

LEVEDURAS DO TRATO DIGESTÓRIO DE *Anopheles darlingi* COMO ALTERNATIVA PARA O DESENVOLVIMENTO DE PARATRANSGÊNESE PARA O CONTROLE DA MALÁRIA

Data de aceite: 30/07/2020

Data de submissão: 06/05/2020

Andrelisse Arruda

Fundação Oswaldo Cruz,
Porto Velho – Rondônia

<http://lattes.cnpq.br/2905360231586712>

Antonio dos Santos Júnior

IFRO Porto Velho Calama
Porto Velho – Rondônia

<http://lattes.cnpq.br/1163256313423554>

Gabriel Eduardo Melim Ferreira

Fundação Oswaldo Cruz
Porto Velho – Rondônia

<http://lattes.cnpq.br/5234521391957594>

Juliana Conceição Sobrinho

Faculdades Integradas Aparício Carvalho, FIMCA
Vilhena
Vilhena - Rondônia

<http://lattes.cnpq.br/3295331737232547>

Luiz Shozo Ozaki

Virginia Commonwealth University, CSBC, Life
Sciences
Richmond - Virginia

<http://lattes.cnpq.br/6440720566226268>

Alexandre Almeida e Silva

Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho – Rondônia

<http://lattes.cnpq.br/6440720566226268>

RESUMO: Microrganismos contidos no trato digestório de insetos vem sendo isolados e identificados com o intuito de desenvolver ferramentas biotecnológicas para o controle de doenças transmitidas por esses animais. Nesse contexto, mosquitos *Anopheles* de diferentes partes do globo têm sua microbiota investigada com foco em paratransgênese. No entanto, começa a ser desvendada a informação sobre microrganismos associados aos anofelinos neotropicais, especialmente *Anopheles darlingi*. Relatamos nesse trabalho o isolamento e a identificação de leveduras cultiváveis, com potencial para paratransgênese, isoladas das fezes de *An. darlingi*, o principal vetor da malária no Brasil. As fêmeas de mosquitos *An. darlingi* foram coletadas em localidades rurais de Porto Velho, Rondônia, Brasil. Para favorecer o crescimento de leveduras, fezes dos mosquitos foram coletadas em meio YPD ágar com cloranfenicol e cultivadas à 30°C por 48 horas. Sessenta colônias leveduriformes foram amostradas. Os isolados foram preservados em freezer -80 °C. Foram realizadas PCR utilizando DNA genômico dos isolados com iniciadores para a região do DNA ribossomal 26S e ITS. Das 60 leveduras isoladas, 27 foram

identificadas. Os fragmentos foram sequenciados pelo método Sanger e as sequências com similaridades superiores a 97% frente a sequências disponíveis em bancos de dados foram depositadas no GenBank. As leveduras identificadas pertencem a 9 gêneros: *Candida*, *Diutina*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma* (= *Pichia*), *Moesziomyces*, *Papiliotrema* (= *Cryptococcus*), *Pseudozyma* e *Rhodotorula*. Sugere-se como candidatas à paratransgênese para o controle da malária em *An. darlingi* as leveduras dos gêneros *Meyerozyma* (*Pichia*), *Metschnikowia*, *Hanseniaspora* e *Pseudozyma*.

PALAVRAS-CHAVE: Microbiota de mosquito. Identificação molecular. 26S rRNA. ITS. Amazônia brasileira.

YEASTS FROM THE DIGESTIVE TRACT OF *Anopheles darlingi* AS ALTERNATIVE TO DEVELOP THE PARATRANSGENESIS FOR THE CONTROL OF MALARIA

ABSTRACT: Microorganisms living in insects' digestive tract have been isolated and identified for developing biotechnological tools to fight vector-borne diseases. In this context, mosquitoes *Anopheles* from different regions around the world have been studied about their midgut microbiota focused on paratransgenesis. However, we started to understand the information about microorganisms living in neotropical mosquitoes midgut, specially about *Anopheles darlingi*. The first step for paratransgenesis is to isolate culturable microorganisms naturally associated to the insect vector, and thus amenable to experimentation in laboratory. The objectives of this work were to isolate and to identify culturable yeasts isolated from feces of *Anopheles darlingi*, the main vector of malaria in Brazil; to estimate the frequency distribution of the sampled yeasts and to characterize and to select among the yeasts isolated from feces of *An. darlingi* those with potential for paratransgenesis. The female mosquitoes of *An. darlingi* were captured in two rural places of Porto Velho, Rondônia, Brasil. For improving the yeast growth, mosquito feces were collected on YPD agar medium with chloramphenicol and cultivated at 30 °C for 48 hours. Sixty pure yeast colonies were sampled. The isolates were preserved in -80 °C freezer. PCR reactions with genomic DNA from each isolate were performed using the primers of 26S and ITS for yeasts. From 60 yeast isolates, just 27 samples were identified. The fragments were sequenced with the Sanger method and the sequences with similarities above of 97% with sequences in reference database were deposited in Genbank (NCBI). The identified yeast fall into 9 genera: *Candida*, *Diutina*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma* (= *Pichia*), *Moesziomyces*, *Papiliotrema* (= *Cryptococcus*), *Pseudozyma* and *Rhodotorula*. We suggest as candidates to paratransgenesis to control of malaria in *An. darlingi* those yeasts belonging to the genera *Meyerozyma* (= *Pichia*), *Metschnikowia*, *Hanseniaspora* and *Pseudozyma*.

KEYWORDS: Mosquito microbiota. Molecular identification. 26S rRNA. ITS. Brazilian Amazon.

1 | INTRODUÇÃO

Microrganismos contidos no trato digestório de insetos têm sido isolados e identificados com o intuito de desenvolver ferramentas biotecnológicas para diversas finalidades. Um exemplo é a investigação da microbiota de mosquitos *Anopheles* de diferentes partes do globo com foco em paratransgênese como estratégia para combater a malária (WANG et al., 2017; WANG e JACOBS-LORENA, 2017).

“Paratransgênese” pode ser definida como a modificação genética de microrganismos associados a um invertebrado vetor parasitário para produzir neste moléculas antiparasitárias (RIEHLE; JACOBS-LORENA, 2005; WANG; JACOBS–LORENA, 2013). Tal abordagem é apropriada com relação à malária, visto que o *Plasmodium* se desenvolve no mesmo ambiente em que outros microrganismos estão presentes, i.e., no trato digestório do mosquito vetor. Este compartilhamento ambiental é uma oportunidade para o engenhamento genético de microrganismos, por exemplo leveduras, que podem ser utilizados como uma ferramenta para bloquear o desenvolvimento do parasita no inseto e, em consequência, interromper o ciclo da doença (WANG et al., 2017).

O primeiro passo para a utilização de microrganismos associados a invertebrados transmissores de doenças em paratransgênesis é isolá-los em cultura, uma vez que é imprescindível que o organismo seja passível de cultivo em laboratório para a sua manipulação genética (WANG; JACOBS–LORENA, 2013).

Majoritariamente, bactérias associadas aos mosquitos desse gênero têm sido isoladas (RANI et al., 2009; DJADID et al., 2011; MANGUIN; NGO; TAINCHUM, 2013; VILLEGAS; PIMENTA, 2014; NGO et al., 2015; CHEN; BLOM; WALKER, 2017) e informações sobre microrganismos em anofelinos neotropicais começaram a ser desvendadas (TERENIUS et al., 2008; ARRUDA et al., 2017; ARRUDA, 2017; CORREA, 2019; SERRÃO, 2019; ROCHA, 2020).

Estudos relacionados a fungos em *Anopheles* são relatados, com sugestões de leveduras com potencial à paratransgênese (RICCI et al. 2011a; RICCI et al. 2011b; ARRUDA, 2017), leveduras com importância clínica disseminadas por mosquitos (BOZIC et al., 2017), ou ainda sobre a utilização de fungos como controle simbiótico para bloquear a transmissão de malária (CAPPELLI et al, 2014; CAPPELLI et al, 2019; CECARINI et al 2019; HERREN et al., 2020).

Para a pesquisa aqui relatada, consideramos que o conteúdo fecal ao passar pelo trato digestório carrega consigo microrganismos que estavam presentes nesse trânsito, e refletem, ao menos em parte, a diversidade da microbiota associada ao trato digestório desses insetos. Assim, a coleta de microrganismos a partir das fezes dos anofelinos é uma estratégia que facilita a investigação da microbiota que coexiste no trato digestório (ARRUDA et al., 2017) (Figura 1).

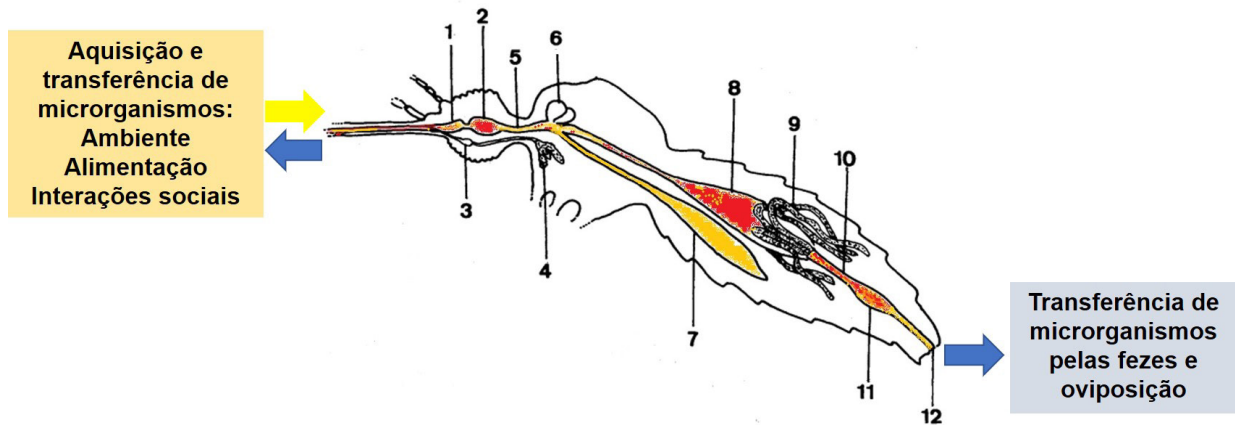


Figura 1 - Fluxo da microbiota no sistema digestório de mosquitos adultos

1: Bomba cibarial; 2: Bomba faringiana; 3: Bomba salivar; 4: Glândula salivar; 5: Esôfago; 6: Divertículos doesais; 7: Divertículo ventral; 8: Estômago ou intestino médio; 9: Tubos de Malpighi; 10: Íleo/cólon; 11: Reto; 12: Ânus. Adaptado de Consoli e Oliveira (1994) e Engel e Moran 2013.

O objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar leveduras cultiváveis das fezes de mosquito *Anopheles darlingi* para utilizá-las no controle da malária na Amazônia brasileira através de paratransgênesis.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

As fêmeas de mosquitos *An. darlingi* foram coletadas em área rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil. As leveduras foram isoladas de fezes dos mosquitos pelo método descrito em Arruda et al. (2017), modificado para o meio de cultura YPD ágar com 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol. O dispositivo utilizado para a coleta de fezes de mosquitos pode ser visualizado na figura 2. Após a coleta das fezes por 24 horas, as placas contendo o meio de cultura seletivo com as fezes foram incubadas à temperatura de 30° C por 48 horas para favorecer o crescimento de leveduras.

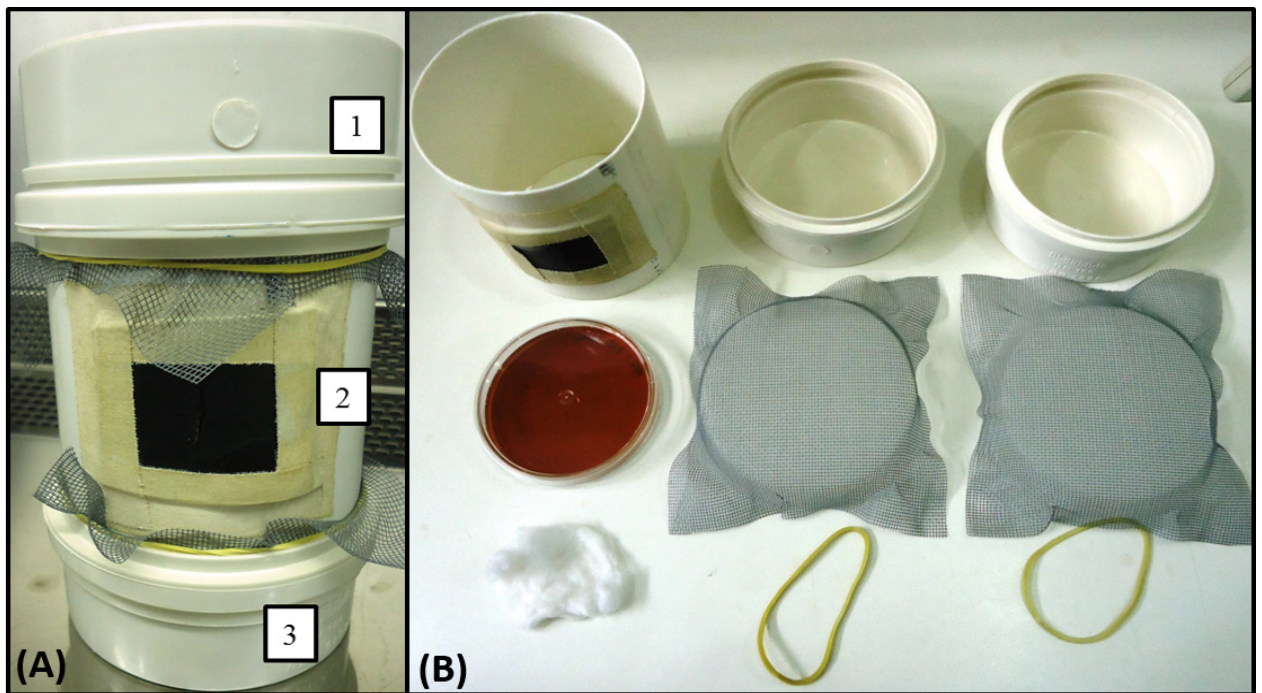


Figura 2- Dispositivo para coleta de fezes de mosquitos

(A) Vista frontal do dispositivo montado. 1. Compartimento superior para o fornecimento de alimentos; 2. Compartimento intermediário para conter mosquitos; 3. Compartimento inferior para coleta de fezes de mosquito. (B) Vista superior do dispositivo desmontado. Fonte: ARRUDA et al., (2017).

Em seguida, sessenta colônias de leveduras foram amostradas e isoladas para culturas puras e, então, cultivadas à temperatura de 30° C por 48 horas em meio de cultura YPD ágar com 34 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol, e então preservadas em glicerol a 30% em freezer a -80 °C.

As leveduras isoladas foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando o protocolo de FERRER et al. (2001) e foram identificadas por sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados por PCR das regiões gênicas D1/D2 do RNA 26S e ITS ribossomais (FERREIRA et al., 2010).

Das 60 colônias leveduriformes foram amplificados com sucesso fragmentos de DNA ribossomal de 27 isolados. Os fragmentos amplificados foram purificados e sequenciados pelo método Sanger. As sequências com similaridades superiores a 97% frente a sequências disponíveis em bancos de dados e que apresentaram agrupamentos filogenéticos com *bootstrap* acima de 90% quando realizadas 1000 aleatorizações, foram utilizadas para as identificações, sendo estas depositadas no GenBank.

Os critérios para a seleção das leveduras identificadas e com potencial para a realização de paratransgênese, adotados de acordo com Wang e Jacobs–Lorena (2013) e Wilke e Marelli (2015), foram os seguintes: 1) leveduras consideradas como não-patogênicas a humanos e animais e 2) com possibilidade de serem cultivadas e manipuladas geneticamente.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificadas 14 espécies de leveduras dentre os 27 isolados submetidos à identificação pelo método ribossomal (Tabela 1). As mais frequentes foram *Moesziomyces antarcticus*, *Candida metapsilosis* e *Meyerozyma caribbica* (Figura 3). No entanto, é importante destacar que foram triadas menos de 50% das amostras coletadas (N=60), fato ocorrido pela ausência da amplificação nas reações de PCR de algumas amostras. Portanto, é razoável esperar o registro de outras espécies conforme o processo de identificação avançar.

Filo/ Classe/ Família	Amostra n°	Espécie identificada	26S			ITS		
			Acesso da sequência 26S no GenBank*	Similaridade %	Código de acesso do táxon mais relacionado	Acesso da sequência ITS no GenBank*	Similaridade %	Código de acesso do táxon mais relacionado
ASCOMYCOTA								
Saccharomycetes								
Debaryomycetaceae								
	24	<i>Candida metapsilosis</i>	MF940152	99,8	KY106574.1	MF940118	98,8	FJ872019 ^a
	29	<i>Candida metapsilosis</i>	MF940154	99,8	KY106574.1	MF940120	98,9	FJ872019 ^a
	36	<i>Candida metapsilosis</i>	MF940158	99,8	KY106574.1	MF940124	98,95	FJ872019 ^a
	55	<i>Candida metapsilosis</i>	MF940166	99,8	KY106574.1	MF940131	100	KY102208
	35	<i>Candida orthopsilosis</i>	MF940157	100	FN812686.1	MF940123	100	FM178394
	23	<i>Candida parapsilosis</i>	MF940151	100	KT282393.1	MF940117	100	AY391843
	49	<i>Candida oleophila</i>	MF940163	100	U45793.1	MF940128	100	HQ876045
	38	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> = <i>Pichia guilliermondii</i>	MF940159	100	JQ689047.1	MF940125	100	KC119205
	28	<i>Meyerozyma caribbica</i> = <i>Pichia caribbica</i>	MF940153	100	NG 054806.1	MF940119	100	FN428931
	30	<i>Meyerozyma caribbica</i> = <i>Pichia caribbica</i>	MF940155	100	NG 054806.1	MF940121	100	FN428931
	33	<i>Meyerozyma caribbica</i> = <i>Pichia caribbica</i>	MF940156	100	NG 054806.1	MF940122	100	FN428931
	59	<i>Diutina catenulata</i> = <i>Candida catenulata</i>	MF940170	100	CBS 564	MF940135	100	AY493436

Metschnikowiaceae	42**	<i>Metschnikowia koreensis</i>	MF940160	100	KF059236.1	MF940126	96,3	KF059236
	48**	<i>Metschnikowia koreensis</i>	MF940162	100	KF059236.1	MF940127	97,33	KF059236
Saccharomycodaceae	57	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	MF940167	100	KC111447.1	MF940132	100	FM199951
	60	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	MF940171	99,8	KC111447.1	MF940136	100	FM199951
BASIDIOMYCOTA								
Microbotryomycetes								
Sporidiobolaceae	58	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MF940168	100	KF411551.1	MF940133	100	KP132585.1
Tremellomycetes								
Tremellaceae	51	<i>Papiliotrema laurentii</i> = <i>Cryptococcus laurentii</i>	MF940169	100	AY315663.1	MF940134	100	FN428903
Ustilaginomycetes								
Ustilaginaceae	8	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	MF940145	99,8	AJ235302.1	MF940111	97,11	AY641557
	12	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	MF940148	99,8	AJ235302.1	MF940114	97,17	AY641557
	13	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	MF940149	99,8	AJ235302.1	MF940115	97,19	AY641557
	14	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	MF940150	99,8	AJ235302.1	MF940116	97,25	AY641557
	46***	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	MF940161	99	AJ235302.1	–	–	–
	9	<i>Pseudozyma parantarctica</i>	MF940146	100	AB089357.1	MF940112	99,86	JN942671
	10	<i>Pseudozyma parantarctica</i>	MF940147	100	AB089357.1	MF940113	99,7	JN942671
	50	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	MF940164	99,8	KY108956.1	MF940129	97,65	DQ008954
	53	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	MF940165	99,8	KY108956.1	MF940130	97,65	DQ008954

Tabela 1- Leveduras identificadas utilizando sequência D1/D2 do 26S rRNA e ITS. As leveduras foram isoladas a partir das fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* selvagens oriundas de Porto Velho, RO.

*Estes números de acesso do GenBank somente estarão disponíveis após 30 de setembro de 2018 ou após a publicação do artigo contendo esta informação, o que vier primeiro. Amostras que não amplificaram: 1, 4, 5, 7, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 31, 32, 34, 37, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 47, 52, 54 e 56. Amostras que não possuem DNA: 2, 3, 6 e 11. **árvore pata ITS separada. ***Não amplificou para ITS. ^a – A sequência FJ872019 não está representada na árvore filogenética construída com sequências ITS por não haver agrupamento dessa sequência com o clado das leveduras 24, 29 e 36. Fonte: ARRUDA, 2017.

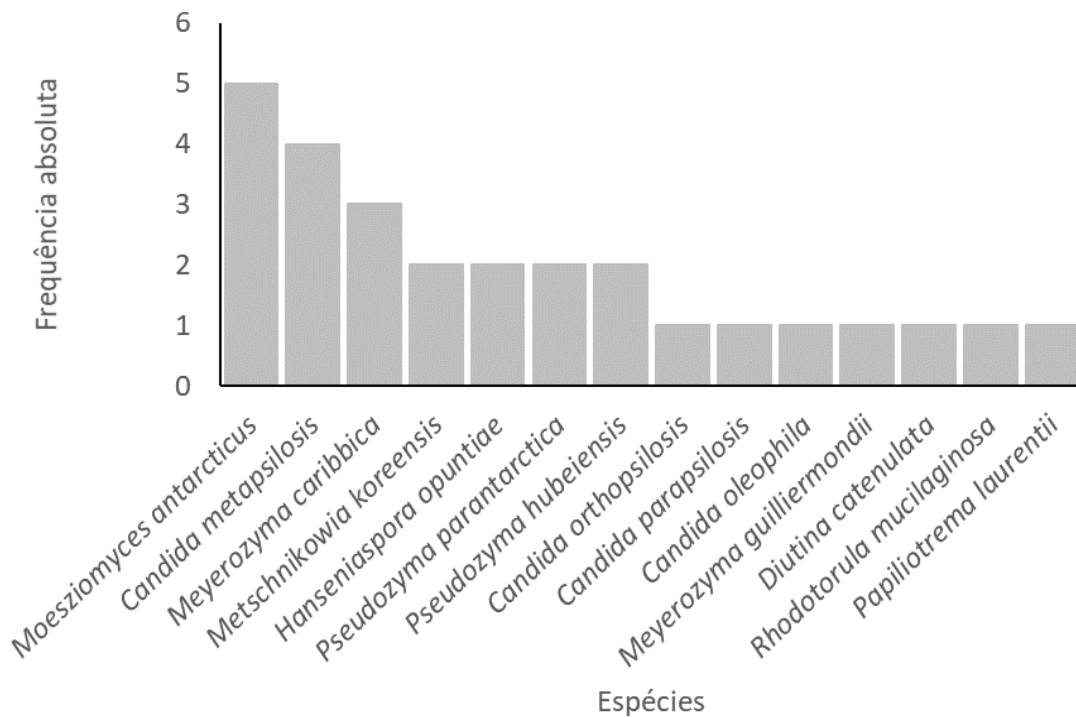


Figura 3 - Distribuição de frequência das espécies de leveduras coletadas em fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* coletadas em de Porto Velho, RO. Conjunto de colônias amostradas (N=60). Fonte: ARRUDA, 2017.

Conhecer os microrganismos contido nas fezes dos anofelinos é uma estratégia que pode facilitar a investigação da microbiota que passou pelo intestino e cinco espécies são sugeridas como candidatas à paratransgênese: *M. caribbica*, *Metschnikowia koreensis*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida oleophila* e *Pseudozyma hubeiensis*, por serem leveduras conhecidamente associadas a néctar e frutos (MORAIS et al., 1995; MORAIS et al., 2006) e não serem consideradas fungos de importância médica (ANVISA, 2013).

Além disso, a existência de plataformas comerciais para expressão heteróloga, as quais utilizam vetores integrativos que tem como alvo regiões de genes homólogos, altamente conservadas, como *locus* de genes da via glicolítica (INVITROGEN, 2010), os quais poderiam ser utilizados como vetores de expressão em outras espécies de leveduras, como aquelas indetificadas neste trabalho.

A utilização de leveduras para o uso em paratransgênese em *Anopheles* apresenta como principal vantagem o fato de ser um eucarioto, podendo facilitar a expressão e secreção de peptídeos heterólogos que podem ser alvos ou competidores por sítios de reconhecimento celular dentro do intestino do mosquito (RICCI et al., 2011a, 2011b). Estes peptídeos, expressos dentro do intestino do mosquito, serviriam para impedir a passagem do oocineto de *Plasmodium* pela parede do intestino do mosquito *Anopheles* interrompendo a formação de oocistos, sendo assim, úteis no controle da transmissão da malária (WANG; JACOBS–LORENA, 2013; WANG et al., 2017).

É válido destacar que das leveduras isoladas a partir das fezes de *An. darlingi* seis

espécies foram descritas anteriormente com potencial biotecnológico: *Moesziomyces parantarcticus* e *Pseudozyma hubeiensis* foram investigadas para produção de biodiesel (AREESIRISUK et al, 2015; ROSA et al., 2015) *Hanseniaspora opuntiae* foi utilizada na produção de chocolates (PAPALEXANDRATOU et al., 2013) *Metschnikowia koreensis*, *Meyerozyma caribbica* e *Meyerozyma guilliermondii* são fermentadoras de xilose (MARTINS et al., 2018; MUKHERJI et al., 2013). Como estão isoladas e preservadas, estas podem ser exploradas em diferentes processos biotecnológicos, de paratransgêneses até utilizações industriais para produção de alimentos e biocombustíveis (Figura 4).

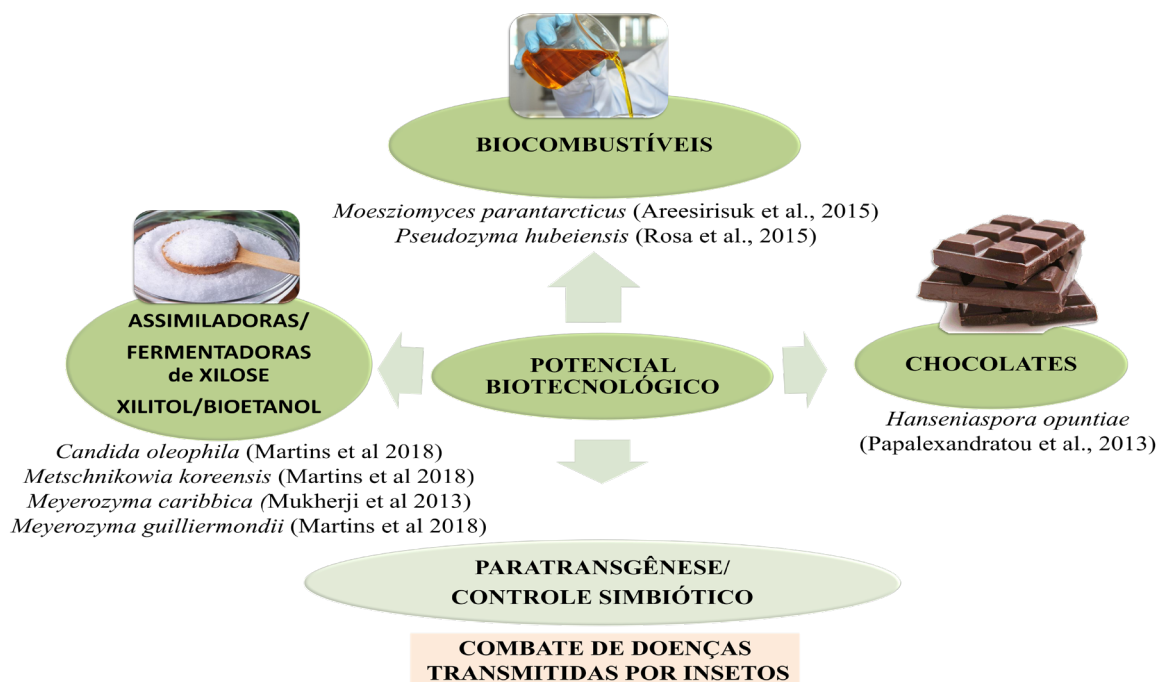


Figura 4 – Potencial biotecnológico de leveduras isoladas a partir das fezes de *Anopheles darlingi*.

Fonte: O autor (2019).

Acreditamos que a biodiversidade de microrganismos associadas a insetos deva ser investigada, pois nela contém tanto espécies com potencial biotecnológico como as aqui apresentadas, quanto microrganismos de importância para a saúde pública, não relatadas nesta comunicação (*dados não mostrados*).

4 | CONCLUSÕES

O isolamento das leveduras, descritas neste trabalho, permitiu realizarmos o primeiro passo rumo à execução de paratransgênese em leveduras para o controle da transmissão

da malária pelo mosquito *An. darlingi* na Amazônia brasileira.

Foram isoladas e preservadas 14 espécies de leveduras, das quais foram sugeridas como potenciais candidatas à paratransgênese *M. caribbica*, *M. koreensis*, *H. opuntiae*, *C. oleophila* e *P. hubeiensis*. Estudos complementares devem ser realizados para o pleno desenvolvimento da técnica.

APOIO

CNPq, CAPES, IFRO Porto Velho Calama/ProfEPT, Fiotec, Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz, subunidades RPT01E - Sequenciamento de DNA – BH. Inicialmente, este projeto teve também um apoio “Grande Challenges” da Bill and Melinda Gates a L.S.O.

REFERÊNCIAS

- AREESIRISUK, A. *et al.* A novel oleaginous yeast strain with high lipid productivity and its application to alternative biodiesel production. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 51, n. 4, p. 387–94, 2015.
- ARRUDA, A. *et al.* A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Microbiological Methods**, v. 141, n. Oct. 2017, p. 115–117, 2017.
- ARRUDA, A. (2017). **Identificação de microrganismos cultiváveis associados ao intestino de *Anopheles darlingi* (DIPTERA:CULICIDAE) com potencial à paratransgênese para o controle da malária**. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas. 170 f.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: **Deteção e identificação de fungos de importância médica** /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013. 46p.
- BOZIC, J. *et al.* Mosquitoes can harbour yeasts of clinical significance and contribute to their environmental dissemination. **Environmental Microbiology Reports**, 9(5), 642–648. doi:10.1111/1758-2229.12569, 2017.
- CAPPELLI, A. *et al.* A *Wickerhamomyces anomalus* Killer Strain in the Malaria Vector *Anopheles stephensi*. **PLoS ONE**, 9(5), e95988. doi:10.1371/journal.pone.0095988, 2014.
- CAPPELLI, A. *et al.* Killer yeasts exert anti-plasmodial activities against the malaria parasite *Plasmodium berghei* in the vector mosquito *Anopheles stephensi* and in mice. **Parasites & Vectors**, 12(1). doi:10.1186/s13071-019-3587-4, 2019.
- CECARINI, V. *et al.* Identification of a Killer Toxin from *Wickerhamomyces anomalus* with β -Glucanase Activity. **Toxins**, 11(10), 568. doi:10.3390/toxins11100568, 2019.
- CHEN, S.; BLOM, J.; WALKER, E. D. Genomic, physiologic, and symbiotic characterization of *Serratia marcescens* strains isolated from the mosquito *Anopheles stephensi*. **Frontiers in Microbiology**, 2017.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.

CORREA, L.V. (2019). **Estudo do potencial paratransgênico de bactérias cultiváveis associadas ao *Anopheles darlingi* ROOT, 1926, para controle da malária. Dissertação.** (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia). Universidade do Estado do Amazonas. 93f.

DJADID, D. N. *et al.* Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *C. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 6–12, 2011.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699–735, 2013.

FERRER, C. *et al.* Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. **J Clin Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.

FERREIRA, N. *et al.* Yeast microflora isolated from Brazilian cassava roots: Taxonomical classification based on molecular identification. **Current Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 287–293, 2010.

HERREN, J. K. *et al.* A microsporidian impairs *Plasmodium falciparum* transmission in *Anopheles arabiensis* mosquitoes. **Nature Communications**, 11(1). doi:10.1038/s41467-020-16121-y, 2020.

INVITROGEN. pGAPZ A, B, and C, pGAPZα A, B, and C: **Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins.** MAN0000043. User Manual. 2010.

MANGUIN, S.; NGO, C.; TAINCHUM, K. Bacterial Biodiversity in Midguts of Anopheles Mosquitoes, Malaria Vectors in Southeast Asia. **Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors and**, 2013.

MARTINS, G.M. *et al.* The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**. V. 49, 1. P. 162-168. 2018.

MORAIS, P. B. *et al.* Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 12, p. 4251–7, dez. 1995.

MORAIS, P. B.; PAGNOCCA, F.; ROSA, C. Yeast Communities in Tropical Rain Forests in Brazil and other South American Ecosystems. In: ROSA, C.; GÁBOR, P. (Eds.). **The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts.** Springer, 2006.

MUKHERJI, R. *et al.* A Crystalline Xylitol Production by a Novel Yeast, *Pichia caribbica* (HQ222812), and Its Application for Quorum Sensing Inhibition in Gram-Negative Marker Strain *Chromobacterium violaceum* CV026. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 6, p. 1753–1763, 2013.

NGO, C. T. *et al.* Bacterial diversity associated with wild caught Anopheles mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam using culture and DNA fingerprint. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2015.

PAPALEXANDRATOU, Z. *et al.* *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. **Food Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 73–85, set. 2013.

RANI, A. *et al.* 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 microbiology**, v. 9, p. 96, 2009.

RICCI, I. *et al.* Different mosquito species host *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*): Perspectives on vector-borne diseases symbiotic control. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 43–50, 2011a.

RICCI, I. *et al.* The yeast *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) inhabits the midgut and reproductive system of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 911–921, 2011b.

RIEHLE M.A.; JACOBS-LORENA, M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. **Insect Biochem Mol Biol** 35:699–707, 2005.

ROCHA, E.M. (2020). **Seleção de espécies bacterianas cultiváveis, simbiotes de *Anopheles darlingi* (Root, 1926), para o controle da malária por paratransgênese.** Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas. 90 f.

ROSA, S. A. **Produção de lipase de *Pseudozyma hubeiensis* e aplicação na biocatalise de biodiesel.** 2015.

SERRÃO, D. M. (2019) **Bioprospecção de bactérias cultiváveis isoladas de *Anopheles darlingi* ROOT, 1926 para o controle da malária por paratransgênese.** Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia). Universidade do Estado do Amazonas. 84f.

TERENIUS, O. *et al.* 16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **J Med Entomol**, v. 45, n. 1, p. 172–175, 2008.

VILLEGAS, L. M.; PIMENTA, P. F. P. Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 672–684, 2014.

WANG, S.; JACOBS-LORENA, M. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 185–193, 2013.

WANG, S.; & JACOBS-LORENA, M. (2017). Paratransgenesis Applications: Fighting Malaria With Engineered Mosquito Symbiotic Bacteria. In **Vector Microbiome and Innate Immunity of Arthropods** (Vol. 1, pp. 219–234). Elsevier Inc.. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805350-8.00013-1>

WANG, S. *et al.* Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. **Science**. Vol. 357, Issue 6358, pp. 1399-1402, 2017.

WILKE, A.B.B.; MARRELLI, M. T. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 342, 2015.