)</b>                 | 33                | 40,28  | 7,60  | 33              | 37,11  | 9,13  | 33                       | 32,71  | 5,27 |
| <b>L2(h)</b>                  | 19                | 15,77  | 7,05  | 19              | 18,63  | 7,57  | 19                       | 18,03  | 3,14 |
| <b>L3 (h)</b>                 | 24                | 24,32  | 3,55  | 24              | 24,30  | 4,89  | 24                       | 23,73  | 1,46 |
| <b>L4 (h)</b>                 | 48                | 50,11  | 7,88  | 48              | 54,11  | 28,03 | 48                       | 47,30  | 5,26 |
| <b>Pupa (h)</b>               | 50                | 52,37  | 5,61  | 48              | 46,84  | 6,51  | 48                       | 49,43  | 7,08 |
| <b>Total (h)</b>              | 177               | 180,87 | 10,64 | 168             | 173,23 | 11,10 | 168                      | 171,04 | 3,91 |
| <b>Asa (mm)</b>               | 2,2               | 2,27   | 0,25  | 2,1             | 2,27   | 0,28  | 2,1                      | 2,27   | 0,31 |
| <b>Razão sexual (M:F)</b>     | 1,9:1             |        |       | 2,1:1           |        |       | 1,7:1                    |        |      |
| <b>Sobrevivência (IC 95%)</b> | 0,85 (0,72 - 1,0) |        |       | 0,92 (0,84 - 1) |        |       | 0,77 (0,62 - 0,95)       |        |      |

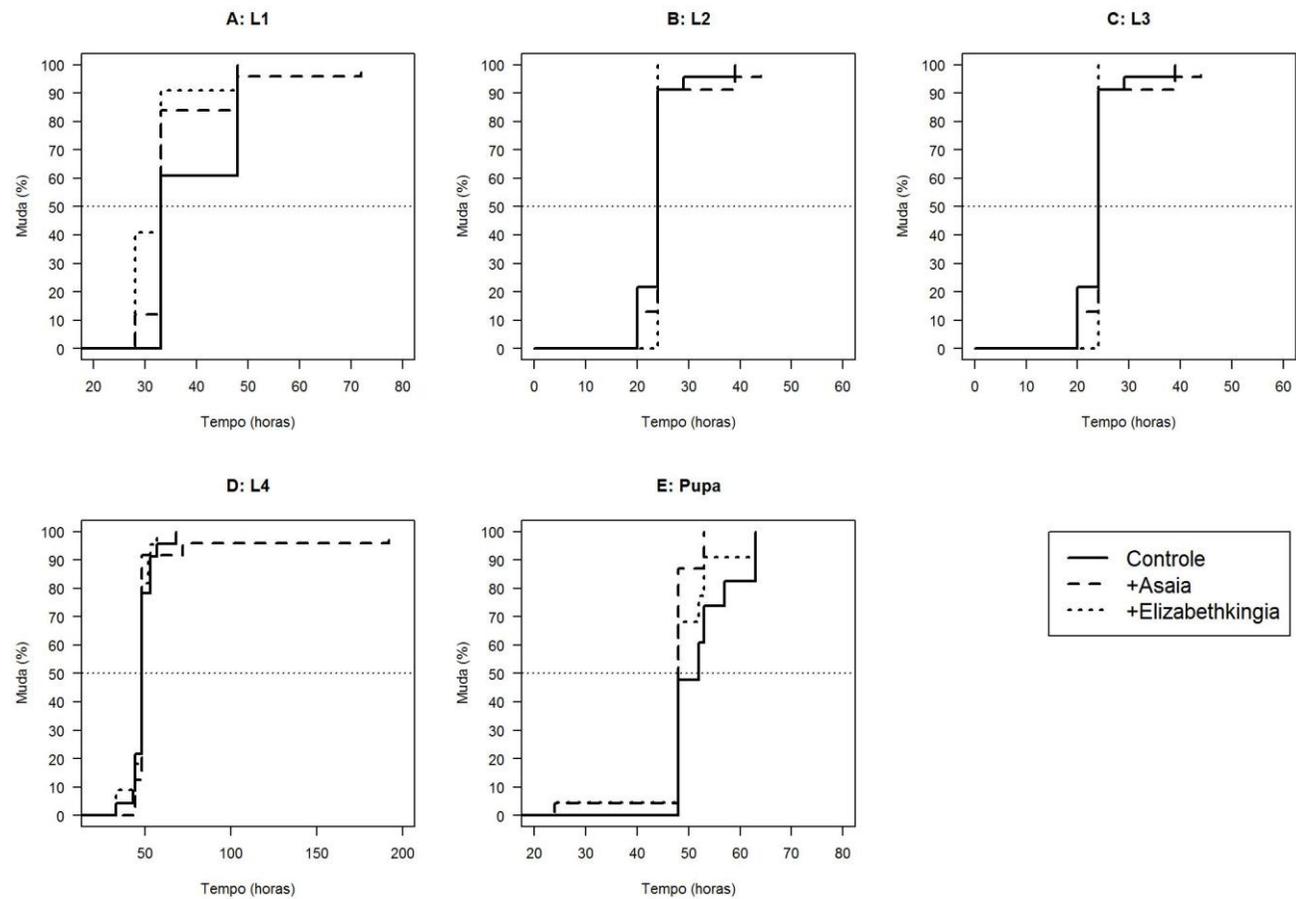


Figura 5.1. Duração dos estádios larvares (gráficos A a D) e fase de pupa (E) de formas imaturas *Ae. aegypti* expostas às bactérias dos gêneros *Asaia* (+Asaia) e *Elizabethkingia* (+Elizabethkingia) e do grupo Controle.

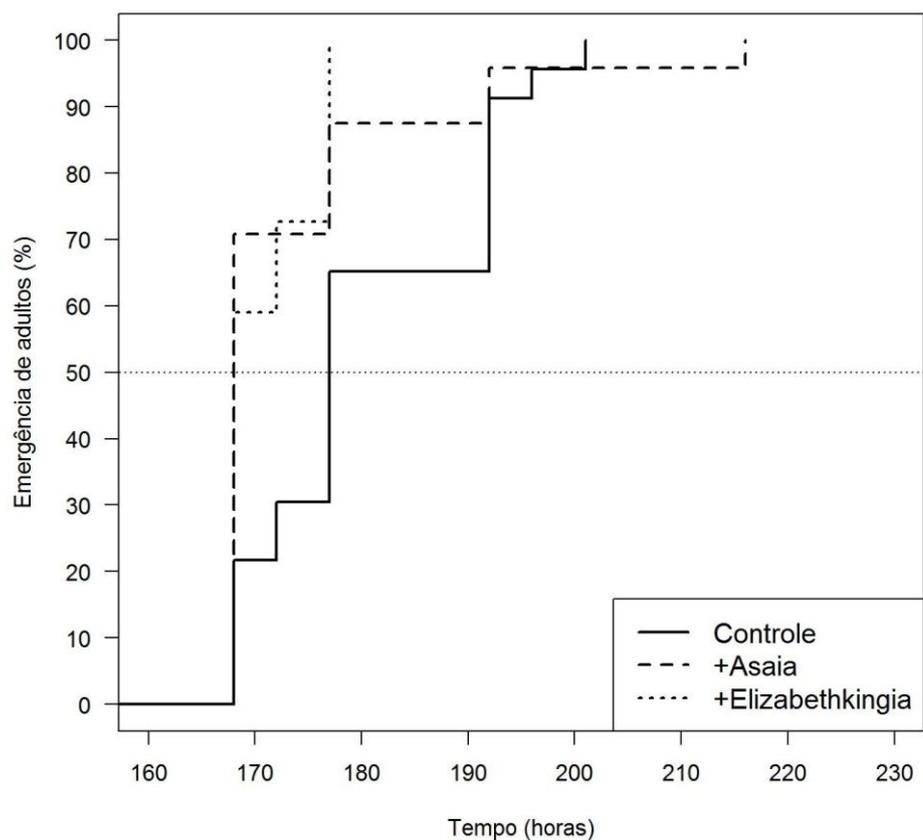


Figura 5.2. Tempo total de desenvolvimento (L1 ao adulto) de formas imaturas *Ae. aegypti* expostas às bactérias dos gêneros *Asaia* (+*Asaia*) e *Elizabethkingia* (+*Elizabethkingia*) e do grupo Controle.

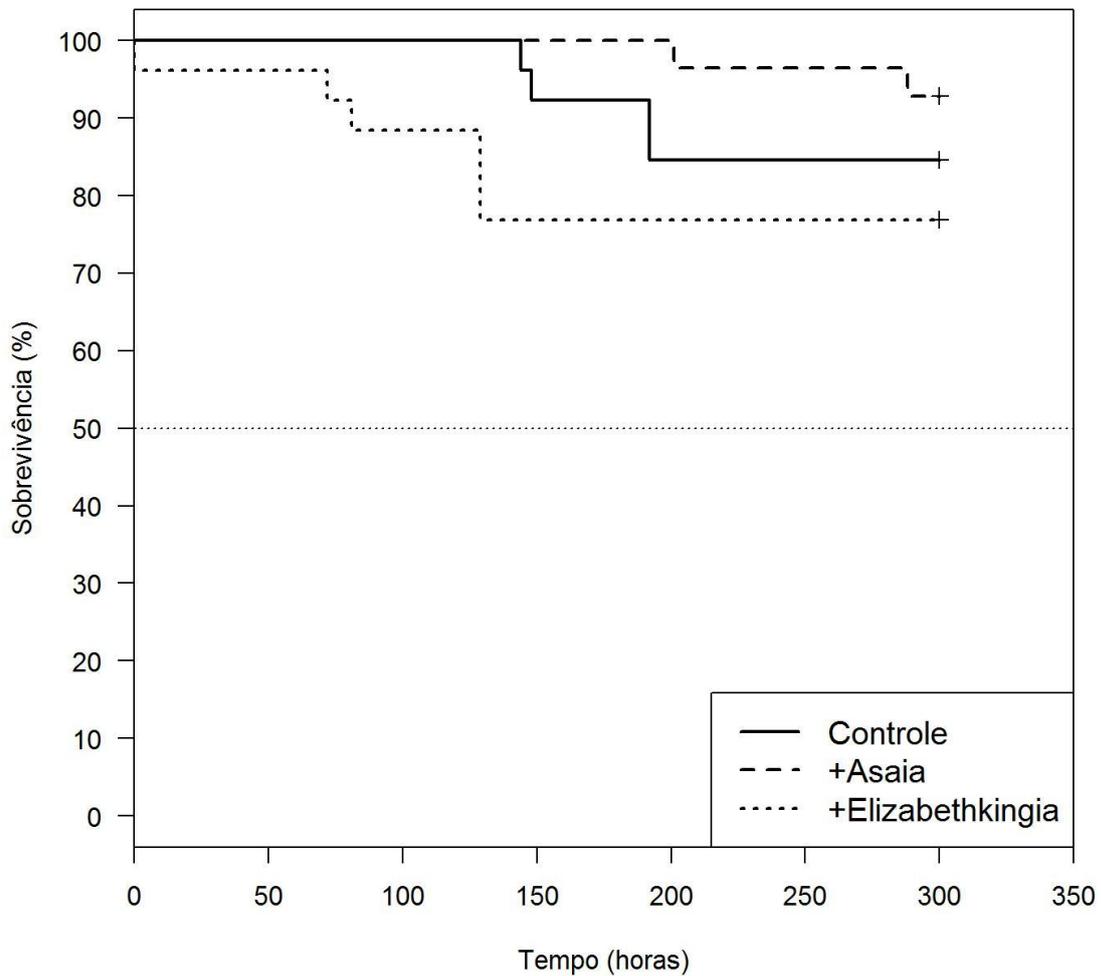


Figura 5.3. Sobrevivência de formas imaturas *Ae. aegypti* expostas às bactérias dos gêneros *Asaia* (+Asaia) e *Elizabethkingia* (+Elizabethkingia) e do grupo Controle.

Tabela 5.4. Resultados da comparação entre as durações de cada estágio larvar, do tempo total de desenvolvimento (L1 ao adulto) e da sobrevivência das larvas através do teste Log-rank.

|           |                | <b>Global</b> | <b>+Asaia vs. Controle</b> | <b>+Elizabethkingia vs. Controle</b> |
|-----------|----------------|---------------|----------------------------|--------------------------------------|
| <b>L1</b> | $\chi^2$       | 12,9          | 2,9                        | 11,8                                 |
|           | <b>p-valor</b> | < 0,01        | 0,08                       | < 0,01                               |

|                      |                |        |      |        |
|----------------------|----------------|--------|------|--------|
| <b>L2</b>            | $\chi^2$       | 0,5    | -    | -      |
|                      | <b>p-valor</b> | 0,79   | -    | -      |
| <b>L3</b>            | $\chi^2$       | 1,9    | -    | -      |
|                      | <b>p-valor</b> | 0,38   | -    | -      |
| <b>L4</b>            | $\chi^2$       | 0,9    | -    | -      |
|                      | <b>p-valor</b> | 0,65   | -    | -      |
| <b>Pupa</b>          | $\chi^2$       | 7,9    | -    | -      |
|                      | <b>p-valor</b> | 0,02   | -    | -      |
| <b>L1-Adulto</b>     | $\chi^2$       | 10     | 3,7  | 12,5   |
|                      | <b>p-valor</b> | < 0,01 | 0,05 | < 0,01 |
| <b>Sobrevivência</b> | $\chi^2$       | 3,2    | -    | -      |
|                      | <b>p-valor</b> | 0,21   | -    | -      |

**Colonização do tubo digestivo das larvas por *Asaia* e *Elizabethkingia*.** A diversidade de bactérias cultiváveis nos três grupos de larvas foi variável, sendo o gênero *Bacillus* o único ubíquo a todas as condições (Tabela 5.5). Além deste, foram isolados os gêneros *Chryseobacterium*, *Acinetobacter* e *Enterobacter* do grupo Controle. Já o grupo +*Asaia* apresentou crescimento de *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, enquanto que o grupo +*Elizabethkingia* apresentou crescimento de *Enterobacter* e *Elizabethkingia*. Cabe ressaltar que *Asaia* não foi isolada de nenhum dos grupos testados, enquanto *Elizabethkingia* foi recuperada apenas do grupo que foi exposto a esta bactéria.

Tabela 5.5. Isolamento bacteriano realizado a partir do intestino de formas imaturas *Ae. aegypti* expostas às bactérias dos gêneros *Asaia* (+Asaia) e *Elizabethkingia* (+Elizabethkingia) e do grupo Controle. A identificação taxonômica foi baseada na sequência das regiões hipervariáveis V1-V3 do gene 16S rRNA.

| Filo           | Classe              | Família            | Gênero (RDP classifier) | Fonte    |                  |        |
|----------------|---------------------|--------------------|-------------------------|----------|------------------|--------|
|                |                     |                    |                         | Controle | +Elizabethkingia | +Asaia |
| Bacteroidetes  | Flavobacteriia      | Flavobacteriaceae  | <i>Chryseobacterium</i> | X        | -                | -      |
| Bacteroidetes  | Flavobacteria       | Flavobacteriaceae  | <i>Elizabethkingia</i>  | -        | X                | -      |
| Firmicutes     | Bacilli             | Bacillaceae        | <i>Bacillus</i>         | X        | X                | X      |
| Firmicutes     | Bacilli             | Bacillaceae        | <i>Exiguobacterium</i>  | -        | X                | -      |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Moraxellaceae      | <i>Acinetobacter</i>    | X        | -                | -      |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Enterobacteriaceae | <i>Enterobacter</i>     | X        | X                | -      |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Pseudomonadaceae   | <i>Pseudomonas</i>      | -        | -                | X      |
| Proteobacteria | Gammaproteobacteria | Xanthomonadaceae   | <i>Stenotrophomonas</i> | -        |                  | X      |

#### 5.4. Discussão

A comunidade bacteriana que coloniza o intestino dos culicídeos influencia diferentes aspectos da biologia do inseto, tais como o desenvolvimento larvar (Mitraka *et al.* 2013; Coon *et al.* 2014), digestão sanguínea, fecundidade (Gaio *et al.* 2011) e imunidade (Xi *et al.* 2008). Para algumas espécies de *Anopheles*, o desenvolvimento larvar é acelerado nos indivíduos cuja microbiota alberga o gênero de bactéria *Asaia* (Mitraka *et al.* 2013). Porém, considerando *Ae. aegypti*, o impacto de bactérias específicas na biologia das formas imaturas ainda é pouco estudado. Assim, o presente estudo realizou o isolamento de bactérias da microbiota de larvas e fêmeas de *Ae. aegypti* de laboratório e coletadas no campo e avaliou a influência de *Asaia* e *Elizabethkingia* no desenvolvimento das formas imaturas.

Considerando a microbiota de *Ae. aegypti* oriundos de populações selvagens, dois trabalhos descreveram a comunidade bacteriana cultivável de mosquitos adultos coletados em Madagascar (Zouache *et al.* 2011) e no Panamá (Ramirez *et al.* 2012). Das fêmeas coletadas na ilha de Madagascar, apenas o gênero *Bacillus* foi cultivado a partir de duas populações (Zouache *et al.* 2011), enquanto que 22 gêneros bacterianos (6/22 da família Enterobacteriaceae) foram recuperados da microbiota de *Ae. aegypti* oriundos de três populações naturais do Panamá (Ramirez *et al.* 2012). Assim como o presente estudo, Zouache *et al.* (2012) e Ramirez *et al.* (2012) utilizaram o meio de cultura LBA para isolamento das bactérias. Porém, nossos resultados se aproximam mais da diversidade relatada por Ramirez e colaboradores (2012), uma vez que encontramos sete gêneros em indivíduos oriundos de uma população selvagem do Rio de Janeiro, Brasil, além de duas linhagens da família Enterobacteriaceae. Além destes, outros nove gêneros foram isolados de larvas e fêmeas adultas da população de laboratório Paea.

A identificação taxonômica, baseada nas regiões hipervariáveis V1-V3 do gene 16S rRNA, permitiu caracterizar 80 e 70% dos isolados aos níveis de família e gênero, respectivamente. Este segmento contém a região variável V2, considerada mais informativa para a identificação de diversos gêneros bacterianos (Vilo e Dong 2012). Apenas uma porção das linhagens de Enterobacteriaceae não pôde ter o gênero determinado devido ao baixo poder discriminatório do gene 16S rRNA para alguns grupos filogeneticamente próximos desta família (Spröer *et al.* 1999).

Todos os gêneros bacterianos isolados do intestino das larvas durante este estudo foram previamente detectados através de isolamento e metodologias independentes do cultivo em larvas de laboratório e de populações selvagens da Índia, Tailândia e Laos (Apte-Deshpande *et al.* 2012; Coon *et al.* 2014; Dada *et al.* 2014). Considerando as fêmeas adultas, *Asaia*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* também foram isoladas da colônia Rockefeller (Gusmão *et al.* 2010) e de populações do Panamá (Ramirez *et al.* 2012). Já *Gluconobacter* e *Providencia* foram identificadas em *Ae. aegypti* do Quênia através do pirosequenciamento do gene 16S rRNA presente no DNA total do intestino (Osei-Poku *et al.* 2012).

A prevalência destes grupos de bactérias em diferentes populações de *Ae. aegypti* sugere que são bem adaptados ao ambiente intestinal deste mosquito, o que tornaria interessante a sua aplicação em estratégias de redução da susceptibilidade do vetor a arbovírus, através, por exemplo, da paratransgênese. Por exemplo, o gênero *Asaia* é considerado um potencial candidato para o desenvolvimento de estratégias de redução da transmissão de patógenos, pois, além de colonizar o intestino, foi detectada nos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas de diferentes espécies de culicídeos (Crotti *et al.* 2009), podendo ser transmitida verticalmente (Favia *et al.* 2007). Além disso, outros gêneros detectados neste estudo, como *Paenibacillus*, *Erwinia*, *Enterobacter* e

*Pseudomonas*, foram capazes de reduzir naturalmente a infecção por DENV em *Ae. aegypti* (Ramirez *et al.* 2012) ou a viabilidade do vírus La Crosse *in vitro* (Joyce *et al.* 2011).

O gênero *Pseudomonas* foi o único compartilhado pela microbiota de larvas e fêmeas adultas, o que sugere a sua transmissão interestágios de vida. Um estudo mostrou recentemente que este gênero pode ser transmitido de larvas para pupas e posteriormente para os adultos de *An. stephensi* (Chavshin *et al.* 2015). Outra possibilidade é a aquisição de *Pseudomonas* a partir da água do criadouro após a emergência dos adultos (Lindh *et al.* 2008). Entretanto, ainda é preciso investigar se os diferentes estágios de vida de *Ae. aegypti* possuem de fato a mesma espécie de *Pseudomonas*, o que não é possível afirmar apenas a partir da sequência do gene 16S rRNA.

Apesar da presença dos gêneros *Erwinia*, *Herbaspirillum* e *Hydrogenophilus* ainda não ter sido documentada na microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, os dois primeiros já foram encontrados em associação com *Ae. albopictus* (Zouache *et al.* 2011), *An. gambiae* (Dong *et al.* 2009) e *An. stephensi* (Rani *et al.* 2009), por exemplo. Tais resultados sugerem que estas bactérias são capazes de colonizar espécies ecologicamente distintas de mosquitos.

Muitos estudos focam na microbiota de mosquitos adultos, devido ao seu papel na transmissão de patógenos (Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009; Cirimotich *et al.* 2011b; Joyce *et al.* 2011; Ramirez *et al.* 2012, 2014). Entretanto, a diversidade e a influência da comunidade intestinal na biologia das formas imaturas também são relevantes; em especial, alguns gêneros têm se mostrado capazes de serem transmitidos de maneira interestágial. Além disso, algumas bactérias podem ser depositadas no criadouro no momento da oviposição (Lindh *et al.* 2008; Coon *et al.* 2014). Dada a associação

essencial das larvas dos culicídeos com bactérias (Coon *et al.* 2014), a comunidade microbiana presente no intestino pode representar um potencial alvo de estratégias de controle vetorial, através, por exemplo, do uso de microorganismos entomopatogênicos, como já é feito com o *Bacillus thuringiensis* (Ruiu *et al.* 2015).

Desta maneira, foi avaliada a influência de bactérias dos gêneros *Asaia* e *Elizabethkingia* no desenvolvimento larvar, sobrevivência e tamanho do adulto de *Ae. aegypti*. Em *Anopheles*, a colonização do tubo digestivo por *Asaia* resulta em uma redução significativa no tempo de desenvolvimento larvar (Chouaia *et al.* 2012; Mitraka *et al.* 2013). Entretanto, em *Ae. aegypti*, não observamos qualquer efeito. Por outro lado, a exposição das larvas a *Elizabethkingia* provocou uma redução significativa da duração do estágio L1 e do tempo total de desenvolvimento (L1 ao adulto). Além disso, esta bactéria colonizou o tubo digestivo das larvas, o que não foi observado para *Asaia*.

O tempo de desenvolvimento dos imaturos pode afetar diretamente a adaptabilidade evolutiva dos indivíduos e o potencial de crescimento de uma população de insetos, uma vez que este parâmetro determina o momento no qual o animal atinge a maturidade sexual, influenciando o tempo de geração da população (Stearns e Koella 1986). Além disso, larvas de *Ae. aegypti* encontram-se geralmente confinadas a um recipiente artificial com água, onde estão expostas à predação, produtos químicos e ao risco de secagem e transbordamento do criadouro, por exemplo. Desta maneira, a presença de *Elizabethkingia* no água de criação e/ou no intestino levaria a uma redução do tempo de desenvolvimento larvar, aumentando as chances de o mosquito atingir a fase adulta.

A duração dos estágios imaturos dos mosquitos é um caractere plástico, podendo ser influenciado por diferentes fatores extrínsecos, tais como a temperatura e a disponibilidade de nutrientes (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994). Apesar de

reduções do tempo de desenvolvimento larvar estarem comumente associadas a condições ambientais favoráveis, como alimento em abundância, isto também pode ocorrer em situações de estresse. Por exemplo, o desenvolvimento de *Ae. aegypti* em temperaturas elevadas (35°C) é significativamente mais rápido do que em condições ótimas (20 a 30°C), porém resulta em maior mortalidade das larvas e em adultos menores (Tun-Lin *et al.* 2000). Fêmeas de culicídeos com menor tamanho corporal possuem menor sobrevivência, fecundidade e tolerância ao jejum (Nasci 1986; Briegel 1990; Kirby e Lindsay 2009; van Uitregt *et al.* 2011).

Uma vez que o tamanho corporal dos adultos resultantes das larvas expostas a *Elizabethkingia* não foi significativamente diferente do grupo Controle, a redução no tempo de desenvolvimento larvar não parece ser resultado de uma situação de estresse. Desta maneira, é possível que a presença de *Elizabethkingia* na água e/ou no intestino das larvas tenha auxiliado a digestão, fornecido nutrientes ou substâncias que estimularam o desenvolvimento larvar e/ou representado uma fonte adicional de alimento (Mitraka *et al.* 2013; Coon *et al.* 2014). Independentemente do mecanismo, a associação de *Ae. aegypti* com *Elizabethkingia* parece representar um incremento na adaptabilidade dos mosquitos e seria favorável do ponto de vista evolutivo.

Curiosamente, diferentes gêneros bacterianos foram isolados dos três grupos de larvas monitorados, apesar da utilização do mesmo alimento e água para criação. É possível que a adição de *Asaia* e *Elizabethkingia* no criadouro tenha interferido com a diversidade bacteriana presente da água e/ou no tubo digestivo, uma vez que as bactérias de uma comunidade interagem em uma rede complexa de relações antagonistas e mutualistas. Uma determinada espécie bacteriana pode provocar alterações no microclima, como mudanças no pH, tensão de oxigênio e potencial de redução-oxidação e/ou produzir e secretar compostos metabólicos, os quais facilitam ou

impedem o crescimento de outros microrganismos (Fons *et al.* 2000). Uma das linhagens de *Asaia* recuperada neste estudo se mostrou capaz de reduzir o pH de diferentes meios líquidos de cultura e uma linhagem de *Elizabethkingia* isolada a partir de *An. stephensi* produz compostos com ação antimicrobiana, antifúngica e antiparasítica (Ngwa *et al.* 2013). Além disso, considerando o primeiro isolamento bacteriano realizado nas larvas da população Paea (Tabela 5.2), apenas os gêneros *Bacillus* e *Chryseobacterium* foram detectados novamente a partir do grupo Controle (Tabela 5.5). Tais variações reforçam a ideia de que pelo menos parte da microbiota das larvas é adquirida do ambiente (Kim *et al.* 2015).

Assim, este estudo isolou e identificou um repertório de bactérias cultiváveis da microbiota intestinal de *Ae. aegypti*. Alguns dos gêneros encontrados já demonstraram o potencial em interferir na infecção por arbovírus, o que faz desta coleção uma possível fonte de microrganismos com ação antiviral. Além disso, nós demonstramos pela primeira vez que uma linhagem bacteriana específica é capaz de influenciar o tempo de desenvolvimento larvar de *Ae. aegypti*. Em um cenário amplo, este estudo contribui para o entendimento da diversidade e das relações ecológicas e evolutivas envolvendo *Ae. aegypti* e a microbiota bacteriana intestinal.

## **6. CAPÍTULO III - Aspectos quantitativos da interação tripartite envolvendo *Ae. aegypti*, a microbiota intestinal e o vírus chikungunya**

### **6.1. Justificativa**

A microbiota intestinal dos insetos influencia diversos aspectos da biologia do hospedeiro, inclusive a infecção por patógenos, fenômeno conhecido como resistência à colonização (van der Waaij *et al.* 1971; Buffie e Pamer 2013). Em *Ae. aegypti*, o tratamento com antibióticos provoca perda desta microbiota, resultando no aumento da suscetibilidade ao DENV (Xi *et al.* 2008). Entretanto, as bactérias da microbiota podem modular os níveis de infecção por arbovírus, uma vez que a reintrodução de bactérias específicas no intestino é capaz de significativamente reduzir (Ramirez *et al.* 2012, 2014) ou elevar (Mourya *et al.* 2002; Apte-Deshpande *et al.* 2012, 2014) a infectividade dos mosquitos.

Tal cenário demonstra que o lúmen intestinal é um local de interações recíprocas complexas, envolvendo o vetor, a microbiota e potenciais patógenos (Azambuja *et al.* 2005; Cirimotich *et al.* 2011a). Especula-se que a comunidade bacteriana presente no intestino deflagra uma resposta imune por parte do inseto, cujo resultado é a produção de moléculas, como peptídeos antimicrobianos, os quais afetam todos os organismos ali presentes (Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009). Além disso, bactérias presentes no intestino podem interferir diretamente no desenvolvimento dos patógenos através da produção de toxinas, competição por recursos, bloqueio físico de sítios de interação, dentre outros mecanismos (Cirimotich *et al.* 2011a,b).

Estudos recentes também apontam que a infecção por patógenos é capaz de alterar a diversidade e a abundância de bactérias no intestino dos mosquitos vetores. A infecção de fêmeas de *Ae. albopictus* por CHIKV foi associada ao aumento relativo da

família Enterobacteriaceae e redução da classe Alphaproteobacteria e dos filos Bacteroidetes e Planctomycetes (Zouache *et al.* 2012). Em *Cx. pipiens* infectados por WNV observou-se maior diversidade de microbiota, considerando os índices de Shannon e Simpson (Zink *et al.* 2015). O impacto de infecções virais na diversidade da comunidade intestinal de *Ae. aegypti* ainda não foi avaliado, mas mosquitos infectados por DENV mostraram uma redução na quantidade total de bactérias presentes no lúmen do tubo digestivo, medida por meio da quantificação do gene 16S rRNA (Ramirez *et al.* 2012).

Recentemente, o CHIKV foi introduzido no continente Americano (Leparc-Goffart *et al.* 2014) e vem causando epidemias em diversos países, inclusive no Brasil (Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2016). Populações de *Ae. aegypti* coletadas nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste do país são altamente susceptíveis à infecção por CHIKV em laboratório, com 87 a 100% dos mosquitos com infecção disseminada para a cabeça após 7 dias (Vega-Rúa *et al.* 2014). Dentre os fatores que possivelmente determinam o sucesso desta infecção está a interação tripartite envolvendo o mosquito vetor, o arbovírus e a microbiota intestinal. Desta maneira, este estudo busca investigar aspectos da interação de CHIKV e da microbiota intestinal de *Ae. aegypti*.

## 6.2. Metodologia

**Mosquitos.** Foram utilizadas fêmeas de *Ae. aegypti* (geração F1) coletadas no bairro da Urca, Rio de Janeiro, Brasil, com o auxílio de ovitrampas. As larvas foram alimentadas com ração comercial para peixe (Tetramin®). Os adultos foram alimentados *ad libitum* com uma solução 10% de sacarose. Machos e fêmeas foram mantidos na mesma gaiola no laboratório ( $25 \pm 5^\circ\text{C}$  e  $60 \pm 8\%$  UR).

**Cepa viral de CHIKV e infecção oral dos mosquitos.** A cepa de CHIKV utilizada no estudo pertence ao genótipo ECSA e foi isolada de um paciente em Feira de Santana, Bahia, Brasil (Teixeira *et al.* 2015). O vírus foi propagado em células C6/36 de *Ae. albopictus*. O título viral de infecção, estimado através de diluições seriadas em células Vero, foi de  $10^8$  PFU/ml.

Fêmeas de *Ae. aegypti* de 5 a 7 dias de vida receberam uma alimentação infectante consistindo de sobrenadante de culturas de células C6/36 contendo o CHIKV e eritrócitos de coelho lavados em PBS na proporção de 1:2 ml. Além disso, foi adicionado ATP como fagoestimulante na concentração final de 5 mM. A mistura foi oferecida através de um alimentador artificial. O grupo controle (CTL) recebeu uma alíquota contendo os mesmos lotes de sangue, ATP e meio de cultura livre de vírus (M199 10%; soro fetal bovino 10%; Hepes 2,5%; NaHCO<sub>3</sub> 3% e L-glutamina 1%). Após o término da alimentação (40-60 minutos), as fêmeas que não estavam totalmente ingurgitadas foram descartadas. Aquelas ingurgitadas foram transferidas para gaiolas cilíndricas onde receberam uma solução açucarada 10% esterilizada *ad libitum*.

**Dissecção do intestino médio.** Os mosquitos anestesiados tiveram a superfície externa esterilizada em etanol 70% por um minuto e foram lavados em PBS. Logo após o

processo de esterilização, os insetos foram mergulhados em PBS estéril do qual uma alíquota foi plaqueada em meio LBA e mantida em temperatura ambiente por 7 dias. O intestino médio foi removido em uma lâmina estéril, macerado em 200µl de PBS e armazenado individualmente a -70°C. A cabeça foi preservada para avaliação da disseminação viral.

**Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativa.** O RNA total dos intestinos e das cabeças foi extraído utilizando TRIZOL (Invitrogen, St. Louis, MO, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi tratado com DNase I (Fermentas, Waltham, MA, USA) e a primeira fita de cDNA foi sintetizada com o kit High-Capacity cDNA Reverse transcription (Applied Biosystems, St. Louis, MO, USA). Cada reação (15 µl de volume final) foi composta do cDNA, Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, St. Louis, MO) e iniciadores 5´ e 3´ na concentração de 300 mM. A PCR quantitativa foi realizada no sistema StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, St. Louis, MO, USA) nas condições 95°C/20 seg, seguido de 40 ciclos de 95°C/1 seg e 60°C/20 seg. A verificação da amplificação de um único produto ocorreu através da curva de dissociação. O gene da proteína ribossomal S7RP de *Ae. aegypti* foi utilizado como controle endógeno. A quantificação relativa dos genes 16S rRNA bacteriano e E1 de CHIKV foi feita através do método de  $\Delta C_t$ , a partir da quantificação de S7RP. Os iniciadores utilizados estão listados na tabela 6.1.

Tabela 6.1. Sequências nucleotídicas dos iniciadores utilizados neste estudo.

| Gene                | Iniciador 5´        | Iniciador 3´               | Referência                  |
|---------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 16S rRNA bacteriano | TCCTACGGGAGGCAGCAGT | GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT | Nadkarni <i>et al.</i> 2002 |

|                            |                     |                      |                           |
|----------------------------|---------------------|----------------------|---------------------------|
| Glicoproteína E1 de CHIKV  | TACCCATTCATGTGGGGC  | GCCTTTGTACACCACGATT  | Hasebe <i>et al.</i> 2002 |
| S7RP de <i>Ae. aegypti</i> | ACCGCCGTCTACGATGCCA | ATGGTGGTCTGCTGGTTCTT | Bai <i>et al.</i> 2007    |

**Análise de infecção e carga bacteriana intestinal.** Para avaliação da relação quantitativa entre a microbiota e a infecção por CHIKV, os intestinos médios das fêmeas foram processados e separados nos seguintes grupos: (a) 24 h pré-infecção (Pré-INF), (b) 24 horas pós-alimentação sanguínea infectante (INF-24 h), (c) 24 pós-alimentação sanguínea não infectante (CTL-24h), (d) 7 dias pós-alimentação sanguínea infectante (INF-7d) e (e) 7 dias pós-alimentação sanguínea não infectante (CTL-7d). Em cada grupo, 20 fêmeas foram individualmente processadas para determinar as cargas bacteriana e viral. A taxa de infecção intestinal de CHIKV (TII) se refere ao percentual de mosquitos com detecção de CHIKV no intestino dentre aqueles que receberam a alimentação infectante. A taxa de disseminação da infecção (TDI) se refere à proporção de mosquitos do grupo INF-7d com detecção positiva de CHIKV na cabeça.

**Análise estatística.** As cargas bacteriana ou viral foram comparadas entre os diferentes grupos através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, uma vez que os dados não apresentam distribuição normal (teste Shapiro-Wilk, p-valor < 0,05). Em caso de significância os grupos foram comparados de forma pareada através do teste de Dunn. A correlação entre as cargas bacteriana e viral foi avaliada através da correlação de Pearson (Edgell e Noon 1984). No caso da correlação significativa, foi ajustada uma regressão linear simples com o objetivo de representar graficamente a relação entre estas variáveis.

### 6.3. Resultados

**Infecção por CHIKV.** As fêmeas de *Ae. aegypti* apresentaram uma carga viral mediana e amplitude interquartis (Q1-Q3) de CHIKV de 0,68 (0,21-2,68) e 10,25 (6,3-24,7) cópias E1-CHIKV/S7RP no intestino 24 h e 7 dias após a infecção, respectivamente (Tabela 6.2, Figura 6.1). O aumento da carga viral ao longo do tempo foi considerado estatisticamente significativo ( $z = -4.10$ ;  $p$ -valor  $< 0,01$ ). Na cabeça, a carga viral observada foi de  $45,1 \pm 50,5$ . A TII foi de 77,8 e 95% 24 h e 7 dias após a infecção. A disseminação da infecção por CHIKV foi confirmada em todos os mosquitos do grupo INF-7d cuja cabeça foi processada para detecção viral (Tabela 6.2, Figura 6.1).

Tabela 6.2. Carga viral (Cópias E1 CHIKV/ Cópias S7RP) (média  $\pm$  desvio padrão), taxa de infecção intestinal (TII) e taxa de disseminação da infecção (TDI) por CHIKV em fêmeas de *Ae. aegypti* 24 h (INF-24) e 7 dias (INF-7d) após o repasto sanguíneo infectante.

| Grupo   | Carga viral CHIKV<br>(cópias E1-<br>CHIKV/S7RP) | TII            | TDI          |
|---------|---|----------------|--------------|
| INF-24h | 1,40 $\pm$ 1,48                                 | 14/18 (77,78%) | -            |
| INF-7d  | 30,79 $\pm$ 48,72                               | 19/20 (95%)    | 19/19 (100%) |

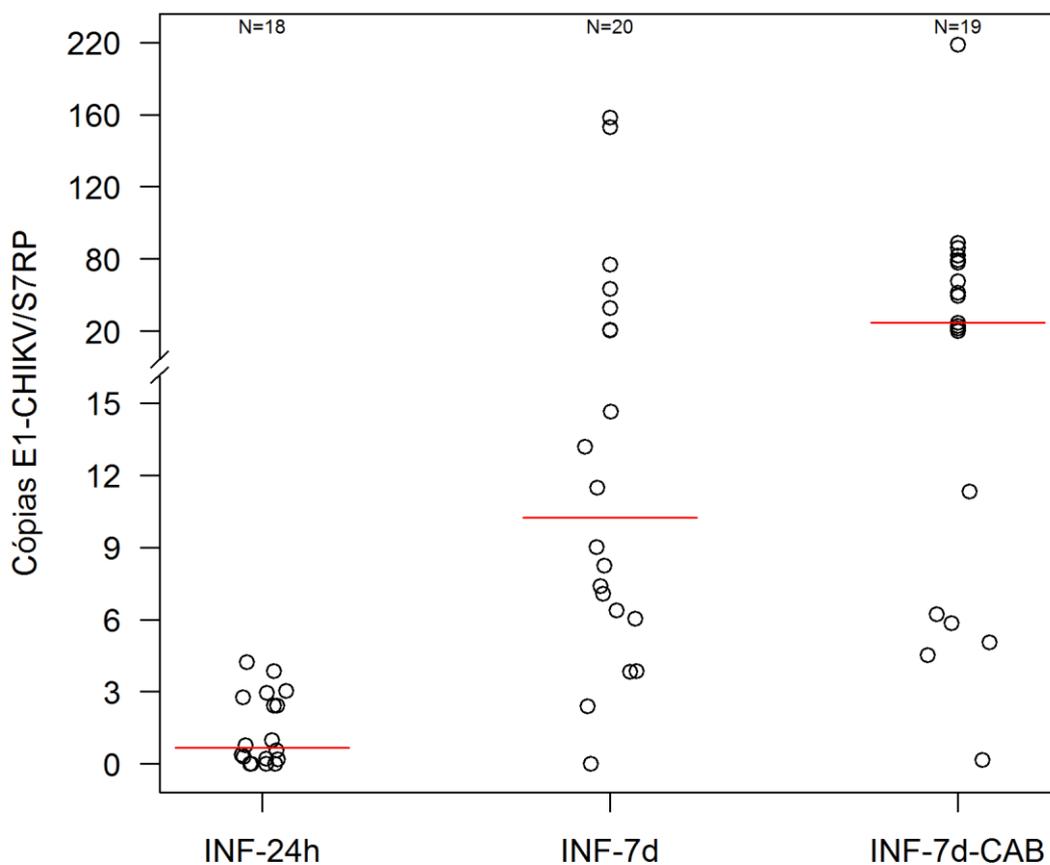


Figura 6.1. Carga viral de CHIKV observada no intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti* 24 h (INF-24h) e 7 dias (INF-7d) pós-infecção. A detecção viral também foi realizada na cabeça das fêmeas do grupo INF-7d para determinação da taxa de disseminação da infecção (TDI). A linha vermelha indica a mediana dos valores de carga viral.

**Comunidade bacteriana total presente no intestino e a infecção por CHIKV.** A carga bacteriana média relativa ao gene endógeno de *Ae. aegypti* S7RP foi de  $0,05 \pm 0,01$  pré-infecção,  $48,51 \pm 56,37$  24 h após o repasto sanguíneo não infectante e  $2,38 \pm 3,62$  após sete dias após a ingestão do sangue. Considerando as fêmeas infectadas, a

carga bacteriana média foi de  $1,14 \pm 2,23$  e  $2,94 \pm 7,10$  cópias 16S rRNA/S7RP 24h e sete dias pós-infecção por CHIKV (Figura 6.2).

A carga bacteriana presente no intestino médio das fêmeas controle (CTL) aumentou significativamente 24h após a ingestão de sangue (Pré-INF vs. CTL-24h:  $z = -4,43$ ;  $p$ -valor  $< 0,01$ ) e já havia diminuído novamente após 7 dias (CTL-24h vs. CTL-7d:  $z = 3,15$ ;  $p$ -valor  $< 0,01$ ), mostrando um nível similar àquele dos mosquitos pré-infecção (Pré-INF vs. CTL-7d:  $z = -1,96$ ;  $p$ -valor =  $0,25$ ). Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado nas fêmeas infectadas por CHIKV, uma vez que a carga bacteriana 24h após a infecção não aumentou em relação aos mosquitos pré-infecção (Pré-INF vs. INF-24h:  $z = -0,94$ ;  $p$ -valor =  $1$ ), se apresentando significativamente menor do que aquela dos insetos controle no mesmo tempo (INF-24h vs. CTL-24h:  $z = 4,26$ ;  $p$ -valor  $< 0,01$ ). Após 7 dias, não houve diferenças significativas na carga bacteriana entre o grupo infectado por CHIKV e controle (INF-7d vs. CTL-7d:  $z = -0,35$ ;  $p$ -valor =  $1$ ) (Figura 6.2).

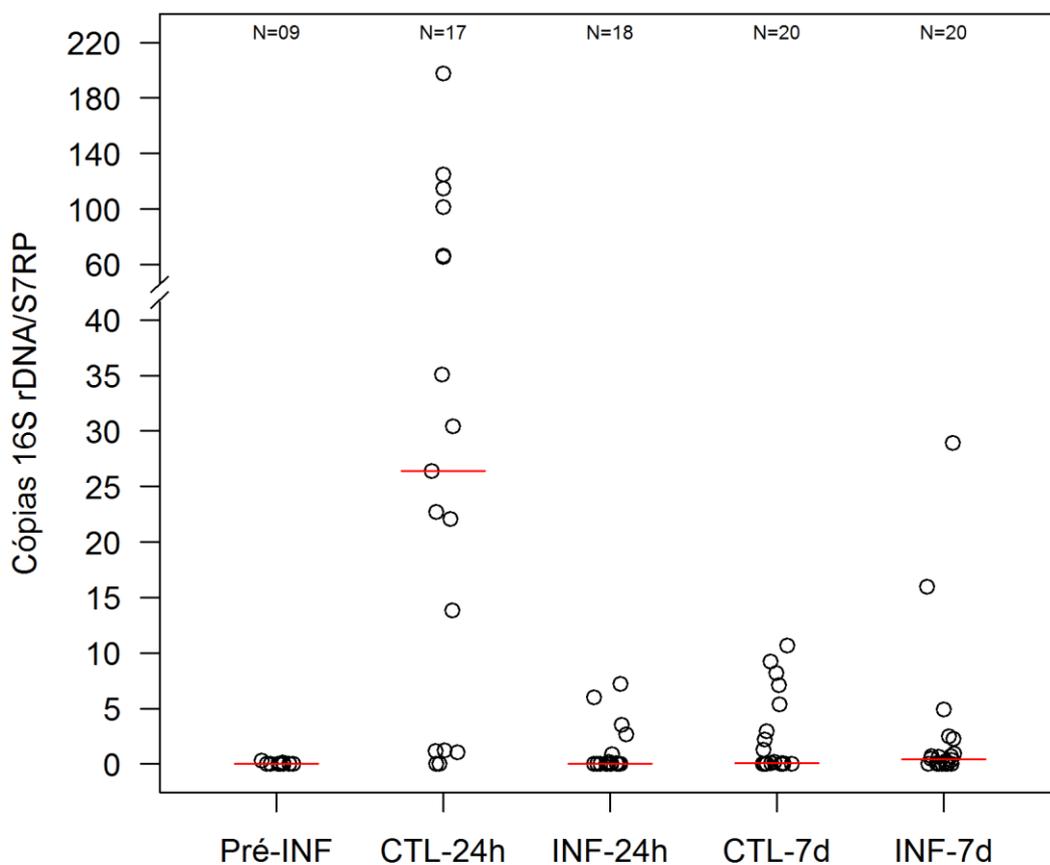


Figura 6.2. Carga bacteriana presente no intestino médio de fêmeas de *Ae. aegypti*. Pré-INF, fêmeas alimentadas com açúcar pré-infecção; CTL, insetos-controle alimentados com sangue não infectado; INF, fêmeas infectadas com CHIKV. CTL e INF foram avaliados 24 h e 7 dias (7 d) pós-infecção. A linha vermelha indica a mediana dos valores de carga bacteriana.

A Figura 6.3 ilustra a associação linear entre as cargas bacteriana e viral no intestino 24 horas pós-infecção (INF-24h) e no intestino e na cabeça 7 dias pós-infecção (INF-7d- e INF-7d CAB, respectivamente). Foi observada uma correlação positiva significativa entre as quantidades relativas de CHIKV e bactérias nos intestinos

coletados 24h após a ingestão do sangue infectado (INF-24h:  $r = 0,59$ ; p-valor  $< 0,01$ ). Por outro lado, a carga viral bacteriana do intestino não mostrou qualquer relação com as cargas virais observadas no intestino e na cabeça 7 dias pós-infecção (INF-7d:  $r = 0,43$ ; p-valor =  $0,05$ ; INF-7d-CAB:  $r = -0,04$ ; p-valor =  $0,85$ ).

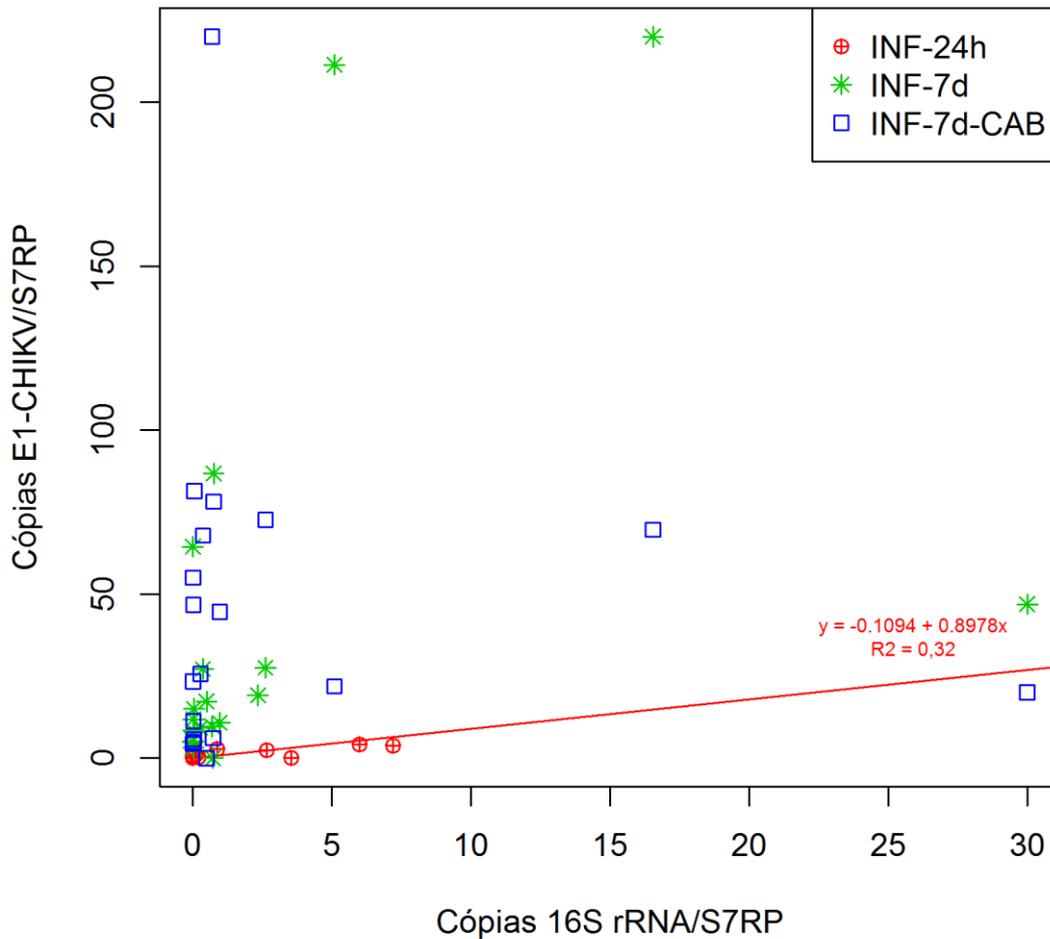


Figura 6.3. Correlação entre a carga bacteriana da microbiota intestinal (16S rRNA) e a carga viral encontrada no intestino (INF-24h e INF-7d) e na cabeça (INF-7d-CAB) de *Ae. aegypti* infectados por CHIKV. Uma correlação positiva significativa foi encontrada para INF-24h (Correlação de Pearson:  $r = 0,59$ ; p-valor  $< 0.01$ ). Os pontos representam

mosquitos individuais e a reta representa o melhor ajuste de uma regressão linear simples referente à INF-24h.

#### 6.4. Discussão

A microbiota intestinal dos mosquitos pode desempenhar papéis relevantes na fisiologia, adaptação e evolução dos seus hospedeiros, impactando significativamente, por exemplo, o desenvolvimento, a nutrição, a fecundidade (Minard *et al.* 2013a) e o curso da infecção por patógenos (Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009; Ramirez *et al.* 2012, 2014). Estudos recentes vêm mostrando que o lúmen intestinal é um sítio de interações recíprocas tripartites envolvendo vetor, microbiota e patógenos (Azambuja *et al.* 2005; Cirimotich *et al.* 2011a), onde a comunidade intestinal e os organismos invasores, incluindo arbovírus, podem afetar-se mutuamente (Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009; Ramirez *et al.* 2012, 2014).

As populações brasileiras de *Ae. aegypti* são altamente susceptíveis ao CHIKV (Vega-Rúa *et al.* 2014). Visto que a microbiota é um determinante importante da capacidade vetorial dos mosquitos (Hedge *et al.* 2015), o presente estudo se propõe a avaliar aspectos quantitativos da interação entre CHIKV e a comunidade microbiana intestinal de *Ae. aegypti*. Assim, nossas análises mostram que fêmeas infectadas por CHIKV apresentam uma redução acentuada na carga bacteriana intestinal quando comparadas a fêmeas não infectadas.

As fêmeas do grupo controle (não infectadas) mostraram um aumento de aproximadamente 970 vezes na carga bacteriana total presente no intestino 24h após ingestão de sangue. Este resultado está de acordo com estudos anteriores (Gusmão *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2011; Terenius *et al.* 2012), que associaram esta intensa proliferação bacteriana à maior disponibilidade de nutrientes (Gusmão *et al.* 2010) e à redução de ROS no lúmen intestinal (Oliveira *et al.* 2011).

A geração de ROS no epitélio intestinal é apontada como um dos mecanismos responsáveis pelo controle do crescimento bacteriano no intestino de *Ae. aegypti*. A queda brusca dos níveis de ROS durante a digestão do sangue reduziria o estresse oxidativo causado pela liberação do grupamento heme da hemoglobina (Oliveira *et al.* 2011). A carga bacteriana observada sete dias após a ingestão sangue, ou seja, depois do término da digestão sanguínea, foi similar àquela das fêmeas pré-infecção alimentadas apenas com açúcar.

Entretanto, diferentemente do grupo controle, a carga bacteriana intestinal não aumentou nas fêmeas de *Ae. aegypti* que ingeriram sangue contendo CHIKV. As causas deste efeito ainda não estão esclarecidas, porém Ramirez e colaboradores (2012) registraram um comportamento similar em *Ae. aegypti* infectado por DENV, o qual foi atribuído ao aumento da expressão de peptídeos antimicrobianos, como defensina, cecropina e lisozimas, nos mosquitos infectados (Xi *et al.* 2008). Apesar do RNA de interferência (RNAi) ser apontado como o mecanismo antiviral clássico nos mosquitos (Blair 2011), a infecção por DENV também ativa as vias Toll e JAK-STAT em *Ae. aegypti* (Xi *et al.* 2008; Souza-Neto *et al.* 2009), envolvidas no controle da proliferação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente (Tsakas e Marmaras 2010).

Assim, é possível supor que ativação de vias imunológicas pela infecção por CHIKV tenha reduzido a carga bacteriana intestinal através do aumento da expressão de peptídeos antimicrobianos, em uma resposta similar à infecção por DENV. Porém, apesar do pouco conhecimento sobre a resposta imune de *Ae. aegypti* a CHIKV, um estudo demonstrou em cultura de células que este vírus é capaz de suprimir a via de Toll. Além disso, o estímulo às vias de Toll, IMD e JAK-STAT com bactérias inativadas não induziu uma maior resposta antiviral (McFarlane *et al.* 2014). Assim, os

mosquitos podem apresentar diferentes respostas a arbovírus, o que deve se refletir nas interações tripartites envolvendo vetor, vírus e microbiota.

Contrastando os resultados obtidos para *Ae. aegypti* e DENV (Ramirez *et al.* 2012), Zouache e colaboradores (2012) não observaram diferenças significativas na abundância de bactérias intestinais ao comparar fêmeas de *Ae. albopictus* infectadas e não infectadas por uma linhagem de CHIKV com a mutação E1-226V. O mesmo ocorreu em *Cx. pipiens* infectados pelo WNV, que, apesar da maior expressão de marcadores das vias imunológicas Toll, JAK-STAT e IMD, não apresentaram alteração na abundância de microrganismos no intestino em relação a fêmeas não infectadas (Zink *et al.* 2015).

Além da diferença significativa na quantidade de bactérias presentes no intestino de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas ou não por CHIKV, nossos resultados também mostram uma correlação fraca, positiva e significativa ( $R^2 = 0,32$ ) entre as cargas bacteriana e viral no intestino 24h após o repasto sanguíneo infectante. Desta maneira, mesmo que o grupo INF-24h não tenha apresentado um aumento significativo na abundância de bactérias em relação ao grupo Pré-INF, algumas fêmeas apresentaram valores ligeiramente maiores de cópias do gene 16S rRNA (2,6 a 7,2) (Figura 6.1) correlacionados a uma maior quantidade de cópias virais no intestino (Figura 6.3).

Esta análise sugere que interações microbiota, vírus e/ou vetor têm o potencial de influenciar os níveis de infecção por CHIKV no intestino *Ae. aegypti*, mas nossos experimentos atuais não permitem traçar qualquer associação de causa e efeito entre as abundâncias bacteriana e viral. Desta maneira, não é possível afirmar se uma maior carga bacteriana aumenta a intensidade da infecção por CHIKV ou se a primeira é uma consequência da segunda. Além disso, fatores genéticos dos mosquitos, associados à

imunidade, por exemplo, podem estar modulando tanto a permissividade à colonização por bactérias quanto a competência vetorial (Black *et al.* 2002).

Apesar do número de cópias do gene 16S rRNA ser comumente associado diretamente à abundância de bactérias, não se pode deixar de considerar que o número de cópias deste gene é variável entre as espécies bacterianas (Vetrovsky e Baldrian 2013). Deste modo, ligeiras variações na quantidade de cópias do gene 16S rRNA podem resultar de diferenças na composição da microbiota. A infecção por arbovírus já foi associada a alterações na diversidade da comunidade microbiana de *Ae. albopictus* (Zouache *et al.* 2012) e de *Cx. pipiens* (Zink *et al.* 2015). Diante deste cenário, o próximo passo deste estudo será investigar a diversidade da microbiota intestinal de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas ou não por CHIKV, buscando também associar os níveis de infecção viral à composição de taxa bacterianas presentes no interior do tubo digestivo.

## 7. DISCUSSÃO GERAL

A microbiota intestinal dos insetos pode influenciar diferentes aspectos da fisiologia do hospedeiro, tais como o desenvolvimento das formas imaturas, sobrevivência, fecundidade, nutrição, digestão, metabolização de compostos tóxicos e a imunidade (Dillon e Dillon 2004). No caso dos insetos vetores, destaca-se o papel da comunidade microbiana intestinal na redução da infecção por patógenos transmitidos aos vertebrados através do repasto sanguíneo, fenômeno conhecido como resistência à colonização (Azambuja *et al.* 2005). A demonstração de que a microbiota é um importante determinante da competência vetorial de mosquitos a arbovírus (Xi *et al.* 2008) ressaltou a importância do estudo das interações ecológicas envolvendo estes vetores e os microrganismos presentes no lúmen intestinal.

As arboviroses figuram atualmente entre os principais problemas mundiais de saúde pública. Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção por DENV, com 390 milhões de casos estimados por ano (Bhatt *et al.* 2013). Adicionalmente, ocorreu recentemente a emergência de outros arbovírus, como CHIKV e ZIKV (Weaver 2013). Apesar dos avanços no desenvolvimento de vacinas contra o DENV (Murrell *et al.* 2011), ainda não há medidas de imunização amplamente disponíveis para a população humana, tornando o vetor *Ae. aegypti* o alvo mais eficaz para a redução da ocorrência de dengue e das febres chikungunya e Zika (Rigáu-Perez 1998), seja através do controle populacional ou da redução da competência vetorial do inseto.

Neste contexto, a investigação da diversidade e dos impactos da microbiota no curso da infecção viral nos mosquitos representa não somente uma oportunidade para o entendimento dos determinantes da capacidade vetorial, mas também para o

desenvolvimento de estratégias que busquem reduzir a susceptibilidade dos mosquitos à infecção (Hedge *et al.* 2015). Neste sentido, a presente tese abordou diferentes facetas das interações envolvendo o mosquito *Ae. aegypti* e a microbiota intestinal, inclusive no contexto da infecção por arbovírus. Foram geradas informações relevantes acerca da diversidade cultivável e não cultivável da microbiota (Capítulos I e II), da dinâmica da comunidade microbiana intestinal ao longo da vida adulta das fêmeas (Capítulo I) e da influência de linhagens específicas na biologia das larvas (Capítulo II). Por fim, apresentamos resultados preliminares da investigação dos impactos da infecção por CHIKV na microbiota de *Ae. aegypti* (Capítulo III).

Apesar da crescente investigação dos impactos das bactérias intestinais na imunidade e na competência vetorial dos culicídeos a arbovírus (Xi *et al.* 2008; Ramirez *et al.* 2012, 2014; Charan *et al.* 2013), ainda existem importantes lacunas no entendimento de como a microbiota é adquirida e dos fatores que modulam a sua diversidade, principalmente em condições naturais. Observou-se em laboratório que a composição da microbiota intestinal dos mosquitos adultos varia em função da dieta. Após a ingestão sanguínea ocorreu uma redução da diversidade, com o predomínio de Enterobacteriaceae ao longo da digestão do sangue (Gusmão *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011). Tais mudanças estão possivelmente relacionadas a diferenças no perfil de nutrientes, como carboidratos e proteínas, disponível no lúmen intestinal de mosquitos alimentados com açúcar ou sangue (Wang *et al.* 2011). Além disso, a infecção experimental por arbovírus também modula a diversidade de bactérias da microbiota (Zouache *et al.* 2012; Zink *et al.* 2015) através da indução de respostas imunes (Zink *et al.* 2015).

Já no ambiente natural, mosquitos da mesma espécie apresentam diferenças na microbiota, o que sugere a influência do ambiente na determinação da composição da

comunidade microbiana presente no intestino (Zouache *et al.* 2011; Osei-Poku *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015). Recentemente, Buck e colaboradores (2016) mostraram que anofelinos provenientes de um mesmo povoado possuem a microbiota mais similar entre si do que insetos originários de outras localidades, demonstrando que a composição da microbiota intestinal é influenciada pelo hábitat dos mosquitos.

Desta maneira, buscamos avaliar os impactos do ambiente, da dieta e da idade na diversidade da microbiota de fêmeas de *Ae. aegypti* através da soltura de insetos criados em laboratório (geração F1) no seu ambiente natural, um bairro urbano do Rio de Janeiro (David *et al.* 2016 - Capítulo I). Para tal, empregamos a técnica de marcação-soltura-recaptura, uma ferramenta poderosa para o estudo da ecologia dos animais no seu hábitat natural. Utilizando metodologias dependentes e independentes do cultivo, caracterizamos a composição bacteriana presente no intestino de fêmeas jovens alimentadas com açúcar (condição em que foram marcadas e soltas na localidade escolhida) e de fêmeas recapturadas nos diferentes dias após a soltura. Assim, avaliamos os impactos da mudança de ambiente (do laboratório para o campo) e da alimentação em fontes naturais de carboidratos e sangue na diversidade da microbiota.

Uma vez que o *Ae. aegypti* é uma espécie que raramente se alimenta de carboidratos, utilizando majoritariamente o sangue como fonte de energia (Edman *et al.* 1992), poderíamos esperar que as fêmeas rapidamente se alimentassem de sangue após a soltura. Por isso, para investigar somente o efeito do repasto sanguíneo na diversidade da microbiota, caracterizamos fêmeas da mesma coorte alimentadas com sangue no laboratório. Adicionalmente, insetos selvagens (oriundos de criadouros naturais) da mesma população também foram incluídos na análise com o objetivo de avaliar os impactos da criação em laboratório na composição da microbiota e/ou se os mosquitos

soltos no ambiente urbano passariam a apresentar uma comunidade intestinal mais parecida com aquela dos insetos nascidos no campo.

Durante a metamorfose para o estágio adulto, os mosquitos eliminam praticamente todas as bactérias presentes no interior tubo digestivo (Moll *et al.* 2001; Lindh *et al.* 2008). Este ambiente pode ser visto como um hábitat vazio a ser colonizado por microorganismos, análogo a uma ilha isolada do ambiente ao redor. Tal interpretação faz com que as interações entre hospedeiro e microbiota possam ser discutidas sob a ótica da Teoria Biogeográfica de Ilhas proposta por MacArthur e Wilson (1967 apud. Begon *et al.* 2007) (Janzen 1968). Segundo esta teoria, a riqueza da comunidade biológica de uma ilha é determinada pelo equilíbrio dinâmico entre as taxas de colonização e de extinção de espécies (MacArthur e Wilson 1967 apud. Begon *et al.* 2007).

Em uma "ilha vazia", como seria o interior do intestino de um mosquito recém-emergido, o número de espécies aumenta em função do tempo até que se atinja este equilíbrio e a riqueza permaneça relativamente constante (Simberloff e Wilson 1969). Seguindo esta lógica, também comparamos a diversidade da microbiota ao longo do tempo, em diferentes grupos etários de *Ae. aegypti*. Como a recaptura de mosquitos marcados normalmente não ocorre além dos 10 dias após a soltura (Harrington *et al.* 2005; Maciel-de-Freitas *et al.* 2007b; Guerra *et al.* 2014), não seria possível contar com estes espécimes para avaliar ao longo do tempo. Para isto, analisamos um grupo de fêmeas mantido no laboratório por 35 dias.

Outra característica do tubo digestivo dos culicídeos que provavelmente influencia a microbiota intestinal é a constante produção e eliminação da matriz peritrófica ou a deposição desta ao redor da refeição sanguínea e posterior eliminação, no caso de larvas e fêmeas adultas, respectivamente (Engel e Moran 2013). Utilizando

imagens de microscopia, Gusmão *et al.* (2010) demonstraram que as bactérias da microbiota de fêmeas adultas 24h após o repasto sanguíneo estão localizadas preferencialmente ao redor do bolo alimentar e associadas à matriz peritrófica. Já 48h após a ingestão do sangue, estes microorganismos já encontram-se dispersos por todo o lúmen intestinal (Gusmão *et al.* 2010). Mesmo assim, é possível que parte da microbiota seja eliminada ao final da digestão juntamente com as fezes e restos da matriz. Se isso for verdade, seria razoável esperar mudanças na estrutura da comunidade intestinal a cada ciclo gonotrófico.

Diante de todas as variáveis mencionadas anteriormente, o presente estudo demonstrou que a maioria dos taxa bacterianos abundantes na microbiota de *Ae. aegypti* perdura ao longo da vida das fêmeas adultas. A riqueza média observada nos indivíduos jovens antes da soltura (21,2) e após 35 dias de vida (20,7) foi similar, o que sugere que o lúmen intestinal deste mosquito é colonizado por microorganismos logo após a emergência do adulto e atinge rapidamente o equilíbrio da riqueza de espécies. Possivelmente, o criadouro larvar possui importante papel na determinação da composição da microbiota do adulto (Buck *et al.* 2016). Além disso, a ausência do estabelecimento de novos taxa bacterianos em abundâncias expressivas (> 2%) ao longo do tempo sugere que este é um ambiente de competição entre as bactérias já estabelecidas (Fons *et al.* 2000; Dong *et al.* 2009).

Nossos resultados são de grande relevância para o desenvolvimento de estratégias de redução da transmissão de arboviroses baseadas no uso de bactérias intestinais, pois demonstramos que a associação de alguns microorganismos com os vetores é estável ao longo do tempo. Capone e colaboradores (2009) apontam esta característica como um pré-requisito básico para a aplicação de uma bactéria na paratransgênese, por exemplo, uma vez que é interessante que esta se estabeleça no

intestino e secrete as moléculas de interesse ao longo de toda a vida do inseto.

Adicionalmente, nós mostramos que a composição da comunidade intestinal é estabelecida logo no início da vida adulta e permanece constante, o que indica que os microorganismos utilizados no controle devem estar presentes nos possíveis criadouros do mosquito, possibilitando a sua aquisição logo após a emergência da fêmea.

Ao continuarmos a investigar a natureza das interações entre o *Ae. aegypti* e a sua microbiota intestinal, avaliamos a influência de linhagens específicas de bactérias na biologia das formas imaturas (Capítulo II). O tempo de desenvolvimento larvar é um parâmetro relevante na adaptabilidade e na capacidade vetorial dos insetos, pois impacta o tempo de geração e o tamanho populacional dos adultos (Stearns e Koella 1986). A bactéria *Asaia*, por exemplo, coloniza o tubo digestivo de imaturos e acelera o desenvolvimento larvar de *Anopheles*, sendo considerada uma das mais promissoras candidatas à aplicação na paratransgênese (Crotti *et al.* 2009; Chouaia *et al.* 2012; Mitraka *et al.* 2013; Villegas e Pimenta 2014).

Entretanto, após adicionar no criadouro larvar a bactéria *Asaia* recuperada de *Ae. aegypti*, não observamos diferenças na taxa de desenvolvimento dos imaturos deste mosquito (Capítulo II). Tal constatação sugere que, apesar de colonizar diversas espécies de insetos (Crotti *et al.* 2009), *Asaia* interage de maneira distinta com seus hospedeiros. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que a influência de *Asaia* na biologia de *Anopheles* seja uma característica específica das espécies ou linhagens bacterianas testadas nos estudos anteriores (Chouaia *et al.* 2012; Mitraka *et al.* 2013), ou seja, ausente nas linhagens testadas por nós.

O gênero bacteriano *Elizabethkingia* apresentou um aumento relativo significativo na microbiota de fêmeas de *Ae. aegypti* ao longo do tempo, compreendendo até ~60% da microbiota (David *et al.* 2016 - Capítulo I). A dominância

de *Elizabethkingia* na microbiota de *Anopheles* foi atribuída à produção de moléculas antibacterianas, antifúngicas e antiparasíticas (Dong *et al.* 2009; Ngwa *et al.* 2013). A partir destas observações propusemos a hipótese que esta bactéria também poderia se estabelecer no intestino das larvas de *Ae. aegypti* e influenciar parâmetros como o tempo de desenvolvimento, a sobrevivência e a nutrição dos imaturos, refletida no tamanho do adulto resultante (Capítulo II). Desta maneira, observamos que a adição de *Elizabethkingia* no criadouro larvar resulta na colonização do tubo digestivo e na aceleração significativa no desenvolvimento larvar de *Ae. aegypti*. Apesar do conhecimento prévio da importância da microbiota na biologia das larvas (Coon *et al.* 2014) e da entomopatogenicidade de *Chromobacterium* (Ramirez *et al.* 2014), esta é a primeira evidência de que linhagens específicas de bactérias podem auxiliar o desenvolvimento das formas imaturas deste mosquito.

Os mecanismos envolvidos neste processo ainda permanecem desconhecidos. No caso de *Anopheles*, a adição de bactérias inativadas não resulta em alterações significativas no desenvolvimento larvar, descartando a possibilidade de que a adição de bactérias no criadouro represente somente um recurso alimentar adicional para as larvas (Mitraka *et al.* 2013), hipótese que ainda não pode ser descartada no caso de *Ae. aegypti* e *Elizabethkingia*. De qualquer maneira, a ocorrência natural ou a deposição desta bactéria no criadouro larvar pela fêmea no momento da postura dos ovos pode possibilitar que os imaturos atinjam mais rapidamente a fase adulta, representando assim uma possível vantagem evolutiva da associação entre *Ae. aegypti* e *Elizabethkingia*.

Segundo a teoria do holobionte, o indivíduo e seus microorganismos associados deveriam ser considerados a unidade de seleção evolutiva, visto que a microbiota pode afetar a biologia e adaptabilidade dos seus hospedeiros e vice-versa (Rosenberg e

Rosenberg 2008). Entretanto, este conceito tem recebido críticas da comunidade científica principalmente quanto à transmissibilidade da microbiota entre gerações, pois a herdabilidade dos caracteres é um dos principais requerimentos do processo de seleção natural (Moran e Sloan 2015; Douglas e Werren 2016). Devido à influência ambiental na composição da microbiota dos culicídeos (Osei-Poku *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015; Buck *et al.* 2016), é improvável que esta seja passada de geração em geração sem mudanças (Dong *et al.* 2006). Porém, uma vez que o genótipo do hospedeiro pode influenciar a diversidade da microbiota (Minard *et al.* 2015), é possível que a seleção natural atue sobre certos genótipos que favoreçam a ocorrência de grupos benéficos de bactérias no lúmen intestinal (Amato 2016).

É cada vez mais evidente que o ambiente intestinal dos insetos vetores é um local de interações complexas envolvendo o sistema imune do hospedeiro, a microbiota intestinal e patógenos invasores (Azambuja *et al.* 2005; Cirimotich *et al.* 2011a; Hedge *et al.* 2015). Inicialmente, alguns estudos demonstraram que a eliminação da microbiota com antibióticos é capaz de aumentar a susceptibilidade de mosquitos ao DENV e ao *Plasmodium* (Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009). A maior resistência à infecção naqueles insetos que albergam bactérias no intestino foi associada ao aumento dos níveis basais da expressão de genes do sistema imune, o que os torna mais aptos a lidar com a infecção por organismos invasores (Xi *et al.* 2008; Dong *et al.* 2009).

Subsequentemente, diversos trabalhos revelaram que as bactérias presentes na microbiota intestinal dos mosquitos diferem nas suas capacidades de modular a infecção por arbovírus e outros parasitas, uma vez que certas linhagens conferem maior resistência (Cirimotich *et al.* 2011b; Joyce *et al.* 2011; Ramirez *et al.* 2012, 2014; Bahia *et al.* 2014), enquanto outras aumentam a susceptibilidade dos vetores (Apte-Deshpande *et al.* 2012, 2014). Deste modo, as diferenças individuais ou populacionais observadas

na composição da microbiota intestinal (Osei-Poku *et al.* 2012; Buck *et al.* 2016) poderiam contribuir pelo menos em parte para a variabilidade observada na competência vetorial dos mosquitos aos patógenos (Gubler *et al.* 1979; Lourenço-de-Oliveira *et al.* 2004; Bossière *et al.* 2012).

Se por um lado a microbiota intestinal pode alterar o curso da infecção por patógenos, o sentido oposto também é verdadeiro. Evidências recentes apontam que a infecção por arbovírus e pelo *Plasmodium* está associada a diferenças significativas na abundância e/ou na composição de bactérias no lúmen intestinal (Bossière *et al.* 2012; Ramirez *et al.* 2012; Zouache *et al.* 2012; Zink *et al.* 2015). Em alguns casos não é possível determinar se a infecção altera a microbiota ou vice-versa (Bossière *et al.* 2012). Porém, a comparação entre insetos expostos e não expostos a arbovírus revelou que a infecção viral é capaz de afetar tanto a diversidade (Zink *et al.* 2015; Zouache *et al.* 2012) quanto a carga de bactérias da microbiota (Ramirez *et al.* 2012).

Diante deste contexto, decidimos avaliar aspectos da interação tripartite envolvendo o *Ae. aegypti*, a microbiota intestinal e o CHIKV (Capítulo III). As populações brasileiras deste mosquito mostram uma alta susceptibilidade a CHIKV (Vega-Rúa *et al.* 2014), recentemente detectado no país (Teixeira *et al.* 2015). Na presente tese nós apresentamos resultados preliminares os quais mostram que a infecção por CHIKV está associada à redução da carga bacteriana no intestino 24h após o repasto sanguíneo infectante em relação a mosquitos não infectados. Uma resposta similar à infecção por DENV foi registrada anteriormente em *Ae. aegypti*, apesar de indícios de que existem diferenças na resposta imune deste mosquito a DENV e CHIKV (Saraiva *et al.* 2016), e foi atribuída ao aumento da expressão de peptídeos antimicrobianos (Ramirez *et al.* 2012). No entanto, este resultado não é consensual entre os culicídeos: outros estudos não observaram qualquer alteração quantitativa na microbiota de *Ae.*

*albopictus* e *Cx. pipiens* infectados por CHIKV e WNV, respectivamente (Zouache *et al.* 2012; Zink *et al.* 2015), mesmo após o aumento da expressão de marcadores das vias imunológicas Toll e Jak-STAT (Zink *et al.* 2015), envolvidas no controle da proliferação de bactérias nos insetos (Lemaitre e Hoffman 2007).

Mosquitos infectados por arbovírus também apresentam diferenças significativas na composição da microbiota quando comparados a insetos não infectados (Zouache *et al.* 2012; Zink *et al.* 2015). *Ae. albopictus* e *Cx. pipiens* infectados por CHIKV e WNV, respectivamente, mostram um aumento relativo de gêneros da família Enterobacteriaceae, por exemplo (Zouache *et al.* 2012; Zink *et al.* 2015). Curiosamente, a abundância de Enterobacteriaceae também foi correlacionada positivamente com o status de infecção por *P. falciparum* em *An. gambiae* (Bossière *et al.* 2012). Desta maneira, é possível que grupos específicos de bactérias influenciem o estabelecimento dos patógenos nos insetos vetores e/ou a infecção por arbovírus e outros parasitas e criem condições propícias ao aumento/redução da sua abundância em relação a outros grupos bacterianos. Neste contexto, a próxima etapa deste estudo será caracterizar a diversidade da microbiota intestinal de *Ae. aegypti* pré-infecção e de fêmeas infectadas e não infectadas por CHIKV ao longo do tempo.

Por fim, a presente tese caracterizou a diversidade da microbiota de *Ae. aegypti* provenientes de uma colônia de laboratório e de populações selvagens do Rio de Janeiro, Brasil, através de metodologias dependentes e independentes do cultivo (Capítulos I e II). Observamos que a composição da microbiota de *Ae. aegypti* possui certo grau de sobreposição entre mosquitos de diferentes localidades, com o encontro frequente de alguns gêneros, tais como, *Asaia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* (Gusmão *et al.* 2010; Zouache *et al.* 2011; Ramirez *et al.* 2012; Osei-Poku *et al.* 2012). Alguns destes podem ser encontrados na água dos criadouros e no intestino

das larvas (Ponnusamy *et al.* 2008; Dada *et al.* 2014), corroborando a hipótese de que pelo menos parte da microbiota é adquirida do ambiente (Zouache *et al.* 2011; Osei-Poku *et al.* 2012).

Apesar do conhecimento gerado recentemente acerca da diversidade da comunidade intestinal de *Ae. aegypti*, ainda é preciso avançar na investigação da sua relevância biológica na adaptabilidade evolutiva do hospedeiro. Pouco se sabe, por exemplo, quais genes são expressos pela microbiota e a sua relação funcional com o metabolismo dos insetos (Minard *et al.* 2013; Hedge *et al.* 2015). Outro ponto interessante é investigar como as variações na composição da microbiota podem influenciar a heterogeneidade da competência vetorial dos mosquitos no espaço e no tempo.

O desenvolvimento de novas ferramentas para reduzir a transmissão de patógenos por vetores é urgente no contexto atual, uma vez que o uso indiscriminado de inseticidas químicos nos últimos anos contribuiu para o desenvolvimento de altos níveis de resistência em populações naturais de artrópodes vetores (Hemingway e Ranson 2000). O avanço no entendimento dos mecanismos que governam as interações tripartites envolvendo vetores, microbiota e patógenos abre novas perspectivas para o estudo da biologia e evolução dos hospedeiros, o qual poderá ser explorado na busca de novas metodologias de controle (Maciel-de-Freitas *et al.* 2012; McGraw e O'Neill 2013).

A mais promissora das estratégias baseadas no uso de organismos simbiotes para reduzir a transmissão de arbovírus por mosquitos vetores no presente é a introdução da bactéria intracelular *Wolbachia* em populações naturais de *Ae. aegypti* com vistas a reduzir a susceptibilidade destes insetos a DENV, CHIKV e ZIKV (Eliminate Dengue, 2016). Além disso, outros simbiotes, como bactérias naturalmente

presentes no lúmen intestinal, também podem interferir com o curso da infecção por patógenos (Ramirez *et al.* 2012) ou ter o seu genoma modificado para tal objetivo (Durvasula *et al.* 1997). Uma vez que a erradicação do *Ae. aegypti* não parece ser um objetivo tangível no contexto social e urbano atual, o presente estudo buscou contribuir para o entendimento das relações envolvendo o mosquito e a microbiota intestinal. Este conhecimento poderá ser empregado, por exemplo, no desenvolvimento de estratégias de controle que utilizem bactérias intestinais para reduzir a susceptibilidade dos insetos à infecção por arbovírus.

## 8. CONCLUSÕES

- ✓ As bactérias dominantes na microbiota de fêmeas de *Ae. aegypti* foram ubíquas no intestino deste mosquito durante as primeiras semanas após a emergência do adulto. Esta microbiota compartilhada foi independente das condições de criação (laboratório ou campo), da dieta (açúcar ou sangue) e se manteve mesmo após a soltura das fêmeas no hábitat natural, onde estas provavelmente se alimentaram de fontes naturais de sangue e carboidratos.
- ✓ O gênero *Elizabethkingia* (Flavobacteriaceae) foi associado a fêmeas alimentadas apenas com açúcar.
- ✓ A composição da microbiota intestinal de *Ae. aegypti* alterou-se significativamente ao longo do tempo. Predições *in silico* indicam que tais mudanças influenciam o potencial funcional e metabólico da comunidade microbiana intestinal deste mosquito.
- ✓ A exposição das larvas ao gênero *Elizabethkingia* significativamente reduz as durações do estágio L1 e do tempo total de desenvolvimento larvar. Por outro lado, nenhuma alteração é observada após a adição de bactérias do gênero *Asaia* no criadouro larvar.
- ✓ Fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas por CHIKV apresentam redução significativa da carga total de bactérias no intestino 24 h após a infecção quando comparadas a mosquitos da mesma população que receberam um repasto sanguíneo não infectante.

- ✓ A carga viral de CHIKV 24 h após a infecção apresenta uma correlação fraca positiva com o número de cópias do gene 16S rRNA bacteriano ( $R^2 = 0,32$ ). Esta associação não se mantém após sete dias de infecção.
  
- ✓ De maneira geral, a diversidade de bactérias da microbiota de *Ae. aegypti* caracterizada durante este estudo apresenta sobreposição com a microbiota de populações deste mosquito coletadas em outras localidades geográficas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksoy S. Tsetse--A haven for microorganisms. *Parasitol Today*. 2000; 16(3):114-8.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5ª Edição. Nova Iorque: Garland Science; 2008.

Allen-Vercoe E. Bringing the gut microbiota into focus through microbial culture: recent progress and future perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2013; 16(5):625-9. doi: 10.1016/j.mib.2013.09.008.

Amato KR. Incorporating the gut microbiota into models of human and non-human primate ecology and evolution. *Am J Phys Anthropol*. 2016; 159(Suppl 61):S196-215. doi: 10.1002/ajpa.22908.

Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75(5):886-92.

Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol*. 2001; 26:32–46.

Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, Deobagkar DN. *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. *PLoS One*. 2012; 7(7):e40401. doi: 10.1371/journal.pone.0040401.

Apte-Deshpande AD, Paingankar MS, Gokhale MD, Deobagkar DN. *Serratia odorifera* mediated enhancement in susceptibility of *Aedes aegypti* for Chikungunya virus. *Indian J Med Res*. 2014; 139(5):762-8.

- Azambuja P, Feder D, Garcia ES. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol*. 2004; 107(1-2):89-96.
- Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol*. 2005; 21(12):568-72.
- Bahia AC, Dong Y, Blumberg BJ, Mlambo G, Tripathi A, BenMarzouk-Hidalgo OJ, *et al*. Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. *Environ Microbiol*. 2014;16(9):2980-94. doi: 10.1111/1462-2920.12381.
- Bai H, Ramaseshadri P, Palli SR. Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2007; 37(8):829-37.
- Barrera R, Avila J, González-Téllez S. Unreliable supply of potable water and elevated *Aedes aegypti* larval indices: a causal relationship? *J Am Mosq Control Assoc*. 1993; 9(2):189-95.
- Bartram AK, Lynch MD, Stearns JC, Moreno-Hagelsieb G, Neufeld JD. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(11):3846-52. doi: 10.1128/AEM.02772-10.
- Berntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(1):115-37.
- Begon M, Townsend C, Harper J. *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. 4a Ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446):504-7. doi: 10.1038/nature12060.

Billker O, Miller AJ, Sinden RE. Determination of mosquito bloodmeal pH *in situ* by ion-selective microelectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis. *Parasitology*. 2000; 120, 547-51.

Black WC 4th, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernández-Salas I, de Lourdes Muñoz M, *et al.* Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch Med Res*. 2002; 33(4):379-88.

Blair CD. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol*. 2011; 6(3):265-77. doi: 10.2217/fmb.11.11.

Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, *et al.* Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog*. 2012; 8(5):e1002742. doi: 10.1371/journal.ppat.1002742.

Boudko DY, Moroz LL, Linser PJ, Trimarchi JR, Smith PJ, Harvey WR. *In situ* analysis of pH gradients in mosquito larvae using non-invasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes. *J Exp Biol*. 2001; 204(Pt 4):691-9.

Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MA. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(5):573-80.

Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus.

PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(8):e1760. doi: 10.1371/journal.pntd.0001760.

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epidemiol. Serv Saúde. 2007; 16(2): 113-8.

Braks MA, Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R, Juliano SA, Lounibos LP.

Convergent habitat segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in southeastern Brazil and Florida. J Med Entomol. 2003; 40(6):785-94.

Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, *et al.* Zika virus outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: clinical characterization, epidemiological and virological aspects. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(4):e0004636. doi:

10.1371/journal.pntd.0004636.

Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, *et al.*

Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(38):16050-5. doi: 10.1073/pnas.1102999108.

Briegel H. Fecundity, metabolism, and body size in *Anopheles* (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. J Med Entomol. 1990; 27(5):839-50.

Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, *et al.* Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. Proc Biol Sci. 2011; 278(1717):2446-54. doi:

10.1098/rspb.2010.2469.

Buck M, Nilsson LK, Brunius C, Dabiré RK, Hopkins R, Terenius O. Bacterial associations reveal spatial population dynamics in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Sci Rep*. 2016; 6:22806. doi: 10.1038/srep22806.

Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(11):790-801. doi: 10.1038/nri3535.

Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, *et al*. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016; pii: S1473-3099(16)00095-5. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00095-5.

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(10):1885-6. doi: 10.3201/eid2110.150847.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, *et al*. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(6):1085-6. doi: 10.3201/eid2006.140138.

Capone A, Ricci I, Damiani C, Mosca M, Rossi P, Scuppa P, *et al*. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasit Vectors*. 2013; 6(1):182. doi: 10.1186/1756-3305-6-182.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, *et al*. *Nat Methods*. 2010; 7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303.

Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, *et al*. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per

sample. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; 108 Suppl 1:4516-22. doi: 10.1073/pnas.1000080107.

Centers for Disease Control and Prevention. International catalog of arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 2016. Disponível em <https://wwwn.cdc.gov/arboicat/>. Acessado em 31 de março de 2016.

Chandler JA, Liu RM, Bennett SN. RNA shotgun metagenomic sequencing of northern California (USA) mosquitoes uncovers viruses, bacteria, and fungi. Front Microbiol. 2015; 6:185. doi: 10.3389/fmicb.2015.00185.

Charan SS, Pawar KD, Gavhale SD, Tikhe CV, Charan NS, Angel B, Joshi V, Patole MS, Shouche YS. Comparative analysis of midgut bacterial communities in three aedine mosquito species from dengue-endemic and non-endemic areas of Rajasthan, India. Med Vet Entomol. 2016 doi: 10.1111/mve.12173.

Charan SS, Pawar KD, Severson DW, Patole MS, Shouche YS. Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. Parasitol Res. 2013; 112(7):2627-37. doi: 10.1007/s00436-013-3428-x.

Chavshin A, Oshaghi M, Vatandoost H, Yakhchali B, Zarenejad F, Terenius O. Malpighian tubules are important determinants of *Pseudomonas* transstadial transmission and longtime persistence in *Anopheles stephensi*. Parasit Vectors. 2015; 8(1):36.

Chouaia B, Rossi P, Epis S, Mosca M, Ricci I, Damiani C, *et al.* Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts. BMC Microbiol. 2012; 12 Suppl 1:S2. doi: 10.1186/1471-2180-12-S1-S2.

Chouin-Carneiro T, Vega-Rúa A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, *et al.*

Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas

to Zika Virus. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Mar 3;10(3):e0004543. doi:

10.1371/journal.pntd.0004543.

Christophers SR. *Aedes aegypti* (L.). The yellow fever mosquito, its life history,

bionomics, and structure. London: Cambridge University Press; 1960.

Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, *et al.*

Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles*

*gambiae*. Science. 2011b; 332(6031):855-8. doi: 10.1126/science.1201618.

Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G. Native microbiota shape insect vector

competence for human pathogens. Cell Host Microbe. 2011a; 10(4):307-10. doi:

10.1016/j.chom.2011.09.006.

Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW.

Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly

complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions.

Nucleic Acids Res. 2010; 38(22):e200. doi: 10.1093/nar/gkq873.

Clements AN. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction.

1st ed. Wallingford: CABI Publishing; 1992.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária

no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1994.

Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, Strand MR. Mosquitoes rely on their gut microbiota

for development. Mol Ecol. 2014; 23(11):2727-39. doi: 10.1111/mec.12771.

- Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009; 326(5960):1694-7. doi: 10.1126/science.1177486.
- Crotti E, Damiani C, Pajoro M, Gonella E, Rizzi A, Ricci I, *et al.* *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environ Microbiol*. 2009; 11(12):3252-64. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02048.x.
- Cunha SP, Alves JCR, Lima MM, Duarte JR, Barros LCV, Silva JL, *et al.* Presença de *Aedes aegypti* em bromeliaceae e depósitos com plantas no Município de Rio de Janeiro. *Rev Saúde Públ*. 2002; 36:244-45.
- Dada N, Jumas-Bilak E, Manguin S, Seidu R, Stenström TA, Overgaard HJ. Comparative assessment of the bacterial communities associated with *Aedes aegypti* larvae and water from domestic water storage containers. *Parasit Vectors*. 2014; 7:391. doi: 10.1186/1756-3305-7-391.
- Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, *et al.* Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Curr Biol*. 2008; 18(23):R1087-8. doi: 10.1016/j.cub.2008.10.040.
- Darwin C. *On the Origin of Species*. Londres: John Murray; 1859.
- Dash PK, Parida MM, Santhosh SR, Verma SK, Tripathi NK, Ambuj S, *et al.* East Central South African genotype as the causative agent in reemergence of Chikungunya outbreak in India. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008; 7(4):519-27. doi: 10.1089/vbz.2007.7272.

David MR, Lourenço-de-Oliveira R, Freitas RM. Container productivity, daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* mosquitoes in a high income dengue epidemic neighbourhood of Rio de Janeiro: presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(6):927-32.

Dick GW. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1952; 46(5):521-34.

Dick OB, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. Am J Trop Med Hyg. 2012; 87(4):584-93. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0770.

Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Annu Rev Entomol. 2004; 49:71-92.

Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent Plasmodium parasite species. PLoS Pathog. 2006; 2(6):e52.

Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. PLoS Pathog. 2009; 5(5):e1000423.

Douglas AE, Werren JH. Holes in the Hologenome: Why host-microbe symbioses are not holobionts. MBio. 2016; 7(2). pii: e02099-15. doi: 10.1128/mBio.02099-15.

Douglas AE. Lessons from studying insect symbioses. Cell Host Microbe. 2011; 10(4):359-67. doi: 10.1016/j.chom.2011.09.001.

Duong V, Lambrechts L, Paul RE, Ly S, Lay RS, Long KC, Huy R, Tarantola A, Scott TW, Sakuntabhai A, Buchy P. Asymptomatic humans transmit dengue virus to

mosquitoes. Proc Natl Acad Sci USA. 2015; 112(47):14688-93. doi:  
10.1073/pnas.1508114112.

Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, *et al.*  
Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria.  
Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94(7):3274-8.

Dutra HL, Dos Santos LM, Caragata EP, Silva JB, Villela DA, Maciel-de-Freitas R, *et al.*  
From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of  
*Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. PLoS Negl Trop Dis. 2015;  
9(4):e0003689. doi: 10.1371/journal.pntd.0003689.

Dutra HL, Rocha MN, Dias FB, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. *Wolbachia*  
Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes.  
Cell Host Microbe. 2016; 19(6):771-4. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.021.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity  
and speed of chimera detection. Bioinformatics. 2011; 27(16):2194-200. doi:  
10.1093/bioinformatics/btr381.

Edgell SE, Noon SM. Effect of violation of normality on the test of the correlation  
coefficient. Psychol Bull. 1984; 95:576-83.

Edman JD, Strickman D, Kittayapong P, Scott TW. Female *Aedes aegypti* (Diptera:  
Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. J Med Entomol. 1992; 29(6):1035-8.

Edwards RA, Rodriguez-Brito B, Wegley L, Haynes M, Breitbart M, Peterson DM, *et al.*  
Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. BMC  
Genomics. 2006; 7:57.

- Eleftherianos I, Castillo JC. Molecular mechanisms of aging and immune system regulation in *Drosophila*. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(8):9826-44. doi: 10.3390/ijms13089826.
- Eliminate Dengue. Disponível em <http://www.eliminatedengue.com/program>. Acessado em 31 de março de 2016.
- Engel P, Moran NA The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2013; 37(5):699-735. doi: 10.1111/1574-6976.12025.
- Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2013; 37(5):699-735. doi: 10.1111/1574-6976.12025.
- Faria NR, Azevedo RD, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, *et al*. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*. 2016; pii: aaf5036.
- Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, *et al*. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(21):9047-51.
- Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M, *et al*. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(1):e2636. doi: 10.1371/journal.pntd.0002636.
- Figueiredo ML, de C Gomes A, Amarilla AA, de S Leandro A, de S Orrico A, de Araujo RF, *et al*. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virology*. 2010; 7:152. doi: 10.1186/1743-422X-7-152.
- Fine PE. Vectors and vertical transmission: an epidemiologic perspective. *Ann N Y Acad Sci*. 1975; 266:173-94.

- Fons M, Gomez G, Karjalainen T. Mechanisms of Colonisation and Colonisation Resistance of the Digestive Tract. *Microb Ecol Health Dis.* 2000; 2: 240–246.
- Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012; 9(6):312-22. doi: 10.1038/nrgastro.2012.44.
- Franz AW, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, *et al.* Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(11):4198-203.
- Gaio Ade O, Gusmão DS, Santos AV, Berbert-Molina MA, Pimenta PF, Lemos FJ. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasit Vectors.* 2011; 4:105. doi: 10.1186/1756-3305-4-105.
- Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Azambuja P. Immune homeostasis to microorganisms in the guts of triatomines (Reduviidae) - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(5):605-10.
- Garret-Jones C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull World Health Organ.* 1964; 30(2):241-61.
- Glaeser SP, Kampfer P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol.* 2015; 38(4):237-45. doi: 10.1016/j.syapm.2015.03.007.
- Gotelli NJ, Colwell RK. Estimating species richness. In: Magurran AE, McGill BJ, editors. *Frontiers in Measuring Biodiversity.* Nova Iorque: Oxford University Press; 2011: 39-54.

Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerging infectious diseases*. 2015; 21(1):84–6.

doi:10.3201/eid2101.140894

Gubler DJ, Kuno G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Wallingford: CAB International; 1997.

Gubler DJ, Nalim S, Tan R, Saipan H, Sulianti Saroso J. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 1979; 28(6):1045-52.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(3):480-96.

Guerra CA, Reiner RC Jr, Perkins TA, Lindsay SW, Midega JT, Brady OJ, *et al*. A global assembly of adult female mosquito mark-release-recapture data to inform the control of mosquito-borne pathogens. *Parasit Vectors*. 2014; 7:276. doi: 10.1186/1756-3305-7-276.

Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Bacci M Jr, Berbert-Molina MA, Lemos FJ. 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*. 2010; 115(3):275-81.

Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Russo Ede S, Peixoto AM, Bacci Júnior M, *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*. 2007; 102(8):919-24.

Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol.* 2008; 53:273-91.

Halstead SB. Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(4):557-61. doi: 10.3201/eid2104.141723.

Hanley KA, Weaver SC. Arbovirus Evolution. In: Origin and evolution of viruses. Domingo E, Parrish CR, Holland JJ. Nova Jersey: John Wiley & Sons, Ltd.; 2008.

Hansen AK, Moran NA. The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Mol Ecol.* 2014; 23(6):1473-96. doi: 10.1111/mec.12421.

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol.* 1983; 28:229-62.

Harrington LC, Scott TW, Lerdthusnee K, Coleman RC, Costero A, Clark GG, *et al.* Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72(2):209-20.

Hasebe F, Parquet MC, Pandey BD, Mathenge EG, Morita K, Balasubramaniam V *et al.* Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 2002; 67(3):370-4.

Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(9):1347-50. doi: 10.3201/eid1509.090442

Head IM, Saunders JR, Pickup RW. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb Ecol.* 1998; 35(1):1-21.

Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*. 2008; 322(5902):702. doi: 10.1126/science.1162418.

Hegde S, Rasgon JL, Hughes GL. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Curr Opin Virol*. 2015; 15:97-102. doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.011.

Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000; 45:371-91.

Higgs S, Vanlandingham D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. *Vector Borne Zoon Dis*. 2015; 15(4):231-40. doi: 10.1089/vbz.2014.1745.

Higgs S. The 2005-2006 Chikungunya epidemic in the Indian Ocean. *Vector Borne Zoon Dis*. 2006; 6(2):115-6.

Hillyer JF, Schmidt SL, Fuchs JF, Boyle JP, Christensen BM. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cell Microbiol*. 2005; 7(1):39-51.

Hillyer JF, Schmidt SL, Fuchs JF, Boyle JP, Christensen BM. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cell Microbiol*. 2005; 7(1):39-51.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, *et al*. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 2011; 476:454–7. doi:10.1038/nature1035.

Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 2003; 3(1):19-28.

- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*. 2001; 292(5519):1115-8.
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T. Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol*. 2006; 4(10):e337.
- Hughes GL, Dodson BL1, Johnson RM, Murdock CC, Tsujimoto H, Suzuki Y, *et al*. Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(34):12498-503. doi: 10.1073/pnas.1408888111.
- Hughes JB, Hellmann JJ. The application of rarefaction techniques to molecular inventories of microbial diversity. *Methods Enzymol*. 2005; 397:292-308.
- Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C, *et al*. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med Vet Entomol*. 1997; 11(4):305-9.
- Janzen DH. Host Plants as Islands in Evolutionary and Contemporary Time. *The Am Nat*. 1968; 102(928):592-5.
- Joyce JD, Nogueira JR, Bales AA, Pittman KE, Anderson JR. Interactions between La Crosse virus and bacteria isolated from the digestive tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2011; 48(2):389-94.

Kim CH, Lampman LR, Muturi EJ. Bacterial Communities and Midgut Microbiota Associated with Mosquito Populations from Waste Tires in East-Central Illinois. *J Med Entomol.* 2015; 52(1):63-75.

Kirby MJ, Lindsay SW. Effect of temperature and inter-specific competition on the development and survival of *Anopheles gambiae* sensu stricto and *An. arabiensis* larvae. *Acta Trop.* 2009; 109(2):118-23.

Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V, O'Neill SL. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2000; 37(3):340-5.

Klempner MS, Unnasch TR, Hu LT. Taking a bite out of vector-transmitted infectious diseases. *N Engl J Med.* 2007; 356 (25):2567-9.

Klepzig KD, Adams AS, Handelsman J, Raffa KF. Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environ Entomol.* 2009; 38(1):67-77.

Kuno G, Chang GJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(4):608-37.

Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(5):e646. doi: 10.1371/journal.pntd.0000646.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(8):1232-9. doi: 10.3201/eid1408.080287.

Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(9):814-21. doi: 10.1038/nbt.2676.

Lehane MJ. Peritrophic Matrix Structure and Function. *Annu Rev Entomol.* 1997; 42:525–50.

Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:697-743.

Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet.* 2014; 8;383(9916):514. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60185-9.

Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39 (Web Server issue):W475-8. doi: 10.1093/nar/gkr201.

Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(31):11070-5.

Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science.* 2008; 320(5883):1647-51. doi: 10.1126/science.1155725.

Lindh JM, Borg-Karlson AK, 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.* 2008; 107(3):242-50.

Logares R, Sunagawa S, Salazar G, Cornejo-Castillo FM, Ferrera I, Sarmiento H, *et al.* Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environ Microbiol.* 2014; 16(9):2659-71. doi: 10.1111/1462-2920.12250.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004; 98(1):43-54.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 69(1):105-14.

Lozupone CA, Knight R. Global patterns in bacterial diversity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(27):11436-40.

Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgine MH, *et al.* Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(6):828-9.

Maciel-de-Freitas R, Codeço CT, Lourenço-de-Oliveira R. Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2007b; 76(4):659-65.

Maciel-de-Freitas R, Marques WA, Peres RC, Cunha SP, de Oliveira RL. Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district of Rio de Janeiro during dry and wet seasons. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007a; 102(4):489-96.

Magurran, AE. Measuring biological diversity. Oxford: Blackwell; 2004.

Mahmood F, Chiles RE, Fang Y, Green EN, Reisen WK. Effects of time after infection, mosquito genotype, and infectious viral dose on the dynamics of *Culex tarsalis* vector competence for western equine encephalomyelitis virus. J Am Mosq Control Assoc. 2006; 22(2):272-81.

Mancini MV, Spaccapelo R, Damiani C, Accoti A, Tallarita M, Petraglia E, *et al.* Paratransgenesis to control malaria vectors: a semi-field pilot study. Parasit Vectors. 2016; 9(1):140. doi: 10.1186/s13071-016-1427-3.

Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. Am J Trop Med Hyg. 1969; 18(3):411-5.

Marchini D, Ciolfi S, Gottardo M, Marri L. Bacteria of the genus *Erwinia* found in the spermatheca of the laurel psyllid *Trioza alacris*. Arch Microbiol. 2014; 196(12):901-5. doi: 10.1007/s00203-014-1039-2.

Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, *et al.* Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. PLoS One. 2012; 7(7):e41386. doi: 10.1371/journal.pone.0041386.

- McFarlane M, Arias-Goeta C, Martin E, O'Hara Z, Lulla A, Mousson L, *et al.*  
Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *Negl Trop Dis.* 2014; 8(7):e2994. doi: 10.1371/journal.pntd.0002994.
- McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(3):181-93. doi: 10.1038/nrmicro2968.
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, Wang YF, *et al.* Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science.* 2009; 323(5910):141-4. doi: 10.1126/science.1165326.
- Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics.* 2013; 14:913. doi: 10.1186/1471-2164-14-913.
- Min KT, Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(20):10792-6.
- Minard G, Mavingui P, Moro CV. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors.* 2013; 6:146. doi: 10.1186/1756-3305-6-146.
- Minard G, Tran FH, Dubost A, Tran-Van V, Mavingui P, Moro CV. Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: a pilot study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4:59. doi: 10.3389/fcimb.2014.00059. eCollection 2014.
- Minard G, Tran FH, Raharimalala FN, Hellard E, Ravelonandro P, Mavingui P, *et al.* Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012; 83(1):63-73. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01455.x.

Minard G, Tran FH, Van VT, Goubert C, Bellet C, Lambert G, *et al.* French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. *Front Microbiol.* 2015; 6:970. doi: 10.3389/fmicb.2015.00970.

Mitraka E, Stathopoulos S, Siden-Kiamos I, Christophides GK, Louis C. *Asaia* accelerates larval development of *Anopheles gambiae*. *Pathog Glob Health.* 2013; 107(6):305-11. doi: 10.1179/2047773213Y.0000000106.

Moll RM, Romoser WS, Modrzakowski MC, Moncayo AC, Lerdthusnee K. Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *J Med Entomol.* 2001; 38(1):29-32.

Montagna M, Chouaia B, Mazza G, Prosdocimi EM, Crotti E, Mereghetti V, *et al.* Effects of the diet on the microbiota of the red palm weevil (Coleoptera: Dryophthoridae). *PLoS One.* 2015; 10(1):e0117439. doi: 10.1371/journal.pone.0117439.

Monteiro FA, Schama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: patterns following an eradication program. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(9):e3167. doi: 10.1371/journal.pntd.0003167.

Moran NA, Sloan DB. The hologenome concept: helpful or hollow? *PLoS Biol.* 2015; 13(12):e1002311. doi: 10.1371/journal.pbio.1002311.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell.* 2009; 139(7):1268-78. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.042.

- Morettin PA, Bussab WO. Estatística Básica. 6a Ed. São Paulo: Saraiva; 2010.
- Morrison AC, Zielinski-Gutierrez E, Scott TW, Rosenberg R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. PLoS Med. 2008; 5(3):e68.
- Mourya DT, Pidiyar V, Patole M, Gokhale MD, Shouche Y. Effect of midgut bacterial flora of *Aedes aegypti* on the susceptibility of mosquitoes to dengue viruses. Dengue Bulletin. 2002; 26:190-4.
- Mourya DT, Yadav P, Mishra AC. Effect of temperature stress on immature stages and susceptibility of *Aedes aegypti* mosquitoes to chikungunya virus. Am J Trop Med Hyg. 2004; 70(4):346-50.
- Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. Biotechnol Adv. 2011; 29(2):239-47. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.11.008.
- Musso D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. Emerg Infect Dis. 2015; 21(10):1887. doi: 10.3201/eid2110.151125.
- Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. J Clin Virol. 2015b; 68:53–5.  
doi:10.1016/j.jcv.2015.04.021PMID:26071336
- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. Emerg Infect Dis. 2015a; 21(2):359–61.  
doi:10.3201/eid2102.141363PMID:25625872.

Muturi EJ, Alto BW. Larval environmental temperature and insecticide exposure alter *Aedes aegypti* competence for arboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(8):1157-63. doi: 10.1089/vbz.2010.0209.

Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiol.* 2002; 148(Pt 1):257-66.

Nasci RS. The size of emerging and host-seeking *Aedes aegypti* and the relation of size to blood-feeding success in the field. *J Am Mosq Control Assoc.* 1986; 2(1):61-2.

Nguyen MN, Duong TH, Trung VT, Nguyen TH, Tran CN, Long VT, *et al.* Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(22):9072-7. doi: 10.1073/pnas.1303395110.

Ngwa CJ, Glöckner V, Abdelmohsen UR, Scheuermayer M, Fischer R, Hentschel U, *et al.* 16S rRNA gene-based identification of *Elizabethkingia meningoseptica* (Flavobacteriales: Flavobacteriaceae) as a dominant midgut bacterium of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi* (Dipteria: Culicidae) with antimicrobial activities. *J Med Entomol.* 2013; 50(2):404-14.

Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* 2013; 342(6157):415. doi:0.1126/science.342.6157.415.

Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 2015; 13:102. doi: 10.1186/s12916-015-0348-x.

Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastere S, Valour F, *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome-case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 2014; 19(9). pii: 20720.

O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006; 7(7):688-93.

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, *et al.* vegan: community ecology package. R package version 2.1-26/r2441. 2013.

Oliveira CD, Gonçalves DS, Baton LA, Shimabukuro PH, Carvalho FD, Moreira LA. Broader prevalence of *Wolbachia* in insects including potential human disease vectors. *Bull Entomol Res.* 2015; 105(3):305-15. doi: 10.1017/S0007485315000085.

Oliveira JH, Gonçalves RL, Lara FA, Dias FA, Gandara AC, Menna-Barreto RF, *et al.* Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathog.* 2011; 7(3):e1001320. doi: 10.1371/journal.ppat.1001320.

Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(3):389-93.

Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol Ecol.* 2012; 21(20):5138-50.

Pan American Health Organization (PAHO), World Health Organization (WHO). Zika virus infection. Epidemiological alert. 2015. Disponível em <http://www.paho.org/hq/>. Acessado em 01 de março de 2016.

Pan-American Health Organization (PAHO). Cumulative Zika suspected and confirmed cases reported by countries and territories in the Americas, 2015-2016. 2016.

Disponível em [http://ais.paho.org/hip/viz/ed\\_zika\\_cases.asp](http://ais.paho.org/hip/viz/ed_zika_cases.asp). Acessado em: 01 de março de 2016.

Paupy C, Chantha N, Vazeille M, Reynes JM, Rodhain F, Failloux AB. Variation over space and time of *Aedes aegypti* in Phnom Penh (Cambodia): genetic structure and oral susceptibility to a dengue virus. *Genet Res.* 2003; 82(3):171-82.

Peryassú AG. Os Culicídeos do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto de Manguinhos; 1908.

Pflughoeft KJ, Versalovic J. Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol.* 2012; 7:99-122. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132421.

Ponnusamy L, Xu N, Stav G, Wesson DM, Schal C, Apperson CS. Diversity of bacterial communities in container habitats of mosquitoes. *Microb Ecol.* 2008; 56(4):593-603. doi: 10.1007/s00248-008-9379-6.

Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108 Suppl 1:11-7. doi: 10.1590/0074-0276130395.

QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.

R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna; 2008.

Ramirez JL, Short SM, Bahia AC, Saraiva RG, Dong Y, Kang S, *et al.*

*Chromobacterium* Csp\_P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes

and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. PLoS Pathog. 2014; 10(10):e1004398. doi: 10.1371/journal.ppat.1004398.

Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, Dimopoulos G. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(3):e1561. doi: 10.1371/journal.pntd.0001561.

Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. BMC Microbiol. 2009; 9:96.

Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. Annu Rev Microbiol. 2003; 57:369-94.

Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, *et al.* Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. Lancet. 2007; 370(9602):1840-6.

Ricci I, Damiani C, Capone A, DeFreece C, Rossi P, Favia G. Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. Curr Opin Microbiol. 2012; 15(3):278-84. doi: 10.1016/j.mib.2012.03.004.

Ridley M. Evolução. 3ª Edição. Porto Alegre: Artmed; 2006.

Rigáu-Peres JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndan AV. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Lancet. 1998; 352(9132):971-7.

Robinson MC. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-53. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1955; 49(1):28-32.

Romoser WS, Moll RM, Moncayo AC, Lerdthusnee K. The occurrence and fate of the meconium and meconial peritrophic membranes in pupal and adult mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2000; 37(6):893-6.

Rosen L. Overwintering mechanisms of mosquito-borne arboviruses in temperate climates. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 37(3 Suppl):69S-76S.

Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(5):355-62.

Rosenberg E, Rosenberg ZI. Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept. *MBio.* 2016; 7(2). pii: e01395-15. doi: 10.1128/mBio.01395-15.

Rosenberg ZI, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32(5):723-35. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.

Roselló-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 2001; 25(1):39-67.

Rossi P, Ricci I, Cappelli A, Damiani C, Ulissi U, Mancini MV, *et al.* Mutual exclusion of *Asaia* and *Wolbachia* in the reproductive organs of mosquito vectors. *Parasit Vectors.* 2015; 8:278. doi: 10.1186/s13071-015-0888-0.

Ruiu L. Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. *Insects.* 2015; 6(2):352-67. doi: 10.3390/insects6020352.

- Sapp J. *Evolution by Association*. Nova Iorque: Oxford University Press; 1994.
- Saraiva RG, Kang S, Simões ML, Angleró-Rodríguez YI, Dimopoulos G. Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Dev Comp Immunol*. 2016; pii: S0145-305X(16)30015-5. doi: 10.1016/j.dci.2016.01.015.
- Schatzmayer HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95 Suppl 1:179-81.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, *et al*. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(23):7537-41. doi: 10.1128/AEM.01541-09.
- Schloss PD, Westcott SL. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(10):3219-26. doi: 10.1128/AEM.02810-10.
- Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, *et al*. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*. 2006; 3(7):e263.
- Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, *et al*. Possible association between Zika virus infection and microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016; 65:59-62.
- Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(11):800-12. doi: 10.1038/nrc3610.

Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2015b. Resultados LIRAA Nacional 2015. Disponível em

<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/03/LIRAA-NACIONAL-2015-Vers--o-II.pdf>. Acessado em 02 de março de 2016.

Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. 2015a; 46(44):1-9. Disponível em

<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/07/2015-svs-be-pncd-se48.pdf>. Acessado em 02 de março de 2016.

Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. 2016; 47(14):1-7. Disponível em

<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/29/2016-011-boletim-epi-dcz-se8.pdf>. Acessado em 02 de março de 2016.

Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016; 164(3):337-40. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.

Severo, OP. Eradication of the *Aedes aegypti* mosquito from the Americas. *Mosquito News*. 1956; 16:115-21.

Sharma P, Sharma S, Maurya RK, Das De T, Thomas T, Lata S, *et al*. Salivary glands harbor more diverse microbial communities than gut in *Anopheles culicifacies*. *Parasit Vectors*. 2014; 7:235. doi: 10.1186/1756-3305-7-235.

Silva Jr JB, Siqueira JB Jr, Coelho GE, Vilarinhos PT, Pimenta FG Jr. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol Bull*. 2002; 23(1):3-6.

Sim S, Jupatanakul N, Ramirez JL, Kang S, Romero-Vivas CM, Mohammed H, *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.* 2013; 7(7):e2295. doi: 10.1371/journal.pntd.0002295.

Simberloff DS, Wilson EO. Experimental zoogeography of islands: the colonization of empty islands. *Ecology.* 1969; 50: 278–96.

Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen vV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med.* 2012; 366(15):1423-32. doi: 10.1056/NEJMra1110265.

Simpson DI. Zika Infection in Man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1964; 58:335-8.

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 20;106(42):17841-6. doi: 10.1073/pnas.0905006106.

Spröer C, Mendrock U, Swiderski J, Lang E, Stackebrandt E. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family Enterobacteriaceae. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49:1433-8.

Stackebrandt E, Goebel BM. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 1994; 44:846–9.

Stearns SC, Koella J. The evolution of phenotypic plasticity in life-history traits: Predictions for norms of reaction for age- and size-at-maturity. *Evolution.* 1986; 40(5): 893-913.

Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(1):249-77. doi: 10.3390/ijerph10010249.

Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*. 2008; 6(12):e2. doi: 10.1371/journal.pbio.1000002.

Teixeira MG, Andrade AM, Costa Mda C, Castro JN, Oliveira FL, Goes CS, *et al*. East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(5):906-7. doi: 10.3201/eid2105.141727.

Terenius O, Lindh JM, Eriksson-Gonzales K, Bussière L, Laugen AT, Bergquist H, *et al*. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012; 80(3):556-65.

Terra WR. Evolution of Digestive System of Insects. *Annu Rev Entomol*. 1990; 35:181-200.

Thompson WH, Beaty BJ. Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Science*. 1977; 196(4289):530-1.

Thu HM, Aye KM, Thein S. The effect of temperature and humidity on dengue virus propagation in *Aedes aegypti* mosquitos. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1998; 29(2):280-4.

Tsakas S, Marmaras VJ. Insect immunity and its signalling: an overview. *Invert Surv J*. 2010; 7:228-38.

Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007; 3(12):e201.

Tun-Lin W, Burkot TR, Kay BH. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Med Vet Entomol.* 2000; 14(1):31-7.

van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk Lekkerkerk-v. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond).* 1971; 69(3):405-11.

van Uitregt VO, Hurst TP, Wilson RS. Reduced size and starvation resistance in adult mosquitoes, *Aedes notoscriptus*, exposed to predation cues as larvae. *J Anim Ecol.* 2011; 81(1):108-15.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 1996; 60(2):407-38.

Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9(7):532-41. doi: 10.1038/nrmicro2595.

Vasilakis V. 2013. The Daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in Southeast Asia. Proceedings of the 3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever; Bangkok, Thailand.

Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Chungue E, Failloux AB. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60(2):292-9.

Vega-Rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenço-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J Virol.* 2014; 88(11):6294-306. doi: 10.1128/JVI.00370-14.

Větrovský T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One.* 2013; 8(2):e57923. doi: 10.1371/journal.pone.0057923.

Vieira CS, Waniek PJ, Mattos DP, Castro DP, Mello CB, Ratcliffe NA, *et al.* Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. *Parasit Vectors.* 2014; 7:232. doi: 10.1186/1756-3305-7-232.

Villegas LM, Pimenta PF. Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109(5):672-84.

Vilo C, Dong Q. Evaluation of the RDP classifier accuracy using 16S rRNA gene variable regions. *Metagenomics.* 2012; 1:1-5.

Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, *et al.* The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature.* 2011; 476(7361):450-3. doi: 10.1038/nature10355.

- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(16):5261-7.
- Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, Jacobs-Lorena M. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(31):12734-9. doi: 10.1073/pnas.1204158109.
- Wang S, Jacobs-Lorena M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(3):185-93. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.01.001.
- Wang Y, Gilbreath TM 3rd, Kukutla P, Yan G, Xu J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One.* 2011; 6(9):e24767. doi: 10.1371/journal.pone.0024767.
- Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36(1):143-52.
- Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res.* 2015; 120:32-9. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.04.016.
- Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010; 85(2):328-45. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.
- Weaver SC. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends Microbiol.* 2013; 21(8):360-3. doi: 10.1016/j.tim.2013.03.003.

- Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6(10):741-51. doi: 10.1038/nrmicro1969.
- West SA, Fisher RM, Gardner A, Kiers ET. Major evolutionary transitions in individuality. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(33):10112-9. doi: 10.1073/pnas.1421402112.
- Whalon ME; Wingerd BA. Bt: mode of action and use. *Arch Insect Bioch Physiol*. 2003; 54:200–11.
- Willing BP, Jansson JK. The gut microbiome: Ecology and function. In: Sadowsky M, Whitman RL. *The Fecal Bacteria*. Washington: ASM Press; 2011:39-65
- World Health Organization (WHO). Arbovirus and human disease. World Health Organization technical report series. 1966; 369:1-84.
- World Health Organization (WHO). *The control of neglected zoonotic diseases*. Geneva: WHO Press; 2006.
- Xi Z, Khoo CC, Dobson SL. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science*. 2005; 310(5746):326-8.
- Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 2008; 4(7):e1000098. doi: 10.1371/journal.ppat.1000098.
- Yadav KK, Bora A, Datta S, Chandel K, Gogoi HK, Prasad GB, Veer V. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasit Vectors*. 2015;8:641. doi: 10.1186/s13071-015-1252-0.

- Yamada Y, Katsura K, Kawasaki H, Widyastuti Y, Saono S, Seki T, *et al.* *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50 Pt 2:823-9.
- Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012; 486(7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053.
- Zammarchi L, Tappe D, Fortuna C, Remoli ME, Günther S, Venturi G, *et al.* Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil, March 2015. *Euro Surveill.* 2015; 20(23). pii: 21153.
- Zanluca C, de Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(4):569-72. doi: 10.1590/0074-02760150192.
- Zink SD, Van Slyke GA<sup>2</sup>, Palumbo MJ<sup>3</sup>, Kramer LD<sup>4</sup>, Ciota AT. Exposure to West Nile virus increases bacterial diversity and immune gene expression in *Culex pipiens*. *Viruses.* 2015; 7(10):5619-31. doi: 10.3390/v7102886.
- Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr.* 2004; 134(2):465-72.
- Zouache K, Michelland RJ, Failloux AB, Grundmann GL, Mavingui P. Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Mol Ecol.* 2012; 21(9):2297-309. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05526.x.
- Zouache K, Raharimalala FN, Raquin V, Tran-Van V, Raveloson LH, Ravelonandro P, *et al.* Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes*

*aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. FEMS Microbiol Ecol. 2011;  
75(3):377-89.