

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES - IAM
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

GABRIEL GAZZONI ARAÚJO GONÇALVES

IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* E *Culex quinquefasciatus*, E SUA INFLUÊNCIA TANTO NA DINÂMICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE (SOROTIPO 1) QUANTO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE DEFENSINA A E CECROPINA A

RECIFE

2019

GABRIEL GAZZONI ARAÚJO GONÇALVES

IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* E *Culex quinquefasciatus*, E SUA INFLUÊNCIA TANTO NA DINÂMICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE (SOROTIPO 1) QUANTO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE DEFENSINA A E CECROPINA A

Tese apresentada ao doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como partes dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientadores: Dr. Luiz Carlos Alves

Dr. Fábio André Brayner dos Santos

RECIFE

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

G638i Gonçalves, Gabriel Gazzoni Araújo.

Identificação da microbiota de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*, e sua influência tanto na dinâmica da infecção pelo vírus da dengue (sorotipo 1) quanto na expressão gênica de defensina A e cecropina A. 2019. – Recife: [s.n.], 2019.

87 p. : ilus., tab.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

Orientadores: Luiz Carlos Alves, Fábio André Brayner dos Santos.

1. *Aedes*. 2. *Culex*. 3. Microbiota. 4. Peptídeos. 5. Dengue. I. Alves, Luiz Carlos Alves. II. Santos, Fábio André Brayner dos. III. Título.

CDU 578

GABRIEL GAZZONI ARAÚJO GONÇALVES

IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* E *Culex quinquefasciatus*, E SUA INFLUÊNCIA TANTO NA DINÂMICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE (SOROTIPO 1) QUANTO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE DEFENSINA A E CECROPINA A

Tese apresentada ao doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como partes dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências.

Data de aprovação: 30/09/2019

Banca examinadora

Dr. Luiz Carlos Alves
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr(a) Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Lindomar José Pena
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Fabrício Oliveira Souto
Universidade Federal de Pernambuco

Dr(a) Danyelly Brunaska Gondim Martins
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico a meus avôs e avós, por sempre serem sinônimo de luta e perseverança nas
dificuldades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre trilhar meu caminho;

À Nossa Senhora do Carmo, por conceder bençãos maravilhosas;

Aos meus pais, Almir e Socorro, que sempre serão minha base e referência para a vida. Um casal que sempre lutou para educar e dar saúde aos seus filhos e definitivamente são meus dois pilares para que eu possa espelhar a futura geração da família, todo o amor e dedicação que eles tiveram por mim e meus irmãos;

Aos meus irmãos Giulliano e Guilherme que sempre estiveram ao meu lado independente de qualquer atitude ou escolhas tomadas e a todos os anos de brincadeiras e brigas, valeu a pena cada momento;

À minha noiva Amanda, por ser a maior incentivadora dessa jornada sempre estando ao meu lado na alegria e na tristeza, na saúde e na doença; Mamãe mais linda do mundo;

Ao meu filho(a) que desde já amo muito e foi uma benção para me manter forte;

Aos meus orientadores: Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio Brayner que foram, são e sempre serão essenciais para o crescimento como estudante e pessoa, e por aguentar e ajudar durante os baixos e comemorar os altos da minha vida no decorrer desses nove anos juntos;

Ao diretor do LIKA, Dr. José Luiz de Lima Filho, pelo apoio técnico e científico dado ao longo da graduação, mestrado, doutorado e o suporte para que possa desenvolver minhas atividades como técnico do Laboratório de Microscopia Eletrônica-LIKA;

A todos companheiros e companheiras do LBCM e LME-LIKA: Carmel, Ana Paula, Dyana, Alberon, Nairomberg, Rafael Padilha, Jana Sandes, Anderson, Olavo Doidão, Fernanda, Catarina, Alana, Paulinha, Camila, Iany, Daivyane, Thayanara, Taína, Janderson, Jorge e Rubens; pela ajuda durante o doutorado e as alegrias compartilhadas. Menção honrosa a Victor Master Yi, sem ele não seria GG IZI;

A todos amigos e amigas que fiz no CDC/Atlanta-USA em especial ao Dr. Sherif, Dr. Shieh, Dra. Roose, Dra. Luciana, Rebecca, Brooke e Lindsey, onde fui recebido da melhor maneira possível e pude ter uma experiência única;

Aos amigos do IAM: Balbino, Rayana, Viviane, Rubia, Beatriz, Renata e Camila Best e amigos do LIKA: Verinha, Edson e Rafaela, pelas ótimas conversas e companhia ao longo dessa jornada;

Às meninas do Insetário Ana e Elisângela, pelo apoio e ajuda na realização desse trabalho;

A todos os meus amigos da graduação e pós-graduação e da vida, por todos os momentos de descontração e apoio que foram essenciais;

Ao Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ e Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, pela estrutura e oportunidades de crescimento profissional e pessoal;

À CAPES e FACEPE, pelo incentivo financeiro e suporte para o desenvolvimento da pesquisa.

“A força não vem de vitórias. Suas lutas que desenvolvem sua força. Quando você passar por dificuldades e decidir não se render, isso é força.”

Arnold Schwarzenegger

GONÇALVES, Gabriel Gazzoni Araújo. **Identificação da microbiota de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*, e sua influência tanto na dinâmica da infecção pelo vírus da dengue (sorotipo 1) quanto na expressão gênica de defensina A e cecropina A.** 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

Mosquitos do gênero *Aedes* podem transmitir patógenos que causam sérios problemas de saúde pública, dentre esses, o vírus da dengue. *Aedes aegypti* é a única espécie descrita como vetor do vírus da dengue no Brasil e apesar do *Culex quinquefasciatus* ser muito comum no território brasileiro, não é considerada vetor para esse vírus. *Aedes albopictus* mesmo sendo vetor para o vírus da dengue em território asiático, não está relacionado com a transmissão desse vírus no Brasil em condições naturais. Logo, é de grande importância buscar o entendimento na variação da eficiência vetorial nas diferentes espécies coabitando o mesmo espaço. Dessa forma, avaliamos a microbiota das espécies *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de laboratório e silvestres, analisando a influência do tratamento com antibióticos na evolução viral do vírus da dengue e na expressão dos peptídeos antimicrobianos defensina A e cecropina A. Assim, foram identificadas as microbiotas através do MALDI-TOF e foi analisado também: a taxa de infecção (TI), a taxa de disseminação da infecção (TDI) e o potencial de transmissão viral (PTV) de mosquitos infectados com vírus da dengue (sorotipo I) tratados e não tratados com antibióticos: gentamicina, penicilina e estreptomicina. Na microbiota foi identificada uma grande diversidade bacteriana nas três espécies de mosquitos analisadas e que o meio ambiente é importante na aquisição de bactérias pelos mosquitos estudados, principalmente em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. Na dinâmica da infecção por DENV-1, em *Cx. quinquefasciatus*, não foi detectado a presença do vírus da dengue tanto para o grupo tratado quanto para não tratado com antibióticos. Analisando *Ae. aegypti*, foi observado que os mosquitos tratados com antibióticos obtiveram uma melhora na TI e TDI. Os resultados em relação a expressão de defensina A e cecropina A mostram que o tratamento tanto de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* com antibióticos, reduz a expressão gênica de Def-A e Cec-A.

Palavras-chave: *Aedes*. *Culex*. Microbiota. Peptídeos. Dengue.

GONÇALVES, Gabriel Gazzoni Araújo. **Identification of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* microbiota, and their influence on the dynamics of Dengue virus infection (serotype 1) and on the genic expression of defensin A and cecropin A.** 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

Mosquitoes of the genus *Aedes* can transmit pathogens that cause serious public health problems, including the Dengue virus. *Aedes aegypti* is the only species described as a Dengue virus vector in Brazil and although *Culex quinquefasciatus* is very common in Brazil, it is not considered a vector for this virus. *Aedes albopictus* even being a vector for dengue virus in Asian territory, is not related to the transmission of this virus in Brazil under natural conditions. Therefore, it is of great importance to seek understanding in the variation of vector efficiency in different species cohabiting the same space. Thus, we evaluated the microbiota of *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* species from laboratory and wild species, analyzing the influence of antibiotic treatment on the viral evolution of dengue virus and the expression of defensin A and cecropin A antimicrobial peptides. The microbiota was identified by MALDI-TOF and the following were also analyzed: infection rate (IT), infection spread rate (ISR) and viral transmission potential (VTP) of dengue virus-infected mosquitoes (serotype I) treated and untreated with antibiotics: gentamicin, penicillin, and streptomycin. In the microbiota, a large bacterial diversity was identified in the three mosquito species analyzed and the environment is important in the acquisition of bacteria by the mosquitoes studied, especially in *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*. In the dynamics of DENV-1 infection in *Cx. quinquefasciatus*, the presence of Dengue virus was not detected for both treated and untreated groups with antibiotics. Analyzing *Ae. aegypti*, it was observed that antibiotic-treated mosquitoes had improved IR and ISR. Results regarding the expression of defensin A and cecropin A show that treatment of both *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* with antibiotics reduces the gene expression of Def-A and Cec-A.

Keywords: *Aedes*. *Culex*. Microbiota. Peptides. Dengue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Aedes aegypti</i> .	21
Figura 2 - <i>Aedes albopictus</i> .	22
Figura 3 - <i>Cx. quinquefasciatus</i> .	23
Figura 4 - Representação esquemática das barreiras físicas e fisiológicas sobre a infecção em mosquitos.	24
Figura 5 – Imunidade antiviral no intestino médio de mosquitos.	27
Figura 6 – Áreas de risco da Dengue.	31
Figura 7 - Representação do sistema <i>Glytube</i> .	44
Quadro 1 - Sequência dos primers utilizados para quantificação de Defensina A e Cecropina A em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .	47
Quadro 2 - Sequência dos primers utilizados para quantificação de Defensina A e Cecropina A em fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	47
Quadro 3 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de <i>Culex quinquefasciatus</i> de laboratório considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.	52
Quadro 4 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de <i>Culex quinquefasciatus</i> silvestres considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.	53
Quadro 5 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de <i>Aedes aegypti</i> de laboratório considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.	54
Quadro 6 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de <i>Aedes aegypti</i> silvestre considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.	55
Quadro 7 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de <i>Aedes albopictus</i> de laboratório considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.	56
Quadro 8 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de <i>Aedes albopictus</i> silvestre considerando os scores padrão do desenvolvedor do	

software.	57
Quadro 9 - Resumo da identificação bacteriana associada as espécies de mosquitos estudadas.	58
Figura 8 – Comparação entre os gêneros bacterianos encontrados nos mosquitos de laboratório.	59
Figura 9 – Comparação entre os gêneros bacterianos encontrados nos mosquitos silvestres.	60
Figura 10 - Expressão diferencial de Def-A e Cec-A em <i>Ae. aegypti</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> tratados com antibióticos.	61
Figura 11 - Expressão diferencial de Def-A e Cec-A em <i>Ae. aegypti</i> tratados com antibióticos e infectados com DENV-1.	62
Figura 12 - Expressão diferencial de Def-A e Cec-A em <i>Cx. quinquefasciatus</i> tratados com antibióticos e infectados com DENV-1.	62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Percentual de inibição de bactérias do intestino médio por tratamento antibiótico (gentamicina 100 µg/µL; penicilina 100 U/µL e estreptomicina 100 µg/µL) em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*. **60**
- Tabela 2** - Estimativa da taxa de infecção (TI), taxa de disseminação (TDI) e potencial de transmissão viral (PTV) causada pelo DENV-1 em *Ae. aegypti* tratados e não tratados com antibióticos. **64**
- Tabela 3** - Estimativa da taxa de infecção (TI), taxa de disseminação (TDI) e potencial de transmissão viral (PTV) causada pelo DENV-1 em *Ae. aegypti* tratados e não tratados com antibióticos. **65**

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AMPs – Peptídeos antimicrobianos

AS – Ágar Sangue

BHA – Brain Heart Agar

Cec-A – Cecropina A

Def-A – Defensina A

DENV – Vírus da Denguedengue

DPI – Dias Pós Infecção

IMD – Immune deficiency

JAK-STAT – Janus kinases-signal transducer and activator of transcription protein

MALDI-TOF MS - Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

pb – pares de base

PBS – Phosphate Buffer Saline

PI – Potencial de inibição

PTV – Potencial de transmissão viral

RPM – Rotação por minuto

TDI – Taxa de disseminação da infecção

TI – Taxa de infecção

UFC – Unidade formadora de colnia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	19
2.1 Culicídeos	19
2.1.1 <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	20
2.1.2 <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894)	21
2.1.3 <i>Culex quinquefasciatus</i> (Say, 1823)	22
2.2 Sistema imune dos insetos	23
2.2.1 Barreiras físicas	25
2.2.2 Barreiras imunológicas	26
2.2.2.1 <u>Peptídeos antimicrobianos (AMPs)</u>	27
2.3 Microbiota	29
2.4 Dengue	31
3 PERGUNTAS CONDUTORAS	35
4 JUSTIFICATIVA	36
5 HIPÓTESES	37
6 OBJETIVO GERAL	38
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	39
7.1 Mosquitos de laboratório	39
7.2 Mosquitos Silvestres	39
7.3 Identificação da microbiota	39
7.3.1 Dissecção do intestino médio	40
7.3.2 Isolamento da microbiota do intestino médio	40
7.3.3 Preparação e identificação da microbiota por MALDI-TOF MS	40
7.4 Dinâmica viral nos mosquitos tratados e não tratados com antibióticos	41
7.4.1 Tratamento com antibióticos	41
7.4.2 Potencial de inibição do tratamento com antibióticos	42
7.4.3 Cepa do DENV-1 e sua titulação	42
7.4.4 Infecção artificial com DENV-1	43
7.4.5 Extração do RNA Total	45

7.4.6 Análise da taxa de infecção, disseminação e potencial de transmissão do DENV-1	46
7.5 Avaliação da expressão de Defensina A e Cecropina A	46
7.5.1 Análises de dados	49
8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	50
9 RESULTADOS	51
9.1. Microbiota de <i>Cx. quinquefasciatus</i> (laboratório e silvestre)	51
9.2. Microbiota de <i>Ae. aegypti</i> (laboratório e silvestre)	53
9.3. Microbiota de <i>Ae. albopictus</i> (laboratório e silvestre)	55
9.4. Resumo da identificação bacteriana	57
9.5 Percentual de inibição bacteriano do tratamento com antibióticos	60
9.6 Expressão da Defensina A e Cecropina A em mosquitos não infectados	61
9.7 Expressão da Defensina A e Cecropina A em mosquitos infectados	61
9.8 Influência da microbiota na competência vetorial para DENV-1	63
10 DISCUSSÃO	66
11 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ACTA TROPICA	80
APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO A ACTA TROPICA 24/05/19 - ACTROP_2019_658	86

1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos são responsáveis por transmitir patógenos causadores de doenças que acarretam altos níveis de mortalidade, morbidade e perdas econômicas em todo o mundo, estimados em 17% da carga global de doenças transmissíveis (MOLOO, 2017). Os gêneros *Aedes* e *Culex* são dois dos principais vetores de importância médica no mundo havendo assim, uma necessidade urgente de controlá-los. Patógenos, como o vírus da dengue, Chikungunya vírus e Zika vírus, são arbovírus que causam sérios problemas à saúde pública e são transmitidos por espécies de mosquitos (MOLOO, 2017; SALDAÑA; HEGDE; HUGHES, 2017; TANDINA et al., 2016). As espécies *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* estão envolvidos na transmissão desses três tipos de vírus (GOULD et al., 2017; GUZZETTA et al., 2016). Recentemente o *Culex quinquefasciatus* foi associado à transmissão do vírus da Zika (GUEDES et al., 2017). Devido a isto, estas espécies foram avaliadas também neste estudo, além de outras características biológicas como: coabitar os mesmos espaços, à sua antropofilia, seus hábitos urbano-domésticos (domiciliares) dentre outros.

O intestino médio dos mosquitos é a primeira barreira tecidual que os patógenos precisam passar para completar seu ciclo de vida (FRANZ et al., 2015). Esse tecido tem sido utilizado em muitos estudos com foco na microbiota, uma vez que nos fornece detalhes sobre a diversidade microbiana e uma potencial influência na competência vetorial do mosquito (MUTURI et al., 2017; TANDINA et al., 2016; YADAV et al., 2015). Alguns estudos demonstraram que a influência da microbiota no *Aedes aegypti* afetou a suscetibilidade à infecção pelo sorotipo 2 (PAN et al., 2012; RAMIREZ et al., 2012; XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008) e sorotipo 3 do vírus da dengue (YE et al., 2015). Além disso, um estudo envolvendo a identificação da microbiota de diferentes espécies de mosquitos em laboratório e em campo mostra-se de grande importância na adição de novas informações sobre a influência das condições ambientais na microbiota.

Existem muitas técnicas para identificação de bactérias, mas a espectrometria com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI TOF MS) mostrou-se uma técnica alternativa e emergente para a identificação de microrganismos, já que esta técnica é rápida, os custos são

baixos e é possível a identificação confiável de espécies bacterianas (FALL et al., 2015; KRAGER, 2016; SINGHAL et al., 2015). Assim, o número de estudos que utilizam MALDI-TOF MS para identificação de microbiota bacteriana em artrópodes vem aumentando nos últimos anos (GASPER et al., 2017; PERLATTI et al., 2017; PRAET et al., 2016; TANDINA et al., 2016), tornando esta técnica uma ferramenta importante para identificação de microbiota em mosquitos.

A susceptibilidade do vetor a um dado patógeno humano e a disseminação de uma doença é dependente da compatibilidade das interações celulares e moleculares entre esses dois organismos e da habilidade do sistema imune do inseto em reconhecer e eliminar o patógeno. Para lidar com o risco de infecção causada pela exposição aos mais diversos patógenos, os insetos desenvolveram um sistema imune com uma variedade de mecanismos de defesa funcionando em conjunto (DIMOPOULOS, 2003). A estreita interação dos sistemas imunológicos celulares e humorais, onde fatores humorais podem atuar como moléculas de reconhecimento, auxiliando a resposta celular ou ainda, sintetizar e secretar moléculas humorais tais como as proteínas e peptídeos antimicrobianos, podendo explicar a diferença de competência vetorial entre as espécies *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* para transmitir o DENV (CASTILLO; REYNOLDS; ELEFThERIANOS, 2011; HUGHES et al., 2011; STRAND, 2008; TSAKAS; MARMARAS, 2010; WASINPIYAMONGKOL; MISSE; LUPLERTLOP, 2015).

Neste estudo, utilizamos MALDI-TOF MS para caracterizar a microbiota do intestino médio de espécies de mosquitos de laboratório e silvestres. Além disso, avaliamos e comparamos a dinâmica da infecção viral do DENV-1 e a expressão de Defensina A e Cecropina A em mosquitos tratados e não tratados com antibióticos.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

A dengue é uma doença importante causada pelo vírus da dengue (DENV), cujo principal vetor no Brasil é o mosquito *Aedes aegypti* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019a; SUTER et al., 2017). O mosquito fêmea durante um repasto sanguíneo em vertebrado infectado adquire o vírus, o qual invade em primeiro lugar o intestino médio e depois é disseminado e migram até as glândulas salivares estando apto a infectar um hospedeiro humano durante um novo repasto sanguíneo (SARAIVA et al., 2016). Já é conhecido que *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são envolvidos na transmissão dos vírus da dengue, Chikungunya e Zika (GOULD et al., 2017; GUZZETTA et al., 2016), e o *Culex quinquefasciatus* foi recentemente associado à transmissão do vírus Zika (GUEDES et al., 2017).

O intestino médio dos mosquitos é a primeira barreira tecidual que os patógenos devem passar para iniciar seu ciclo de vida (FRANZ et al., 2015). Este tecido tem sido utilizado em muitos estudos com foco na microbiota, uma vez que fornece detalhes sobre a diversidade microbiana e sua influência na competência vetorial de mosquitos (MUTURI et al., 2017; RAMIREZ et al., 2012; TANDINA et al., 2016; YADAV et al., 2015).

2.1 Culicídeos

Mosquitos pertencem a família Culicidae a qual possui inúmeras espécies de interesse médico/sanitário, conhecidos popularmente como pernilongos, muriçocas, carapanã e outros. São insetos que apresentam grande variabilidade genética e ampla distribuição geográfica, cuja dispersão abrange áreas que se estendem das regiões equatoriais as árticas.

As fêmeas pertencentes as subfamílias Culicinae e Anophelinae são hematófagas e podem transmitir patógenos causadores de doenças no homem como febre amarela, dengue, malária e filariose durante o repasto sanguíneo (NEVES et al., 2011).

Os machos alimentam-se de sacarose que podem ser obtidas em plantas, ocasionalmente as fêmeas utilizam-se deste tipo de alimentação, porém a alimentação sanguínea das fêmeas está relacionada a maturação dos ovos. A

hematofagia em geral é crepuscular, porém algumas espécies podem realizar essa ação durante a noite ou durante o dia. Quando não estão em atividade alimentar ou sexual, os mosquitos procuram se manter em seus locais de abrigo (NEVES et al., 2011; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2005).

As espécies destas subfamílias tem duração do ciclo biológico de aproximadamente 15 dias, em coleções de águas apresentando diferentes características de condições ambientais como: movimento e quantidade de matéria orgânica em decomposição e detritos (NEVES et al., 2011). Os principais gêneros são *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, cada um desses gêneros possui espécies relacionadas aos ciclos de transmissão de doenças humanas muito importantes. Espécies de *Anopheles* podem transmitir o protista causador da malária, enquanto que espécies do gênero *Aedes* estão associadas a veiculação de arbovírus, entre eles o vírus da dengue, Febre Amarela, Chikungunya e Zika vírus; e *Culex* que está associado a filariose, causada pela *Wuchereria bancrofti* (NEVES et al., 2011; PICIANTO et al., 2015; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2005).

2.1.1 *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Originalmente descrito no Egito, o que lhe confere o seu nome específico (*Aedes aegypti*), esse mosquito tem ampla distribuição geográfica e é encontrado em regiões quentes nos dois hemisférios (BECKER et al., 2003; NELSON, 1986). Também é encontrado entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul e sua distribuição é restrita às baixas altitudes. Embora esta espécie não seja normalmente encontrada em zonas acima de 1.000 metros de altitude, no México sua presença já foi registrada em alturas superiores a 2.000 metros (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 1995).

Esse mosquito foi introduzido nas Américas provavelmente, através de embarcações que cruzavam o oceano Atlântico durante as primeiras colonizações europeias no Novo mundo (BISSET, 2002). Reconhecido em 1881 como transmissor do vírus causador da febre amarela por Carlos J. Finlay (BISSET, 2002), *Aedes aegypti* (figura 1) teve em 1906 as primeiras evidências de que transmitia a dengue. Posteriormente, em 1931, Agramonte e Simmons confirmaram as evidências achadas em 1906 (HALSTEAD, 1974).

Figura 1 – *Aedes aegypti*



Fonte: Varella (2018)

Em 1898 e 1899, Lutz e Ribas respectivamente, fizeram os primeiros registros sobre a identificação de *Ae. aegypti* no Brasil. Esta espécie é encontrada em uma faixa do continente americano que se estende do Uruguai até o sul dos Estados Unidos da América (EUA), onde também é registrada a ocorrência de surtos da dengue em vários países, como Brasil, Ilha do Havaí e Estados Unidos (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2019). No Brasil, *Ae. aegypti* está amplamente distribuído, e desde 1998 encontra-se presente em todos os estados brasileiros (FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, 2001). A espécie *Ae. aegypti*, é o único vetor incriminado no Brasil capaz de transmitir o vírus da dengue. (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; PICIANTO et al., 2015).

2.1.2 *Aedes albopictus* (Skuse, 1894)

Ae. albopictus (figura 2) é originalmente do continente asiático, possui grande dispersão tornando essa espécie capaz de colonizar novas áreas distantes do seu centro de origem, como ocorrido nos continentes do Norte e Sul Americanos, África, Europa Meridional, Havaí e algumas Ilhas do Pacífico (FORATTINI, 1986).

Figura 2 - *Aedes albopictus*



Fonte: Leslie; Maruniak (2004)

No Brasil, o primeiro registro de *Ae. albopictus* foi no Rio de Janeiro em 1986 (FORATTINI, 1986), doze anos após o primeiro registro esse mosquito já era detectado em 12 estados (SANTOS, 2003). Desde sua introdução, a distribuição do *Ae. albopictus* é crescente e apenas cinco estados ainda não relataram infestação por essa espécie: Acre, Alagoas, Amapá, Roraima e Sergipe (GOMES et al., 2008).

Ae. albopictus é o vetor primário do DENV em diversas regiões da Ásia, vetor potencial nas Américas e em outras regiões devido a sua ampla distribuição geográfica (LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010). Apesar do mosquito *Ae. albopictus*, conseguir transmitir o vírus em países Asiáticos, até o momento no Brasil não foi envolvido de forma natural com ciclos locais da transmissão do vírus para humanos (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; PICIANTO et al., 2015). *Ae. albopictus* não é indicado como vetor no Brasil, porém estudos em condições laboratoriais demonstraram que esse culicídeo foi capaz de transmitir diversas arboviroses incluindo os quatros sorotipos do DENV (GRATZ, 2004; PAUPY et al., 2009).

2.1.3 *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823)

Cx. quinquefasciatus (figura 3) apresenta ampla distribuição geográfica, cujo seu comportamento antropofílico influencia sua abundância e prevalência, principalmente em áreas urbanas de regiões tropicais (CABRERA; BERNAL; CARMEN, 2006). No Brasil, distribui-se em todos estados, recebendo diferentes

denominações como mosquito, pernilongo, muriçoca ou carapanãs (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Figura 3 - *Cx. quinquefasciatus*



Fonte: Hill e Connelly (2009)

As áreas urbanas carentes de saneamento básico são as mais propícias ao desenvolvimento do *Culex*, por concentrarem um maior número de criadouros sempre situados no solo, representados por coleções aquáticas com elevado teor de matéria orgânica. Apesar de prevalecer durante todo o ano, sua densidade populacional tende a aumentar em períodos chuvosos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013a).

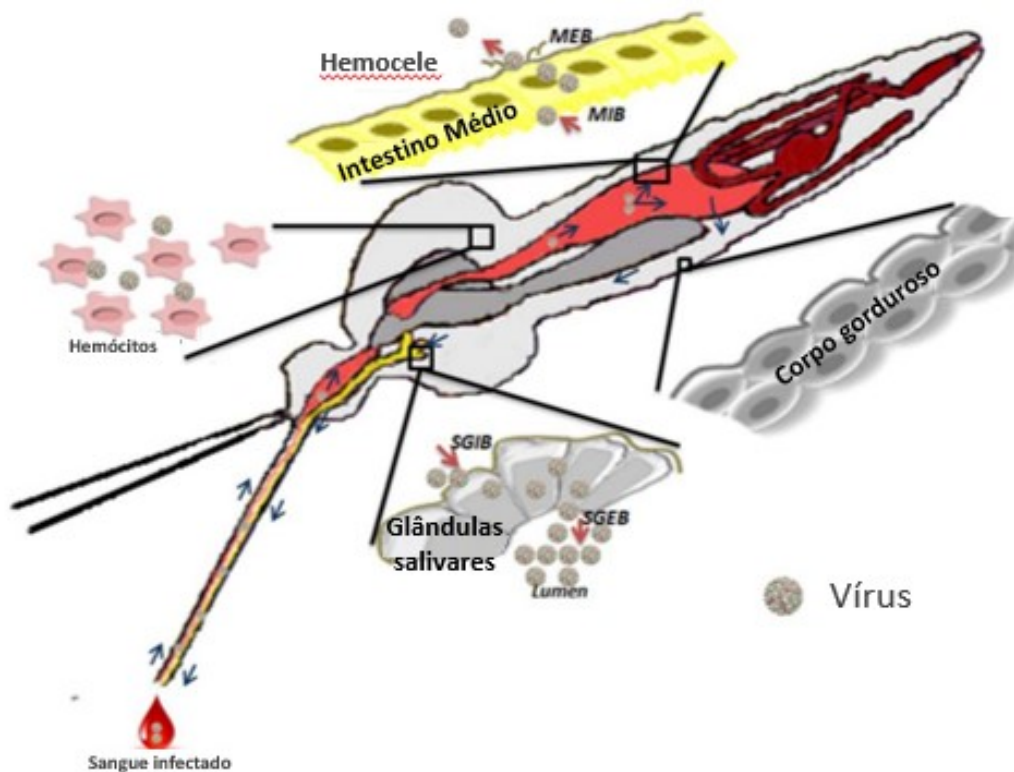
A espécie *Cx. quinquefasciatus* é considerada como vetor exclusivo nas Américas da *Wuchereria bancrofti*, verme causador da filariose linfática em ambientes urbanos tropicais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019b). Estes culicídeos podem transmitir também *Dirofilaria* spp., em cães, além de transmitir vírus que causam diversas encefalites. Em áreas onde existe risco de transmissão desses patógenos através do *Cx. quinquefasciatus*, essa espécie constitui um problema de saúde pública (SALAZAR; MANCADA, 2004).

2.2 Sistema imune dos insetos

Na promoção da defesa do inseto frente à infecções de microrganismos patogênicos, como bactérias, fungos e vírus, os insetos possuem um sistema de

barreiras físicas e de imunidade inata que forma o sistema imune (KANTOR et al., 2017; PASSARELLI, 2012). Para que haja sucesso na infecção dos patógenos, esses precisam vencer tanto as barreiras físicas, como o intestino médio e glândulas salivares, quanto também as barreiras imunológicas (KUMAR et al., 2018). A resposta imune apresenta três tipos de defesa principais, sendo elas: resposta humoral desencadeada por peptídeos antimicrobianos; resposta celular (fagocitose e encapsulação do invasor) e reação de fenoloxidase que promove o depósito de pigmentos de melanina sobre o invasor e ferimentos. É importante para os patógenos ultrapassar tanto as barreiras físicas quanto as barreiras de imunidade para que tenha sucesso em estabelecer uma infecção (figura 4) (KUMAR et al., 2018).

Figura 4 - Representação esquemática das barreiras físicas e fisiológicas sobre a infecção em mosquitos.



Fonte: Adaptado de Kumar et al. (2018)

A resposta, envolvendo tanto a defesa humoral quanto a celular é iniciada após receptores de reconhecimento se ligarem as moléculas dos patógenos, como os lipopolissacarídeos e peptídeoglicanos encontrados nas paredes de bactérias,

promovendo a resposta adequada frente a infecção pelo patógeno. Essa resposta pode ser através de ação direta da fagocitose, ou indireta pelas cascatas de sinalização que regulam a transcrição de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (HOFFMANN, 2003; KUMAR et al., 2018).

2.2.1 Barreiras físicas

Após uma alimentação potencialmente infecciosa, os mosquitos terão adquirido algum tipo de patógeno, esse terá o intestino médio como primeira barreira a ser vencida, para dar continuidade a infecção (KUMAR et al., 2018; WEAVER et al., 1988). Os patógenos devem ter a capacidade de infectar e se replicar nas células do intestino médio dos mosquitos, para isso devem existir receptores celulares que tornem as células intestinais mais permissíveis a infecção.

Ao vencer as dificuldades impostas pelo intestino médio, os patógenos através da hemocele infectam outros tecidos, como: corpo gorduroso e glândulas salivares (KLOWDEN, 2007). A hemocele é onde encontra-se a hemolinfa e os hemócitos, que são responsáveis por ativar diversas ações contra o patógeno invasor. Os hemócitos secretam fatores humorais envolvidos na morte de organismos estranhos através da produção de proteínas que facilitam a fagocitose e a nodulação do seu alvo. Outras moléculas moduladoras de melanização, proteínas que auxiliam na sinalização imunológica e peptídeos antimicrobianos também são secretadas (KUMAR et al., 2018).

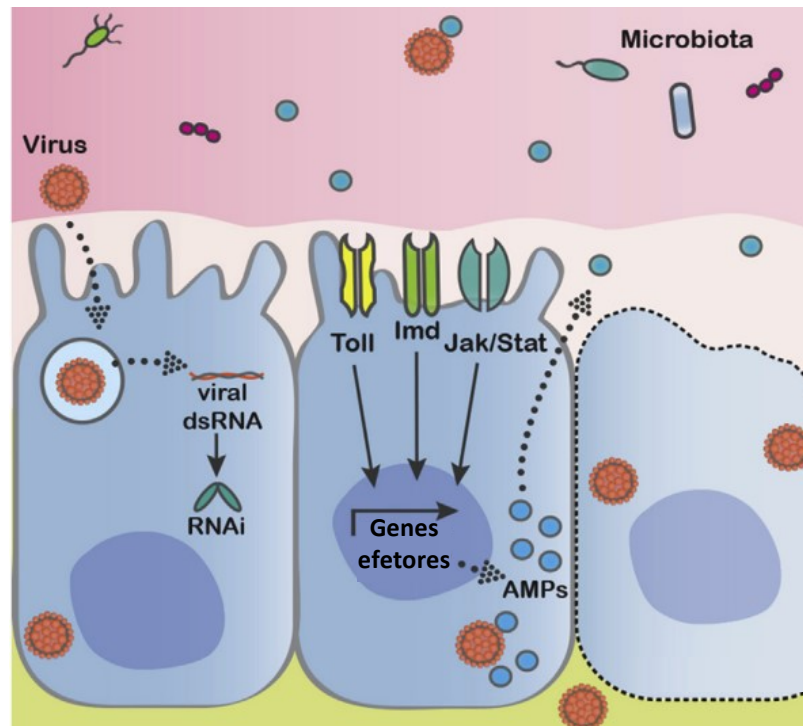
Nos culicídeos vetores, os patógenos após passar pela hemocele, devem infectar as glândulas salivares para completar a etapa de transmissão do seu ciclo de vida (CAO-LORMEAU, 2009; GHOSH et al., 2009). A camada epitelial das glândulas salivares é uma barreira física para os patógenos e ao transpor essa barreira, patógenos como os Flavivirus, conseguem manter sua replicação nas membranas lisas desse tecido (KUMAR et al., 2018). Sabe-se que a saliva contém uma complexa mistura de fatores com atividade imunológica, porém não existe tantas evidências experimentais para provar o papel ativo das glândulas salivares como órgão imunológico (KUMAR et al., 2018; SCHNEIDER; HIGGS, 2009).

2.2.2 Barreiras imunológicas

Tomando como base um arbovírus, o mesmo deve transpor também as barreiras imunológicas, essas estão relacionadas em reconhecimento, vias de sinalização e ação de moléculas efetoras (CHENG et al., 2016; KUMAR et al., 2018). As moléculas de reconhecimento estão envolvidas na resposta imune contra diferentes patógenos, uma vez que seus receptores interagem com esses agentes infecciosos dependendo da sua estrutura e superfície molecular (KUMAR et al., 2018).

As vias de sinalização são outras barreiras ligadas ao sistema imune que tem como objetivo a proteção dos mosquitos contra os patógenos invasores, assim como regular sua microbiota natural (DONG; MANFREDINI; DIMOPOULOS, 2009; RAMIREZ et al., 2012; XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008). A interação entre essas vias de sinalização e a microbiota natural dos mosquitos, mostram um melhoramento nas respostas imunológicas, preconizando uma maior resistência contra os patógenos (CHENG et al., 2016; KUMAR et al., 2018; RAMIREZ et al., 2012). As principais vias de sinalização são: Toll, IMD (*Immune deficiency*) e JAK-STAT (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), essas são ativadas e acionam moléculas efetoras como os peptídeos antimicrobianos (AMPs) para tentar neutralizar os patógenos invasores (figura 5) (KUMAR et al., 2018; SARAIVA et al., 2016). A via de sinalização Toll é induzida por bactérias Gram-Positivas e fungos, além de ser uma significativa via na regulação da resistência contra o DENV (KUMAR et al., 2018). A ativação da via de sinalização IMD é interligada a presença de bactérias e *Plasmodium*, e indiretamente ligada a carga viral em mosquitos do gênero *Aedes* (KUMAR et al., 2018; LIU et al., 2017; SARAIVA et al., 2016). A JAK-STAT é conhecida como a maior via de sinalização, envolvidos no sistema imune do vetor, sendo ligada as infecções por bactéria e vírus da dengue, induzindo a transcrição de genes_ (KUMAR et al., 2018; SARAIVA et al., 2016).

Figura 5 – Imunidade antiviral no intestino médio de mosquitos.



Fonte: Adaptado de Saraiva et al. (2016)

Outro importante mecanismo de defesa imunológica são moléculas de interferência conhecidas como RNAi, esse é um mecanismo de sequência gênica específica para silenciamento controlando várias funções, que tem como objetivo manter a homeostase celular durante um processo de infecção. Esse mecanismo de defesa inclui pequenas moléculas de RNA, entre elas estão os siRNAs (pequenos RNAs endógenos de interferência) e os miRNA (micro RNA), sendo esses antivirais vitais no sistema de defesa dos insetos (KUMAR et al., 2018; LIU et al., 2017).

2.2.2.1 Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são pequenas moléculas que em sua maioria são carregadas positivamente e são produzidas pelo corpo gorduroso, hemócitos e células epiteliais, sendo o corpo gorduroso o principal produtor desses peptídeos. A produção dos AMPs ocorre após o reconhecimento do patógeno pelas células receptoras e após sua síntese nos locais mencionados acima são direcionadas aos sítios alvos (KUMAR et al., 2018; TSAKAS; MARMARAS, 2010).

O sistema imune dos insetos tem a capacidade de reconhecer diversos patógenos e iniciar sua resposta humoral através de receptores presentes nos hemócitos, essa capacidade continua presente mesmo depois de algumas semanas após a infecção, dando continuidade à produção de AMPs. Existem cerca de 150 AMP caracterizados, isolados e classificados em cinco classes: Cecropina, Defensina, Gambicina, Actina e Dipterocina (KUMAR et al., 2018; ROSALAES, 2011; TSAKAS; MARMARAS, 2010).

A expressão desses peptídeos pode ser constitutiva e/ou induzida, sendo liberados na hemolinfa, apresentando atividade contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e atividade antiviral (COCIANCICH et al., 1994; HULL; KATETE; NTWASA, 2012). O modo de ação molecular desses peptídeos e proteína atua a nível das membranas e das paredes celulares ativando a lise celular (COCIANCICH et al., 1994).

A defensina é um peptídeo rico em cisteína descrito pela primeira vez em 1988 na mosca *Sarcophaga peregrina* (MATSUYAMA; NATORI, 1988) e atualmente é relatada em vários vertebrados e invertebrados. A Defensina foi o primeiro AMP isolado de *Ae. aegypti* sendo considerada a mais importante AMP encontrada nessa espécie. Três formas são descritas em *Ae. aegypti* A, B e C, já em *Ae. albopictus* além das três formas já descritas, a forma D foi encontrada e considerada como uma nova defensina (CHO et al., 1996; GAO; HERNANDEZ; FALLON, 1999; TSAKAS; MARMARAS, 2010). As formas A e B são as mais relatadas e sua expressão ocorre, principalmente, no corpo gorduroso, a forma C é expressa principalmente no intestino médio (BARTHOLOMAY et al., 2004; LOWENBERGER, 2001). As Defensinas têm cerca de 70 a 100% de similaridade entre os dípteros e possui características, principalmente, antibacterianas e antifúngicas (BULET; STÖCKLIN, 2005; YI et al., 2014). A atividade anti-dengue desse peptídeo foi relatada sendo expressa na região do intestino médio, mostrando a capacidade antiviral da defensina A e C (PAN et al., 2012).

A cecropina foi a primeira AMP a ser totalmente caracterizada e isolada, sua expressão tem sido reportada filogeneticamente através das ordens Diptera e Lepidoptera. Apresenta-se em três formas (A, B e C) e possui uma alta similaridade entre as ordens citadas. A Cecropina apresenta atividade antimicrobiana e afeta o crescimento de filamentos de fungo e patógenos de plantas (BULET; STÖCKLIN,

2005; COCIANCICH et al., 1994; HULL; KATETE; NTWASA, 2012). A capacidade de inibir a produção de vírus também é relatada para a Cecropina, diminuindo sua transcrição e o número de produtos dos genes virais de HIV-1, assim como atividade anti-dengue (HULL; KATETE; NTWASA, 2012; LUPLERTLOP et al., 2011). Em um estudo envolvendo mosquitos transgênicos, foi observado que co-expressão de Cecropina A e Defensina A, resulta em uma cooperação antimicrobiana e antiplasmodial, sugerindo que dois ou mais efetores moleculares tenha uma ação de defesa melhorada contra patógenos (KOKOZA et al., 2010).

2.3 Microbiota

A microbiota tem um papel importante na modulação da saúde do hospedeiro, uma vez que proporciona proteção contra agentes patogênicos, tornando o ambiente inóspito através da produção de biossurfactantes, da competição por sítios de ligação e nutrientes, excreção de metabólitos e indução da expressão de moléculas com propriedades antimicrobianas (WILKS; GOLOVKINA, 2012; YADAV et al., 2015). A microbiota encontra-se presente em vários órgãos dos mosquitos como intestino, ovário, túbulos de Malphigi e hemocele, porém a do intestino é de maior interesse, porque representa o primeiro local a receber de forma extensiva uma exposição aos patógenos (DENNISON et al., 2014).

Estudos realizados com insetos vetores de patógenos ao homem têm indicado a importância da microbiota para desenvolvimento biológico, digestão de nutrientes, metabolismo, produção de ovos e resposta imune (PIDIYAR et al., 2004; ELEFThERIANOS et al., 2013; DENNISON et al., 2014; JUPATANAKUL; SIM; DIMOPOULOS, 2014). Essa interação tem um grande potencial na competência vetorial para patógenos, como os arbovírus, sendo que algumas espécies bacterianas estão ligadas a indução de compostos antivirais (DENNISON et al., 2014; HEGDE; RASGON; HUGHES, 2015; KINGSOLVER; HUANG; HARDY, 2013). A microbiota auxilia na indução de importantes vias de sinalização como: Toll, IMD e JAK-STAT, que estão diretamente ligados a produção de AMPs (KUMAR et al., 2018). Logo, a microbiota natural do mosquito tem grande importância no sistema imunológico dos vetores de patógenos, uma vez que induzem a produção de

moléculas com propriedades antiparasitária, bactericida e antiviral (CHENG et al., 2016; KUMAR et al., 2018; SARAIVA et al., 2016).

A presença e ausência da microbiota está interligada na atuação da expressão de importantes peptídeos antimicrobianos como Defensina e Cecropina, visto que trabalho de Xi et al. (2008) mostrou que o tratamento de *Ae. aegypti* com os antibióticos penicilina, estreptomicina e gentamicina diminui a expressão desses AMPs associados a via de sinalização Toll.

Outro fator importante sobre a microbiota é que sua ausência está relacionada a uma melhora da capacidade de patógenos como *Plasmodium* spp. e DENV infectar seus respectivos vetores (*Anopheles gambiae* e *Ae. aegypti*), ou seja, a presença da microbiota é um fator de proteção. Estudos com esses vetores mostraram que mosquitos tratados com antibióticos apresentaram uma maior susceptibilidade a infecção dos seus patógenos (DONG; MANFREDINI; DIMOPOULOS, 2009; RAMIREZ et al., 2012).

Outros estudos analisam o efeito do ambiente na microbiota dos mosquitos, uma vez que um bom entendimento da diversidade da microbiota pode nos dar dados sobre a influência dessa microbiota na susceptibilidade a patógenos (TANDINA et al., 2016; VALIENTE MORO et al., 2013; ZOUACHE et al., 2011). A diversidade microbiana de mosquitos antes era ignorada (ZOUACHE et al., 2011). Entretanto, após a descoberta da influência da microbiota na relação patógeno/vetor, a diversidade microbiana tem sido alvo de estudos (ELEFThERIANOS et al., 2013; JUPATANAKUL; SIM; DIMOPOULOS, 2014; RAMIREZ et al., 2012).

Na área de controle de arbovírus, abordagem paratransgênica com microbiota podem ser projetadas para ter atividade entomopatogênica melhorada, secretar moléculas anti-patogênicas ou secretar moléculas que ativam o sistema imune do mosquito em resposta ao patógeno (WILKE; MARRELLI, 2015). Essa abordagem pode ser usada na prática de uma melhor compreensão da microbiota do mosquito e quais bactérias simbióticas e moléculas efetoras são requeridas para atingir o objetivo de controle de arbovirose (JUPATANAKUL; SIM; DIMOPOULOS, 2014; WILKE; MARRELLI, 2015).

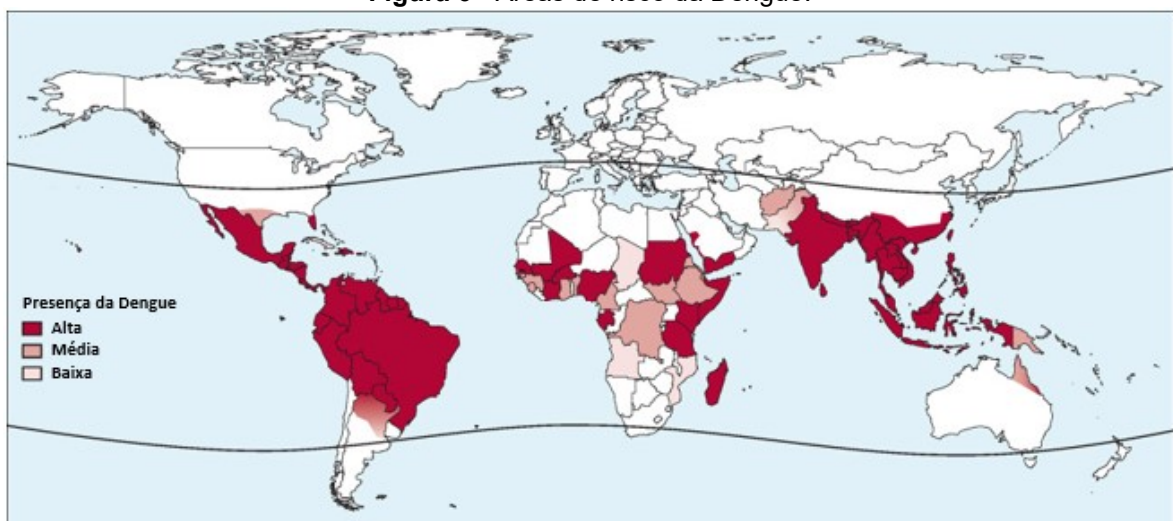
2.3 Dengue

A dengue é a arbovirose mais prevalente no mundo. Cerca de 2,5 bilhões de pessoas encontram-se sob o risco de contaminação, sendo aproximadamente 50-100 milhões de pessoas infectadas anualmente, incluindo mais de 500.000 casos potencialmente letais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019a). O conhecimento da distribuição geográfica da dengue é primordial para compreensão da morbidade e mortalidade global causada pela doença (BHATT et al., 2013b).

Os mosquitos do gênero *Aedes* são os principais vetores do vírus da dengue (DENV), suas fêmeas hematófagas são responsáveis por propagarem a forma ativa do vírus através das suas picadas em hospedeiro vertebrado, causando-lhe a doença. A dengue tornou-se uma enfermidade comum ao redor do mundo, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde como a mais importante doença infecciosa de transmissão vetorial. Onde, nos últimos 50 anos a dengue vem aumentando expressivamente sua disseminação em diferentes partes do mundo (DIAS et al., 2010; PICIANTO et al., 2015; THAI; ANDERS, 2011).

A adaptação do mosquito vetor aos ambientes urbanos e a variação de sorotipos dos vírus, colaboram com que o número de infecções seja elevado (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019a). As áreas de maior risco de infecção estão localizadas nos trópicos, cujos países; africanos, latino americanos e asiáticos são os mais afetados (figura 6).

Figura 6 - Áreas de risco da Dengue.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2014).

O DENV é constituído por um único filamento de RNA envelopado e possui quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 (MAMANI, 2014; NORMILE, 2013). Cada sorotipo apresenta genótipos diferentes, com ampla variabilidade genética que podem coexistir em uma mesma região, aumentando as chances de aparecimento de complicações e casos de febre hemorrágica (DIAS et al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019a). Uma mesma pessoa pode ser infectada e apresentar os sintomas da doença mais de uma vez ao longo da vida devido à transitoriedade dos sorotipos, logo à medida que os sorotipos coexistem na mesma região a possibilidade de reinfecção pelo vírus da dengue é aumentada (DIAS et al., 2010).

A transmissão do DENV ocorre de acordo com o sucesso do ciclo evolutivo viral, o qual acontece através do inseto vetor, indivíduo infectado e outro que seja suscetível a infecção viral. O mosquito vetor fêmea faz seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado (em fase de viremia). Este sangue, alcançará o intestino médio do vetor e ocorrerá o primeiro alvo de replicação viral que acontece nas células do epitélio intestinal. Em seguida, o vírus romperá a barreira intestinal, atingindo a hemocele do mosquito, disseminando-se pelo corpo do inseto. Nesta fase, ocorre o período de incubação extrínseco (de 7 a 14 dias) até que o vírus alcance as glândulas salivares e se replique ainda mais. Neste último órgão poderá ser transmitido para outro hospedeiro vertebrado quando realizar um novo repasto sanguíneo (SALAZAR et al., 2007).

As manifestações clínicas da dengue no homem variam de uma síndrome viral infectante, inespecífica e benigna, de febre por dengue ou indiferenciada, conhecida como dengue clássica; a dengue severa, caracterizada por febre hemorrágica e a síndrome de choque de dengue. Na dengue severa, destaca-se principalmente aparição de hemorragia, trombocitopenia e hemoconcentração, podendo levar os pacientes acometidos a óbito (GUBLER, 1998).

As primeiras ocorrências de dengue foram bem documentadas, sendo registradas na Filadélfia (1778) e no Egito (1779), onde a dengue era considerada uma doença benigna até a Segunda Guerra mundial. Após a guerra foi relatada a circulação de vários sorotipos em uma mesma região, logo formas graves da doença como a febre hemorrágica foram detectadas com alta incidência. A partir desse momento, a dengue se tornou uma das maiores epidemias mundial, afetando a

maioria dos continentes (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). No Brasil, surtos epidêmicos de dengue são relatados desde 1846, porém evidências epidemiológicas concretas foram documentadas apenas em 1982 em Boa Vista/Roraima. Nesta cidade um inquérito sorológico mostrou que 11 mil pessoas tinham sido infectadas e o sorotipo DENV-1 foi isolado (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; TEIXEIRA et al., 2009).

Desde 1982 até os dias atuais, vem ocorrendo surtos epidêmicos no Brasil, devido aos diferentes sorotipos (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; BRASIL, 2016). Até maio de 2016, foram registrados 1.227.920 casos prováveis de dengue no país. Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (59,6%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (20,1%), Centro-Oeste (10,7%), Sul (7,0%) e Norte (2,6%) (BRASIL, 2016).

Duas espécies de mosquitos são consideradas importantes vetores deste vírus: *Aedes aegypti*, originário da África, principal vetor nas Américas e África, o qual possivelmente se espalhou para outras localidades através do comércio de escravos no século XV e comércio de especiarias no século XVIII. A espécie *Aedes albopictus* é responsável pela transmissão na Ásia, vulgarmente conhecido como “Tigre Asiático” devido ao seu padrão de distribuição de escamas e de sua origem asiática, porém tem grande distribuição mundial devido ao intenso comércio internacional. Sabe-se que essas espécies são totalmente adaptadas a ambientes urbanizados e com a globalização do mercado, tornou-se mais fácil a dispersão de ovos e formas imaturas desses mosquitos, gerando um grande problema no controle da dengue (DIAS et al., 2010; MARTINA, 2011; PICIANTO et al., 2015; SIMMONS et al., 2012).

A relação entre o vírus causador da dengue e o mosquito vetor, precisa ser melhor entendida para a busca do controle dessa enfermidade, através dos órgãos públicos, na melhoria de programas de saúde coletiva, melhoria da qualidade de vida da população e investimento do saneamento básico. Nesta direção, esforços vêm sendo realizados para a busca da erradicação da dengue com base no controle destes vetores. Todavia, a reincidência de algumas infecções causadas por mosquitos transmissores de agentes etiológicos responsáveis por algumas doenças como dengue, malária, filariose e febre amarela, principalmente a partir dos anos 70 em diversas regiões do globo terrestre nos obrigam a buscar novos entendimentos

científicos em relação a biologia destes vetores para que possamos alcançar êxito no controle destas doenças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019a).

Na tentativa de evitar epidemias da dengue foi implantado no Brasil, em 1996, o Programa de Erradicação do *Ae. aegypti* (PEAa), no entanto, em 2002 este programa foi reestruturado e renomeado passando a ser chamado de Programa Nacional de Controle da dengue (PNCD). Apesar da atuação do PNCD, o vírus DENV permanecem em circulação mesmo com baixa densidade vetorial (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; BRASIL, 2016; DIAS et al., 2010).

3 PERGUNTAS CONDUTORAS

- a) O ambiente onde *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* estão inseridos afeta a diversidade da microbiota?
- b) A microbiota tem influência na expressão de importantes peptídeos antimicrobianos?
- c) A microbiota tem influência na susceptibilidade de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* ao DENV-1?

4 JUSTIFICATIVA

A interação entre insetos e patógenos tem proporcionado modelos importantes para o conhecimento da resposta imunológica dos vetores, o qual pode fornecer informações relevantes para o controle das arboviroses. Os mosquitos constantemente adquirem microrganismos de seus habitats naturais e essa variação de ambiente pode ter um grande impacto na diversidade da microbiota. A variação microbiana afeta múltiplos aspectos da biologia dos insetos como: nutrição, digestão, metabolismo, desenvolvimento, imunidade e na competência vetorial. Estudo com abordagem comparativa da microbiota e dinâmica do vírus da dengue entre as espécies *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus*, mosquitos vetores de vários microrganismos de importância médica e que coabitam mesmos nichos ecológicos, podem contribuir para o melhor entendimento das diferentes respostas contra o DENV. Desta forma o conhecimento da microbiota de vetores de diferentes ambientes, a influência da microbiota na dinâmica viral e a expressão de importantes peptídeos antimicrobianos são relevantes para futuras estratégias no controle das arboviroses.

5 HIPÓTESES

- a) A microbiota de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* varia de acordo com o ambiente;
- b) A expressão gênica de Defensina A e Cecropina A são influenciadas em *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* pela microbiota;
- c) A dinâmica da infecção viral do DENV-1 é influenciada em *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* pela microbiota.

6 OBJETIVO GERAL

Identificar a microbiota de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*, e analisar sua influência tanto na dinâmica da infecção pelo vírus da dengue 1 quanto na expressão de Defensina A e Cecropina A.

6.1 Objetivos específicos

- a) Identificar a microbiota cultivável de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* silvestres e provenientes do laboratório;
- b) Analisar a influência da microbiota na expressão gênica de Defensina A e Cecropina A em *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus*, tratados e não tratados com gentamicina, penicilina e estreptomicina;
- c) Analisar a influência da microbiota na expressão de Defensina A e Cecropina A em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* infectados com DENV-1, sendo esses tratados e não tratados com gentamicina, penicilina e estreptomicina.
- d) Analisar a influência da microbiota na dinâmica da infecção viral do DENV-1 em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*, tratados e não tratados com gentamicina, penicilina e estreptomicina;

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Para o desenvolvimento da pesquisa, as seguintes etapas foram realizadas.

7.1 Mosquitos de laboratório

Três espécies de laboratório, *Ae. aegypti* (RecLab), *Ae. albopictus* (RecLab) e *Cx. quinquefasciatus* (CqSLab), consideradas referências de suscetibilidade a agrotóxicos e patógenos foram utilizadas neste estudo. Essas espécies vem sendo mantidas por mais de 15 anos sob condições controladas de laboratório, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa entre 65-85% e com um foto-período de 12:12h, no departamento de Entomologia e insetário do Instituto Aggeu Magalhães - IAM/FIOCRUZ/BRASIL. Um total de 20 mosquitos de cada espécie com 3 dias após a sua emergência foram mantidos em condições padrão com solução de sacarose 10% sobre o algodão até que sejam utilizados para os experimentos de identificação de microbiota, evolução viral e expressão gênica de Defensina A e Cecropina A.

7.2 Mosquitos silvestres

Os mosquitos foram coletados na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Recife, Brasil). Esses mosquitos foram capturados com rede de captura para insetos, alocados em gaiolas entomológicas, transportados para o laboratório e identificados morfológicamente usando um Glossário Taxonômico de Mosquitos proposto por Harbach e Knight (1980). Para este estudo, usamos *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus*. Um total de 20 mosquitos de cada espécie foi utilizado para identificação da microbiota, outras espécies de mosquitos que foram coletadas e diferiram das espécies em estudo, foram retiradas do estudo.

7.3 Identificação da microbiota

Mosquitos de laboratório e silvestres foram utilizados para identificação da microbiota.

7.3.1 Dissecção do intestino médio

Os mosquitos de laboratório e silvestres foram mergulhados em etanol a 70% por 2 min para esterilização da superfície e mergulhados em PBS 1X estéril para a retirada do excesso de etanol. Intestinos médios foram então dissecados de forma individual sobre uma lâmina de vidro estéril contendo uma gota com 50 μ L de PBS X1 estéril, então transferidos para um tubo de microcentrífuga contendo 100 μ L de PBS X1 estéril e macerados por 30 segundos. Em seguida, foram utilizados para o isolamento da microbiota.

7.3.2 Isolamento da microbiota do intestino médio

Cada intestino médio macerado foi diluído em 1:10 μ L de PBS X1 estéril e plaqueados em placas contendo Agar Sangue (AS), um meio enriquecido que possibilita uma melhor identificação de diferentes isolados bacterianos. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Todos os procedimentos foram feitos em um ambiente estéril seguindo práticas assépticas. O isolamento inicial foi baseado na morfologia, cor e tamanho da colônia. Isolamos as bactérias do intestino médio dos mosquitos e enviamos para análise de MALDI-TOF MS.

7.3.3 Preparação e identificação da microbiota por MALDI-TOF MS

Uma placa polida de aço (FlexiMass, Shimadzu Biotech, UK) foi utilizada para colocar uma pequena amostra de uma única colônia de cada isolado do intestino médio do mosquito. Em seguida, alíquotas de 1 μ L de ácido fórmico a 25% foi adicionado e misturado suavemente para cada isolado, e quando essa mistura estava quase evaporada, 1 μ L de solução matriz (75mg/mL 2,5-ácido dihidroxibenzóico [DHB] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1; v/v/v] com 0.03 μ L de ácido trifluoracético [TFA]) foi adicionado e misturado suavemente. Todas as amostras foram secas durante alguns minutos à temperatura ambiente e finalmente analisada por MALDI TOF MS.

O sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipamento com um laser nitrogen (337 nm) foi utilizado para realização de análises. Proteínas

ribossômicas de células intactas de *E. coli* DH5 (4365.4, 5096.8, 5381.4, 6241.4, 6255.4, 6316.2, 6411.6, 6856.1, 7158.8, 7274.5, 7872.1, 9742 e 12227.3 Da) foram usados como calibradores externos do equipamento MALDI-TOF MS. O espectrômetro de massa MALDI-TOF foi usado para identificação bacteriana de acordo com as recomendações do fabricante. Os espectros foram gravados em um modo linear, dentro de uma faixa de massa de 2,000 para 20,000 Daltons (Da) e os espectros finais foram gerados pela soma 20 tiros de lasers acumulados por perfil. Cada amostra produziu 50 perfis, levando a 1000 disparos de laser por espectro somado.

As listas de picos resultantes foram exportadas para o banco de dados do SARAMIS package software (Spectral Archiving and Microbial Identification System, AnagnosTec, Germany, www.anagnostec.eu) onde as identificações finais foram alcançadas, esse banco de dados possui mais de cinco mil espectros de espécies bacterianas depositadas. Identificações pelo SARAMIS baseiam-se na presença ou ausência de cada pico nos espectros. Cada isolado foi considerado corretamente identificado em nível de gênero se o espectro tivesse pontuação ≥ 1.7 .

7.4 Dinâmica viral nos mosquitos tratados e não tratados com antibióticos

Mosquitos de laboratório tratados e não tratados com antibióticos foram utilizados para análise da dinâmica viral.

7.4.1 Tratamento com antibióticos

Mosquitos de laboratório com três dias de vida foram divididos em dois grupos: tratados e não tratados com antibióticos para cada espécie. Ao grupo tratado foi oferecido *ad libitum*, ao longo de sete dias consecutivos, uma solução de 10% de sacarose estéril contendo antibióticos nas seguintes concentrações: gentamicina 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, penicilina 100 U/ μL e estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Essas concentrações foram utilizadas por apresentarem boa eficiência e nenhum índice de mortalidade. Para o grupo não tratado foi usado a mesma solução de sacarose sem antibióticos nas mesmas condições. Os algodões estéreis com a soluções foram trocados diariamente para os dois grupos em estudo. Após os setes dias, mosquitos

de ambos os grupos foram usados para retirada do intestino médio. Todo o experimento foi realizado em duplicada biológica e em momentos diferentes.

7.4.2 Potencial de inibição do tratamento com antibióticos

Para a obtenção dos intestinos médios de forma estéril de ambos os grupos, foi utilizado o mesmo procedimento de dissecação (seção 7.3.1.). Os homogeneizados obtidos a partir dos intestinos médios (seção 7.3.2.) foram espalhados em placas contendo Brain Heart Agar (BHA) e em seguida incubados à 37 °C por 48 h. Foi simulado também a técnica sem amostra biológica utilizando apenas os materiais de dissecação para validar que o experimento foi realizado de forma asséptica, ou seja, esse procedimento foi o nosso controle negativo da técnica. Esse controle sem crescimento bacteriano mostra que a presença de colônias era oriunda do intestino do mosquito e não de outro fator externo.

Após as 48 h, as placas foram analisadas para avaliar o potencial de inibição dos antibióticos. Esse potencial de inibição foi estimado pelo número total de unidades formadoras de colônias (UFC) achado no grupo tratado dividido pelo número de UFC do grupo não tratado, dessa divisão subtraímos por um e multiplicamos por 100%, obtendo assim a porcentagem de inibição do tratamento.

7.4.3 Cepa do DENV-1 e sua titulação

O DENV-1, cepa EU259529, isolado de soro de paciente infectado na Região Metropolitana do Recife, armazenadas em freezer – 80 °C, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) – IAM/FIOCRUZ e utilizada para infecção artificial das fêmeas dos mosquitos.

Ensaio de placas seguido de imunoperoxidase foi feita para determinar o título dos estoques e dos vírus usados na alimentação artificial. Este procedimento foi realizado seguindo o protocolo de Santos et al. (2013) com modificações conforme descrição a seguir. Em placas de 24 poços, foi semeado 3×10^5 células C6/36 com o meio L-15 de crescimento, 48 h antes da realização do ensaio. Após 48 h foi preparada uma diluição seriada do DENV-1 (1:10¹, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ e 1:10⁸) para cada amostra a ser titulada. Da cultura de células C6/36, os

meios foram retirados das placas e foram inoculados 200 µL de cada diluição do DENV-1 no poço correspondente. As placas ficaram em um homogeneizador orbital (bailarina) por 15 min, seguido de uma incubação de 45 min em estufa a 28 °C para adsorção do vírus. Após a incubação, os poços foram aspirados com pipeta Pasteur e, então, foi adicionado em cada poço 1 mL de meio semi-sólido (Carboximetilcelulose 2%, meio Leibovitz 2X concentrado, antibióticos 1% e antifúngicos 1%). As placas foram acondicionadas em estufa a 28 °C por 5 dias. Após esse período o meio semi-sólido foi retirado, os poços foram lavados com PBS 1X (0,1M; pH 7,4) e foi adicionado 1 mL de acetona 30% por 13 min para fixação das células em cada poço. A acetona foi então, retirada por inversão e as placas foram colocadas para secar em estufa a 37 °C por 24 h. Após 24 h, as placas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal (líquido ascítico murino anti-dengue 1, 2 ou 3, gentilmente cedido por Bio-Manguinhos) a 37 °C por 1 h e, em seguida, lavadas três vezes com PBS 1 X (0.1M; pH 7.4). Após as lavagens, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário HRP-recProtein G (Invitrogen – cat. No 10-1223) a 37 °C por 1 h e, em seguida, lavadas novamente três vezes com PBS 1 X (0.1M; pH 7.4). Após as lavagens, foi adicionado a cada poço o substrato AEC (Sigma – cat. No A6926) para revelação dos focos, os ensaios foram feitos em duplicata e o título foi obtido através da quantificação das unidades formadoras de focos por ml (FFU/mL) usando a fórmula: Título (FFU/mL) = média de focos da última diluição x última diluição (10ⁿ) x fator de diluição, onde n é o número da última diluição correspondente à visualização dos focos. O DENV-1 apresentou um título de 5 x 10⁵ FFU/mL, que foi utilizada na infecção artificial dos mosquitos.

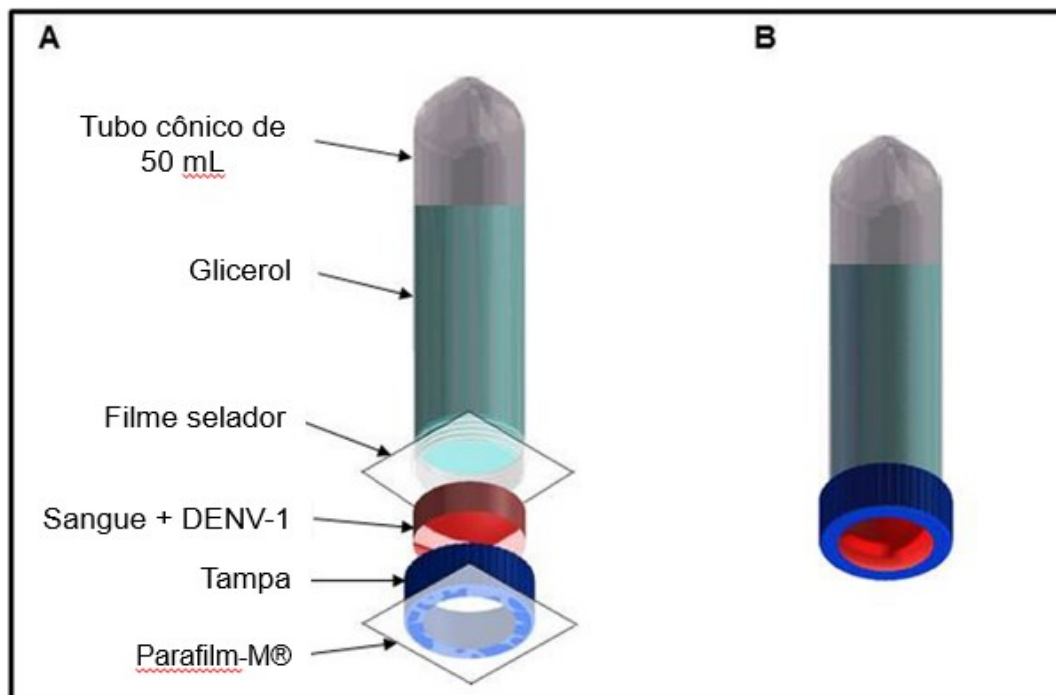
7.4.4 Infecção artificial com DENV-1

Todo o procedimento de alimentação artificial oral dos mosquitos foi realizado no infectório do Departamento de Entomologia do IAM/FIOCRUZ-PE, onde as etapas de alimentação e manutenção dos mosquitos tratados/não tratados com antibióticos e infectados foram realizadas de acordo com as normas de biossegurança e bioproteção previstas para laboratório e infectório com nível 2 de Biossegurança (NB2).

A infecção artificial dos mosquitos só foi realizada com mosquitos provenientes do laboratório, onde, fêmeas de *Ae. aegypti* (RecLab), *Ae. albopictus* (RecLab) e *Cx. quinquefasciatus* (CqSLab), foram alimentadas com sangue de carneiro desfibrinado, vendido comercialmente, infectado com DENV-1 de acordo com protocolo *Glytube* (figura 7) descrito por Costa-da-Silva et al. (2013). Para cada espécie de mosquitos tratados e não tratados com antibióticos.

Caixas com 50 mosquitos foram usadas para alimentação artificial potencialmente infecciosa com DENV-1 em uma proporção de 1:1 (1 mL DENV-1 sobre a titulação de 5×10^5 FFU/mL e 1 mL do sangue de carneiro desfibrinado) durante 45 min. Após a alimentação, somente 20 fêmeas totalmente ingurgitadas foram separadas para o estudo e transferidas para uma nova caixa. As fêmeas não tratadas foram mantidas com solução 10% de sacarose estéril e as tratadas tiveram seu tratamento mantido por mais sete dias. Essas condições foram mantidas até os tempos determinados para análise da infecção, disseminação e potencial de transmissão para DENV-1. Todo o procedimento foi realizado em duplicata em momentos diferentes.

Figura 7. Representação do sistema *Glytube*



Fonte: Costa-da-Silva et al. (2013)

Nota: ^ADesenho detalhado mostrando os materiais e elementos usados para preparar o dispositivo. ^B Desenho representando a visão do *Glytube* montado.

7.4.5 Extração do RNA Total

Foram coletados de forma individual, abdômen, tórax, cabeça e *pool* de glândulas salivares de 10 mosquitos das espécies em análise, todo esse procedimento foi feito em duplicata biológica. No material coletado foi extraído o RNA total usando Trizol seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen Cat N° 10296-010), adicionado 500 µL de trizol, logo em seguida, o material foi lisado utilizando-se pistilo estéril livre de DNases e RNases e foi homogeneizado. Em seguida, o RNA foi centrifugado a 14.000 RPM por 20 min à 4°C, após a centrifugação cerca de 100 µL do sobrenadante foi retirado e alocado em novo microtubo. Posteriormente foi adicionado 100 µL de clorofórmio, então o material foi centrifugado novamente a 14.000 RPM por 20 min à 4°C. O sobrenadante foi retirado e alocado em um novo microtubo e então foi adicionado isopropanol na mesma quantidade recuperada do sobrenadante. A solução foi homogeneizada gentilmente e o material foi armazenado por uma hora a -20°C. Decorrido o tempo, foi centrifugado por dez minutos nas mesmas condições de temperatura e rotação anterior, descartando em seguida, o sobrenadante e adicionando 500 µL de etanol 75%. O material foi armazenado em freezer a -20°C por uma hora. Decorrido o tempo, ocorreu uma nova centrifugação durante 5 min em uma rotação de 7.500 rpm. Logo após a centrifugação, foi realizada a retirada do etanol e o material foi deixado para secagem em temperatura ambiente por 15 min. Ao final da secagem, o RNA extraído foi ressuscitado em 20 µL de água ultrapura (Sigma). Após a ressuspensão, o RNA foi tratado com DNase (DNase I-Sigma, Cat N ° AMPD1-1KT), 8 µL de amostra de RNA foi colocada em um tubo de PCR de 200 µL, no qual foi adicionado 1 µL de tampão 10x e 1 µL de DNase 1. Em seguida, ocorreu incubação a temperatura ambiente por 15 min e então foi adicionado 1 µL de solução de parada da DNase. Um novo período de incubação foi realizado por 10 min à 70°C e foi quantificado no Nanodrop (New Nanodrop – Cellpian) a partir de uma alíquota de 1 µL da amostra. Após a quantificação as amostras foram armazenadas no deep freezer (-80°C). Essas amostras de RNA foram utilizadas para análise da taxa de infecção, disseminação, potencial de transmissão do DENV-1 e análises de expressão gênica.

7.4.6 Análise da taxa de infecção, disseminação e potencial de transmissão do DENV- 1

Para cada grupo das espécies em estudo foram analisados 10 mosquitos no 4° e 7° dia pós-infecção (dpi). Os abdomens/tórax foram utilizados para analisar a taxa de infecção (TI) e a cabeça foi utilizada para avaliar a taxa de disseminação da infecção (TDI) de forma individual para cada mosquito. Para a avaliação do potencial de transmissão viral (PTV) foi analisado em um *pool* de 10 glândulas salivares. O cálculo da porcentagem da TI corresponde ao número de mosquitos com abdômen/tórax infectados com DENV-1 dividido pelo número de mosquitos usados para cada experimento (10 mosquitos) expostos a alimentação infecciosa. Para o cálculo da TDI será considerado o número de cabeça de mosquitos com a presença do DENV-1, dividido pelo número dos mosquitos positivos, na TI e para avaliar o PTV foi observado presença ou ausência do vírus no *pool* de glândulas salivares.

Todas as amostras utilizadas tiveram seu RNA extraído de acordo com item 7.4.5. Para detecção do DENV-1, utilizamos os primers referente ao gene NS5: Forward: 5'-GGAAGGAGAAGGACTGCACA-3' e Reverse: 5'-ATTCTTGTGTCCCATCCTGCT-3', descritos por Kong et al. (2006). Para a detecção dos referidos genes, foi utilizado o Kit QuantiFast SYBR Green, One-Step qRT-PCR, no qual foram adicionados 2 µL da amostra com concentração de 100 ng/µL de RNA de interesse em 5 µL de SYBR Green RT-PCR Master mix, 0.1 µL de QuantiFast RT mix e 2.9 µL de água RNase-Free, totalizando um volume final de 10 µL. A programação do qRT-PCR foram submetidas as seguintes condições: transcrição reversa a 50 °C por 10 min, etapa de ativação da PCR a 95 °C por 5 min, em seguida 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 seg, anelamento e extensão a 63 °C por 30 seg. O equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) foi utilizado para avaliar a presença do DENV-1 através da detecção do amplicons gerados pelos primers referentes ao gene NS5.

7.5 Avaliação da expressão de Defensina A e Cecropina A

Para a avaliação da expressão diferencial da Defensina A e Cecropina A foram utilizados primers que amplificam uma região de 96 e 109 pb,

respectivamente, para *Ae. aegypti* (Quadro 1) e uma região de 190 e 181 pb, respectivamente para *Cx. quinquefasciatus* (Quadro 2). Os primers para *Cx. quinquefasciatus* foram construídos pelo programa NCBI/Primer-BLAST.

Quadro 1 - Sequência dos primers utilizados para quantificação de Defensina A e Cecropina A em fêmeas de *Aedes aegypti*.

Referência	Primers	Sequência	Amplicon (pb)
(CHO et al., 1996)	Def-A Forward	5'-GCCACCTGTGATCTGCTGAGCGGA-3'	96
	Def-A Reverse	5'-GGAGTTGCAGTAGCCTCCCCGAT-3'	
(LOWENBERGER et al., 1999)	Cec-A Forward	5'-ATTTCTCCTGATCGCCGTGGCTG-3'	109
	Cec-A Reverse	5'-GAGCCTTCTCGGCGGCATTGAA-3'	
(XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008)	S7 Forward	5'-GGGACAAATCGGCCAGGCTATC-3'	
	S7 Reverse	5'-TCGTGGACGCTTCTGCTTGTTG-3'	

Fonte: O autor.

Quadro 2 - Sequência dos primers utilizados para quantificação de Defensina A e Cecropina A em fêmeas de *Culex quinquefasciatus*.

Referência	Primers	Sequência	Amplicon (pb)
XM_001842893.1	Def-A Forward	5' – TTGCCGTTTTGTGCCTGTTT – 3'	190
	Def-A Reverse	5' – TCGTTGACGCCCAATCCAC – 3'	
XM_001861705.1	Cec-A Forward	5' - TCGAAACTCCTCCCAGCTCT – 3'	181
	Cec-A Reverse	5' – GTGCCTTTTCCGATGCCTTG – 3'	
(REID et al., 2012)	18S rRNA Forward	5'- CGCGGTAATTCCAGCTCCACTA-3'	
	18S rRNA Reverse	5'- GCATCAAGCGCCACCATATAGG-3'	

Fonte: O autor.

A qRT-PCR (PCR quantitativa) foi realizada com amostras de cDNA gerada a partir do RNA obtido em 10 mosquitos de laboratório individualmente tratados e não tratados com antibióticos, infectados e não infectados com DENV-1, avaliados no 4° e 7° dpi. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 500 ng de amostras de RNA, utilizando Oligo (dT) 20 (Promega) e transcriptase reversa AMV (Promega) seguindo o protocolo do fabricante. No primeiro passo, o RNA tratado com DNase, foi usado 8 µL de cada amostra e adicionado a ele 5 µL do Oligo (dT) e incubado a 70 °C por cinco minutos. A segunda etapa consistiu na adição de um mix formado por 3 µL de tampão 5 x, 0,75 µL de dNTPs e 0,37 µL RNAsin e 0,6 µL de M-MLVRT (transcriptase reversa), em seguida foi levado a solução ao termociclador a uma temperatura de 42°C por uma hora. O cDNA produzido foi utilizado para expressão gênica dos genes alvos.

A expressão gênica foi realizada utilizando Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), de acordo com as instruções do fabricante, no qual foram adicionados 2 µL da amostra com concentração de 100 ng/µL de RNA de interesse em 5 µL de Power SYBR Green Master mix e 8 µL de água RNase-Free, totalizando um volume final de 15 µL. O equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) foi utilizado para obtenção da expressão de Defensina A e Cecropina A. A programação da RT-qPCR apresentou as seguintes condições: transcrição reversa a 50 °C por 10 min, PCR por ativação a 95 °C por 5 min, em seguida 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 seg, anelamento e extensão a 60 °C por 30 seg.

As sequências de primers para *Ae. aegypti* estão listados no quadro 1 e para *Cx. quinquefasciatus* estão listados no quadro 2. O gene ribossomal da proteína S7 e o gene da proteína ribossomal 18S foi usado como gene endógeno para normalização da qPCR. Foram realizadas duas repetições biológicas independentes e todas as reações de PCR foram realizadas em triplicata técnica. A expressão das Defensina A e Cecropina A foram avaliadas no software SDS 7500 v. 2.0 e sua expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

7.5.1 Análises dos dados

Foi aplicado teste ANOVA, com pós teste de Dunnett para a análise comparativa da expressão gênica de Def-A e Cec-A , usando o software GraphPad Prism Versão 5.0.1

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho não envolve diretamente pesquisa com seres humanos e animais de laboratório. Sendo assim não se fez necessário obter o parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

9 RESULTADOS

Diante das metodologias utilizadas na avaliação da microbiota, dinâmica viral e expressão de Defesina A e Cecropina A em *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* tratados e não tratados com gentamicina, penicilina e estreptomicina obtivemos os seguintes resultados.

9.1 Microbiota de *Cx. quinquefasciatus* (laboratório e silvestre)

Ao todo, 64 isolados bacterianos foram obtidos e usados para identificação no MALDI-TOF, sendo 39 isolados de mosquitos de laboratório (Quadro 3) e 25 isolados de mosquitos silvestres (Quadro 4). Foi observado que cerca de 90% dos isolados foram identificados ao nível de gênero, (58 de 64 isolados) apresentaram uma identificação positiva de acordo com as especificações do fabricante do software ($score \geq 1,7$). Os seis isolados não identificados, não apresentaram $score$ viáveis para identificação ($score < 1,7$).

As bactérias identificadas em mosquitos de laboratório estão representadas por oito gêneros (*Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Raoultella* e *Sphingobacterium*), enquanto as identificadas em mosquitos silvestres estão representadas por seis gêneros (*Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Serratia* e *Staphylococcus*).

Quadro 3 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de *Culex quinquefasciatus* de laboratório considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.

Número do isolado	Código	Identificação do MALDI-TOF	Score
1	CX.LAB.03.4	<i>Achromobacter piechaudii</i>	1.919
2	CX.LAB.10.2	<i>Achromobacter piechaudii</i>	1.877
3	CX.LAB.01.5	<i>Acinetobacter baily</i>	1.788
4	CX.LAB.03.3	<i>Acinetobacter baily</i>	1.978
5	CX.LAB.04.1	<i>Acinetobacter baily</i>	1.902
6	CX.LAB.05.1	<i>Acinetobacter baily</i>	1.779
7	CX.LAB.07.2	<i>Acinetobacter baily</i>	1.818
8	CX.LAB.08.2	<i>Acinetobacter baily</i>	1.734
9	CX.LAB.10.1	<i>Acinetobacter baily</i>	1.954
10	CX.LAB. 01.3	<i>Chryseobacterium gleum</i>	2.042
11	CX.LAB.04.4	<i>Chryseobacterium gleum</i>	1.836
12	CX.LAB.06.2	<i>Chryseobacterium gleum</i>	1.981
13	CX.LAB.01.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.785
14	CX.LAB.02.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.904
15	CX.LAB.04.5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.940
16	CX.LAB.07.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.845
17	CX.LAB.03.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.402
18	CX.LAB.04.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.392
19	CX.LAB.06.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.898
20	CX.LAB.09.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.281
21	CX.LAB.10.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.149
22	CXLAB.01.1	Não identificada	-
23	CXLAB.04.1	Não identificada	-
24	CXLAB.04.2	Não identificada	-
25	CXLAB. 10.4	Não identificada	-
26	CX.LAB.01.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.966
27	CX.LAB.02.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.931
28	CX.LAB.05.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.799
29	CX.LAB.06.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.901
30	CX.LAB.08.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.947
31	CX.LAB.09.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.899
32	CX.LAB.03.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.769
33	CX.LAB.05.4	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.903
34	CX.LAB.09.3	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.941
35	CX.LAB.05.3	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1.906
36	CX.LAB.01.4	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.888
37	CX.LAB.03.5	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.950
38	CX.LAB.04.3	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.832
39	CX.LAB.07.1	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.893

Fonte: O autor

Nota: Score $\geq 1,7$, identificação positiva dos isolados ao nível de gênero. Score $< 1,7$, isolado não identificado.

Quadro 4 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de *Culex quinquefasciatus* silvestres considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.

Número do isolado	Código	Identificação do MALDI-TOF	Score
1	CX.WILD.09.2	<i>Bacillus cereus</i>	1.922
2	CX.WILD.02.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.755
3	CX.WILD.03.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.831
4	CX.WILD.05.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.849
5	CX.WILD.07.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.978
6	CX.WILD.09.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.032
7	CX.WILD.10.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.991
8	CX.WILD.05.1	Não identificada	-
9	CX.WILD.05.2	Não identificada	-
10	CX.WILD.01.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.911
11	CX.WILD.02.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.883
12	CX.WILD.04.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.903
13	CX.WILD.04.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	2.073
14	CX.WILD.05.4	<i>Serratia ureilytica</i>	1.743
15	CX.WILD.06.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.971
16	CX.WILD.07.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.945
17	CX.WILD.08.1	<i>Serratia ureilytica</i>	1.879
18	CX.WILD.10.3	<i>Serratia ureilytica</i>	1.802
19	CX.WILD.01.1	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.842
20	CX.WILD.03.2	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.809
21	CX.WILD.08.2	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.975
22	CX.WILD.10.2	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.870
23	CX.WILD.01.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.933
24	CX.WILD.04.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.794
25	CX.WILD.06.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.910

Fonte: O autor

Nota: Score $\geq 1,7$, identificação positiva dos isolados ao nível de gênero. Score $< 1,7$, isolado não identificado.

9.2 Microbiota de *Ae. aegypti* (laboratório e silvestre)

Ao todo, 65 isolados bacterianos foram obtidos e usados para identificação no MALDI-TOF, sendo 34 isolados de mosquitos de laboratório (Quadro 5) e 31 isolados de mosquitos silvestres (Quadro 6). Foi observado que mais de 90% dos isolados foram identificados ao nível de gênero, 60 de 65 isolados apresentaram uma identificação positiva de acordo com as especificações do fabricante do software (score $\geq 1,7$). Os cinco isolados não identificados não apresentaram score viáveis para identificação (score $< 1,7$).

As bactérias identificadas em mosquitos de laboratório estão representadas por seis gêneros (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Elizabethkingia*, *Ewingella*, *Rahnella* e *Serratia*), enquanto as identificadas em mosquitos silvestres estão representadas

por seis gêneros (*Burkholderia*, *Cedecea*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Rahnella* e *Serratia*).

Quadro 5 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de *Aedes aegypti* de laboratório considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.

Número do isolado	Código	Identificação do MALDI-TOF	Score
1	AE.LAB.01.3	<i>Aeromonas caviae</i>	1.966
2	AE.LAB.04.5	<i>Aeromonas caviae</i>	1.932
3	AE.LAB.05.3	<i>Aeromonas caviae</i>	1.993
4	AE.LAB.06.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.849
5	AE.LAB.08.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.922
6	AE.LAB.09.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.890
7	AE.LAB.10.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.793
8	AE.LAB.04.4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.977
9	AE.LAB.06.2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.904
10	AE.LAB.07.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.829
11	AE.LAB.01.2	<i>Bacillus cereus</i>	1.830
12	AE.LAB.02.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.951
13	AE.LAB.06.3	<i>Bacillus cereus</i>	1.908
14	AE.LAB.02.2	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.774
15	AE.LAB.04.6	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.723
16	AE.LAB.05.2	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.981
17	AE.LAB.07.3	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.988
18	AE.LAB.09.5	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.854
19	AE.LAB.10.3	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.915
20	AE.LAB.03.1	<i>Ewingella americana</i>	1.741
21	AE.LAB.04.1	<i>Ewingella americana</i>	1.812
22	AE.LAB.05.1	<i>Ewingella americana</i>	1.940
23	AE.LAB.09.2	<i>Ewingella americana</i>	1.894
24	AE.LAB.10.4	<i>Ewingella americana</i>	1.911
25	AE.LAB.04.3	Não identificada	-
26	AE.LAB.08.2	Não identificada	-
27	AE.LAB.10.2	Não identificada	-
28	AE.LAB.01.1	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.986
29	AE.LAB.03.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.970
30	AE.LAB.05.4	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.866
31	AE.LAB.09.4	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.796
32	AE.LAB.04.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.902
33	AE.LAB.07.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.957
34	AE.LAB.09.3	<i>Serratia ureilytica</i>	2.159

Fonte: O autor

Nota: Score $\geq 1,7$, identificação positiva dos isolados ao nível de gênero. Score $< 1,7$, isolado não identificado.

Quadro 6 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de *Aedes aegypti* silvestre considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.

Número do isolado	Código	Identificação do MALDI-TOF	Score
1	AE.WILD.02.3	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.944
2	AE.WILD.06.4	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.981
3	AE.WILD.08.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.878
4	AE.WILD.05.2	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.908
5	AE.WILD.08.4	<i>Cedecea lapagei</i>	1.922
6	AE.WILD.09.1	<i>Cedecea lapagei</i>	1.748
7	AE.WILD.10.3	<i>Cedecea lapagei</i>	1.871
8	AE.WILD.02.1	<i>Micrococcus luteus</i>	1.711
9	AE.WILD.04.2	<i>Micrococcus luteus</i>	1.934
10	AE.WILD.06.1	<i>Micrococcus luteus</i>	1.893
11	AE.WILD.07.1	<i>Micrococcus luteus</i>	1.951
12	AE.WILD.09.2	<i>Micrococcus luteus</i>	1.807
13	AE.WILD.10.4	<i>Micrococcus luteus</i>	1.911
14	AE.WILD.05.1	Não identificada	-
15	AE.WILD05.3	Não identificada	-
16	AE.WILD.01.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.965
17	AE.WILD.04.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.949
18	AE.WILD.07.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.823
19	AE.WILD.08.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.780
20	AE.WILD.10.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.855
21	AE.WILD.01.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.947
22	AE.WILD.03.1	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.932
23	AE.WILD.09.4	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.876
24	AE.WILD.06.3	<i>Serratia marcescens</i>	1.842
25	AE.WILD.07.2	<i>Serratia marcescens</i>	1.891
26	AE.WILD.08.2	<i>Serratia marcescens</i>	1.938
27	AE.WILD.09.3	<i>Serratia marcescens</i>	1.972
28	AE.WILD.02.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.912
29	AE.WILD.03.2	<i>Serratia ureilytica</i>	2.134
30	AE.WILD.06.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.879
31	AE.WILD.10.1	<i>Serratia ureilytica</i>	2.034

Fonte: O autor

Nota: Score $\geq 1,7$, identificação positiva dos isolados ao nível de gênero. Score $< 1,7$, isolado não identificado.

9.3 Microbiota de *Ae. albopictus* (laboratório e silvestre)

Ao todo, 67 isolados bacterianos foram obtidos e usados para identificação no MALDI-TOF, sendo 38 isolados de mosquitos de laboratório (Quadro 7) e 28 isolados de mosquitos silvestres (Quadro 8). Foi observado que mais de 88% dos isolados foram identificados ao nível de gênero, 59 de 67 isolados apresentaram uma identificação positiva de acordo com as especificações do fabricante do software (score $\geq 1,7$). Os oitos isolados não identificados não apresentaram score viáveis para identificação (score $< 1,7$). As bactérias identificadas em mosquitos de

laboratório estão representadas por oito gêneros (*Achromobacter*, *Aeromonas*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Rahnella* e *Raoultella*), enquanto as identificadas em mosquitos silvestres estão representadas por sete gêneros (*Bacillus*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Rahnella* e *Staphylococcus*).

Quadro 7 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de *Aedes albopictus* de laboratório considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.

Número do isolado	Código	Identificação do MALDI-TOF	Score
1	ALB.LAB.02.2	<i>Achromobacter piechaudii</i>	1.993
2	ALB.LAB.05.1	<i>Achromobacter piechaudii</i>	1.873
3	ALB.LAB.01.1	<i>Aeromonas caviae</i>	2.181
4	ALB.LAB.02.3	<i>Aeromonas caviae</i>	1.745
5	ALB.LAB.06.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.902
6	ALB.LAB.08.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.931
7	ALB.LAB.01.2	<i>Ewingella americana</i>	1.935
8	ALB.LAB.02.1	<i>Ewingella americana</i>	1.811
9	ALB.LAB.03.3	<i>Ewingella americana</i>	1.879
10	ALB.LAB.05.2	<i>Ewingella americana</i>	1.829
11	ALB.LAB.06.4	<i>Ewingella americana</i>	1.906
12	ALB.LAB.07.4	<i>Ewingella americana</i>	1.918
13	ALB.LAB.09.2	<i>Ewingella americana</i>	1.893
14	ALB.LAB.10.1	<i>Ewingella americana</i>	1.867
15	ALB.LAB.04.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.212
16	ALB.LAB.07.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.237
17	ALB.LAB.08.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.127
18	ALB.LAB.01.3	<i>Micrococcus luteus</i>	2.058
19	ALB.LAB.02.4	<i>Micrococcus luteus</i>	1.854
20	ALB.LAB.06.5	<i>Micrococcus luteus</i>	2.098
21	ALB.LAB.08.4	<i>Micrococcus luteus</i>	1.944
22	ALB.LAB.09.1	<i>Micrococcus luteus</i>	1.872
23	ALB.LAB.10.6	<i>Micrococcus luteus</i>	1.807
24	ALB.LAB.06.3	Não identificada	-
25	ALB.LAB.08.5	Não identificada	-
26	ALB.LAB.07.2	Não identificada	-
27	ALB.LAB.09.4	Não identificada	-
28	ALB.LAB.10.3	Não identificada	-
29	ALB.LAB.03.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.707
30	ALB.LAB.04.2	<i>Pantoea dispersa</i>	2.179
31	ALB.LAB.08.2	<i>Pantoea dispersa</i>	2.055
32	ALB.LAB.10.5	<i>Pantoea dispersa</i>	1.887
33	ALB.LAB.03.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.799
34	ALB.LAB.06.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.752
35	ALB.LAB.07.5	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.949
36	ALB.LAB.09.3	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.937
37	ALB.LAB.10.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.891
38	ALB.LAB.02.5	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1.936
39	ALB.LAB.05.3	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2.064

Fonte: O autor

Nota: Score $\geq 1,7$, identificação positiva dos isolados ao nível de gênero. Score $< 1,7$, isolado não identificado.

Quadro 8 - Lista de bactérias identificadas no intestino médio de *Aedes albopictus* silvestre considerando os scores padrão do desenvolvedor do software.

Número do isolado	Código	Identificação do MALDI-TOF	Score
1	ALB.WILD.01.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.833
2	ALB.WILD.05.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.949
3	ALB.WILD.07.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.902
4	ALB.WILD.08.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.840
5	ALB.WILD.02.4	<i>Ewingella americana</i>	1.973
6	ALB.WILD.05.2	<i>Ewingella americana</i>	1.989
7	ALB.WILD.01.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.835
8	ALB.WILD.02.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.857
9	ALB.WILD.06.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.887
10	ALB.WILD.07.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.107
11	ALB.WILD.09.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.921
12	ALB.WILD.10.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.078
13	ALB.WILD.04.3	<i>Micrococcus luteus</i>	1.769
14	ALB.WILD.07.3	<i>Micrococcus luteus</i>	1.791
15	ALB.WILD.08.3	<i>Micrococcus luteus</i>	1.901
16	ALB.WILD.01.2	Não identificada	-
17	ALB.WILD.04.2	Não identificada	-
18	ALB.WILD.10.3	Não identificada	-
19	ALB.WILD.01.4	<i>Pantoea dispersa</i>	2.278
20	ALB.WILD.02.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.904
21	ALB.WILD.05.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.934
22	ALB.WILD.09.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.991
23	ALB.WILD.10.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.858
24	ALB.WILD.04.1	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.938
25	ALB.WILD.06.3	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.964
26	ALB.WILD.02.3	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.973
27	ALB.WILD.06.1	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.779
28	ALB.WILD.08.2	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.753

Fonte: O autor

Nota: Score $\geq 1,7$, identificação positiva dos isolados ao nível de gênero. Score $< 1,7$, isolado não identificado.

9.4 Resumo da identificação bacteriana

As bactérias isoladas do intestino médio de *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são representadas por quatros filos, sete classes e 17 gêneros (Quadro 9). O filo mais abundante foi Proteobacteria, cujo a maioria pertence a classe γ -proteobacteria e o gênero mais presente foi *Klebsiella* seguido por *Pantoea*.

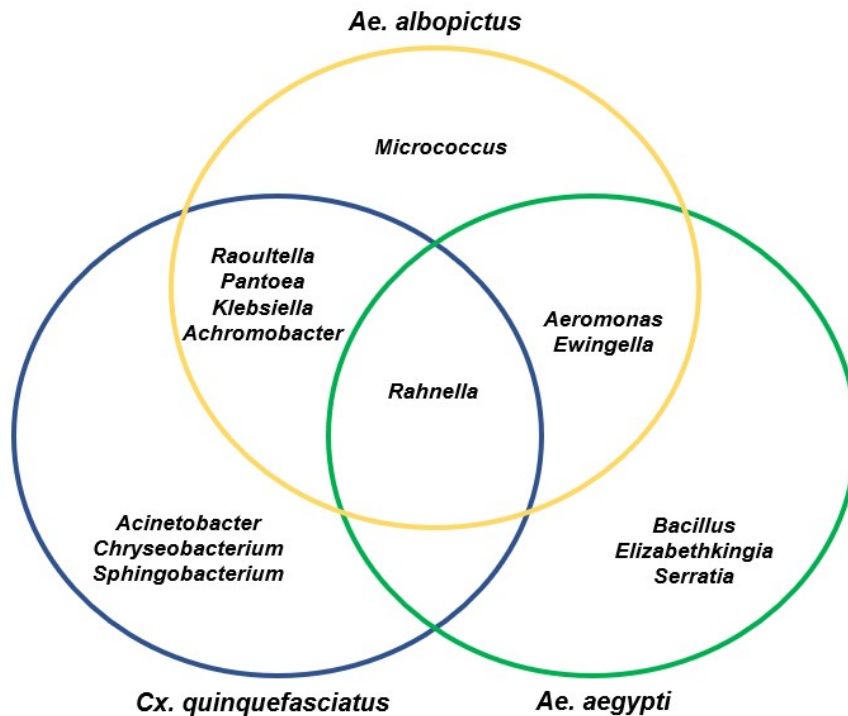
Quadro 9 - Resumo da identificação bacteriana associada as espécies de mosquitos estudadas.

Filo	Classe	Gênero	Total de isolados identificados
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	15
Firmicutes	Bacilli	<i>Bacillus</i>	4
Firmicutes	Bacilli	<i>Staphylococcus</i>	10
Bacteroidetes	Flavobacteria	<i>Chryseobacterium</i>	3
Bacteroidetes	Flavobacteria	<i>Elizabethkingia</i>	6
Bacteroidetes	Sphingobacteria	<i>Sphingobacterium</i>	4
Proteobacteria	β -Proteobacteria	<i>Achromobacter</i>	4
Proteobacteria	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	4
Proteobacteria	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	7
Proteobacteria	γ -Proteobacteria	<i>Cedecea</i>	3
Proteobacteria	γ -Proteobacteria	<i>Ewingella</i>	15
Proteobacteria	γ -Proteobacteria	<i>Klebsiella</i>	24
Proteobacteria	γ -Proteobacteria	<i>Pantoea</i>	23
Proteobacteria	γ -Proteobacteria	<i>Rahnella</i>	18
Proteobacteria	γ -Proteobacteria	<i>Raoultella</i>	3
Proteobacteria	γ -Proteobacteria	<i>Serratia</i>	16
Proteobacteria	δ -Proteobacteria	<i>Aeromonas</i>	14

Fonte: O autor

Entre os mosquitos de laboratório, o gênero *Rahnella* foi a única bactéria semelhante entre as três espécies estudadas. *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. albopictus* apresentaram 4 gêneros bacterianos semelhantes (*Raoultella*, *Pantoea*, *Klebsiella* e *Achromobacter*). Em *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*, dois gêneros (*Aeromonas* e *Ewingella*) bacterianos foram semelhantes. Os dados acima encontram-se na figura 8.

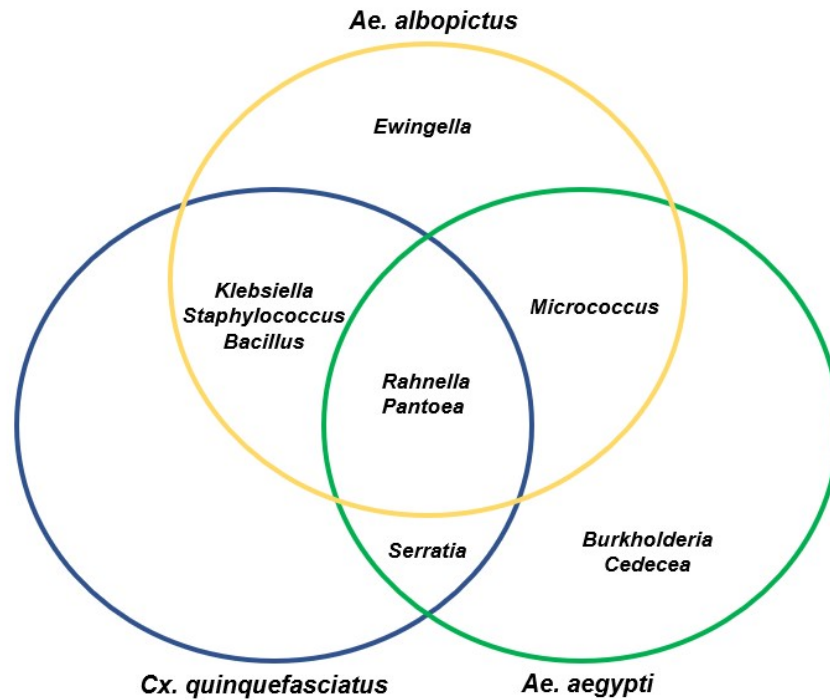
Figura 8 – Comparação entre os gêneros bacterianos encontrados nos mosquitos de laboratório.



Fonte: O autor.

Entre os mosquitos silvestres, o gênero *Pantoea* e *Rahnella* foram as bactérias semelhantes entre as três espécies estudadas. *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. albopictus* apresentaram 3 gêneros bacterianos semelhantes (*Bacillus*, *Klebsiella* e *Staphylococcus*). Em *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, um gênero (*Serratia*) bacteriano foi semelhante e em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi encontrado também somente um gênero semelhante (*Micrococcus*). Os dados acima encontram-se na figura 9.

Figura 9 – Comparação entre os gêneros bacterianos encontrados nos mosquitos silvestres.



Fonte: O autor.

9.5 Percentual de inibição bacteriano do tratamento com antibióticos

Os mosquitos de laboratório de três dias após eclosão das pupas tratados com antibióticos diminuíram o número total de UFC encontradas no intestino médio das fêmeas, quando comparado com o grupo não tratado. Esse efeito foi observado em ambas as espécies, embora em *Cx. quinquefasciatus* a eliminação da microbiota natural foi quase completa (tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de inibição de bactérias do intestino médio por tratamento antibiótico (Gentamicina 100 µg/µL; Penicilina 100 U/µL e Estreptomicina 100 µg/µL) em fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. Quinquefasciatus*.

Mosquitos	CFU					
	Exp.1			Exp. 2		
	Não tratados	Tratados	PI* (%)	Não tratados	Tratados	PI* (%)
<i>Ae. aegypti</i>	4281	244	94,3	3351	286	91,4
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	3431	2	99,94	4817	4	99,91

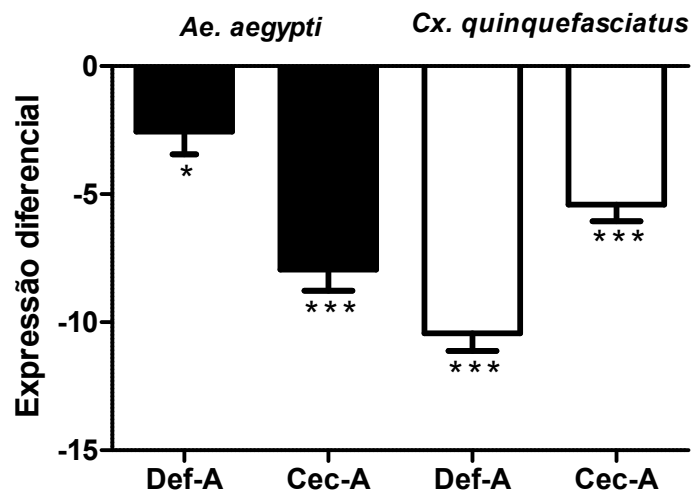
Fonte: O autor.

Nota: *Percentual de inibição (PI)

9.6 Expressão gênica da Defensina A e Cecropina A em mosquitos não infectados

A expressão relativa dos transcritos foi realizada em mosquitos tratados com antibióticos comparados com os mosquitos não tratados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os níveis de expressão para Def-A em *Ae. aegypti* caíram 2,56 vezes com desvio padrão de 0,88 e para Cec-A, caíram 7,94 vezes com desvio padrão de 1,85 (figura 10). Em *Cx. quinquefasciatus*, os níveis de Def-A caíram 10,43 vezes com desvio padrão de 1,51 e para Cec-A, caíram 5,41 com desvio padrão de 1,43 (figura 10).

Figura 10 - Expressão diferencial de Def-A e Cec-A em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* tratados com antibióticos.



Fonte: O autor.

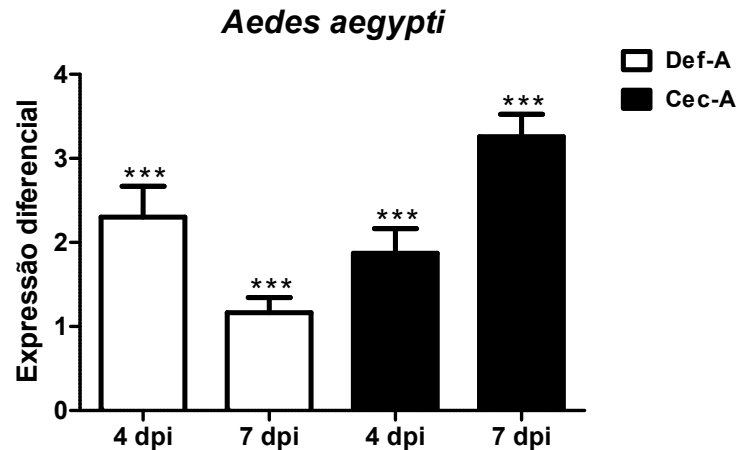
Nota: Cada barra representa a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata técnica. * ($P < 0,5$), ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$).

9.7 Expressão da Defensina A e Cecropina A em mosquitos infectados

A expressão relativa dos transcritos foi realizada em mosquitos tratados com antibióticos e infectados com DENV-1 comparados com os mosquitos não tratados infectados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo avaliada a expressão gênica durante o 4° e 7° dpi. Os níveis de expressão para Def-A em *Ae. aegypti* no 4° dpi aumentou 2.30 vezes com desvio padrão de 0.36 e para 7° dpi, aumentou 1.16 vezes com desvio padrão de 0.17 (figura 11). Para Cec-A, os níveis de expressão também

aumentaram, sendo um aumento de 1,87 vezes com desvio padrão de 0,29 para o 4° dpi e 3,25 vezes com desvio padrão de 0,26 para o 7° dpi (figura 11).

Figura 11 - Expressão diferencial de Def-A e Cec-A em *Ae. aegypti* tratados com antibióticos e infectados com DENV-1.

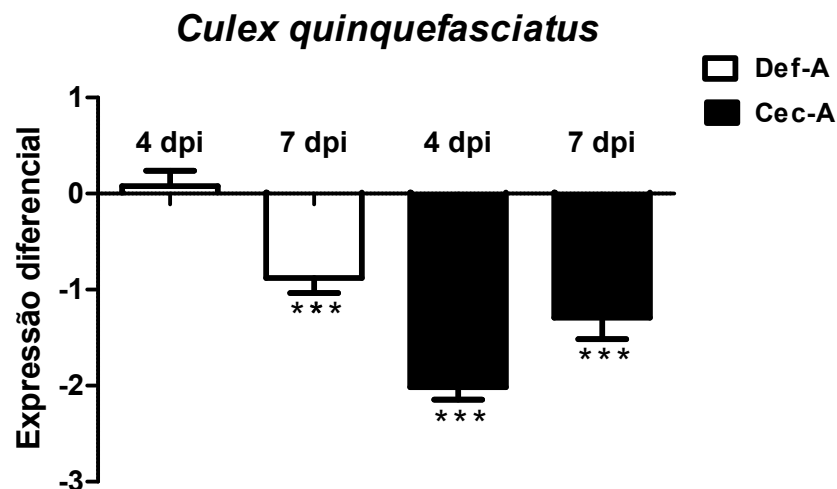


Fonte: O autor.

Nota: Cada barra representa a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata técnica. * ($P < 0,5$), ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$).

Os níveis de expressão em *Cx. quinquefasciatus* para Def-A no 4° dpi aumentou em 0,08 vezes com um desvio padrão de 0,15 e no 7°dpi diminuiu em 0,87 vezes com desvio padrão de 0,15 (figura 12). Para Cec-A, os níveis de expressão diminuiram no 4° dpi em 2,01 vezes com desvio padrão de 0,13 e no 7° dpi diminuiu 1,29 vezes com desvio padrão de 0,22 (figura 12).

Figura 12 - Expressão diferencial de Def-A e Cec-A em *Cx. quinquefasciatus* tratados com antibióticos e infectados com DENV-1.



Fonte: O autor.

Nota: Cada barra representa a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata técnica. * ($P < 0,5$), ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$).

9.8 Influência da microbiota na dinâmica viral do DENV-1

Os resultados para TI, TDI e PTV foram obtidos a partir de 10 mosquitos em duplicata experimental sendo TI e TDI de forma individual e o PTV através do *pool* de glândulas salivares. Os dados obtidos para *Cx. quinquefasciatus* mostram que no 4° e 7° dia pós-infecção (dpi), os mosquitos tratados e não tratados com antibióticos, não foi detectado o DENV-1 (tabela 2).

Entretanto, em *Ae. aegypti*, DENV-1 foi detectado em diferentes porcentagens nos mosquitos tratados e não tratados com antibióticos. Nos mosquitos tratados foi constatado aumento na TI e TDI em relação aos não tratados na duplicata experimental (tabela 3). Os resultados de TDI para *Ae. aegypti* não tratados comparados aos tratados com antibióticos e infectados com DENV-1 no 4° dpi foi observado um aumento relativo, porém no 7° dpi foi observado o valor de 100% em suas taxas de disseminação da infecção. Nas análises do PTV foi observado que no 4° dpi esse parâmetro foi positivo nos mosquitos tratados e negativo para os mosquitos não tratados e para o 7°dpi foi positivo nos dois grupos (tabela 10). Os resultados para *Ae. albopictus* não foram compilados nos resultados uma vez que o número de mosquitos engorgitados não foi o suficiente para desenvolver uma análise similar feita nas duas outras em estudo.

Tabela 2 - Estimativa da taxa de infecção (TI), taxa de disseminação (TDI) e potencial de transmissão viral (PTV) causada pelo DENV-1 em *Cx. quinquefasciatus* tratados e não tratados com antibióticos

Espécies do mosquito	Título do DENV-1 (PFU/mL)		TI (%) ^a				TDI (%) ^b				PTV ^c				
	Exp. 1	Exp 2	Exp. 1		Exp 2		Exp. 1		Exp 2		Exp. 1		Exp 2		
			4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi	
<i>Cx. quinquefasciatus</i> não tratados com antibióticos	5,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	N	N	N	N
<i>Cx. quinquefasciatus</i> tratados com antibióticos	5,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	0% (0/10)	N	N	N	N

Fonte: O autor.

Nota: ^aTI corresponde ao número de mosquitos com abdomen/tórax infectados com DENV-1 dividido pelo número de mosquitos exposto ao vírus. ^bTDI é o número de mosquitos com a cabeça infectada com DENV-1 dividido pelo número de mosquitos positivos para TI e o ^cPTV corresponde a presença do vírus em um pool de glândulas salivares.

Tabela 3 - Estimativa da taxa de infecção (TI), taxa de disseminação (TDI) e potencial de transmissão viral (PTV) causada pelo DENV-1 em *Ae. aegypti* tratados e não tratados com antibióticos

Espécies do mosquito	Título do DENV-1 (PFU/mL)		TI (%) ^a				TDI (%) ^b				PTV ^c			
	Exp. 1	Exp 2	Exp. 1		Exp 2		Exp. 1		Exp 2		Exp. 1		Exp 2	
			4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi	4 dpi	7 dpi
<i>Ae. aegypti</i> não tratados com antibióticos	5,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	60% (6/10)	70% (7/10)	40% (4/10)	60% (6/10)	33,3% (2/6)	85,7% (6/7)	50% (2/4)	83,3% (5/6)	N	P	N	P
<i>Ae. aegypti</i> tratados com antibióticos	5,0 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	80% (8/10)	80% (8/10)	70% (7/10)	80% (8/10)	87,5% (7/8)	100% (8/8)	85,7% (6/7)	100% (8/8)	P	P	P	P

Fonte: O autor.

Nota: ^aTI corresponde ao número de mosquitos com abdomen/tórax infectados com DENV-1 dividido pelo número de mosquitos exposto ao vírus. ^bTDI é o número de mosquitos com a cabeça infectada com DENV-1 dividido pelo número de mosquitos positivos para TI e o ^cPTV corresponde a presença do vírus em um pool de glândulas salivares.

10 DISCUSSÃO

Neste trabalho, analisamos a diferença entre a microbiota do intestino médio de mosquitos de laboratório e silvestres utilizando MALDI-TOF MS. Esta técnica difere da maioria dos outros estudos que utilizaram abordagens moleculares baseadas na análise de sequências de RNA ribossômico 16S (MINARD et al., 2014; MUTURI et al., 2016, 2017; YADAV et al., 2015). No entanto, MALDI-TOF MS é uma técnica rápida, tem alta precisão, é menos dispendiosa do que os métodos de detecção de base molecular e imunológica e não requer pessoal de laboratório treinado e nem interpretação de software poderosa (SINGHAL et al., 2015). Embora o MALDI-TOF MS esteja limitado a identificar apenas bactérias cultiváveis (SANTOS; HILDENBRAND; SCHUG, 2016), o uso dessa técnica para identificar a microbiota pode ser encontrado em estudos de diferentes espécies de artrópodes, como as abelhas (GASPER et al., 2017; PRAET et al., 2016), besouros (PERLATTI et al., 2017; WANG; ROZEN, 2017) e pulgas (EL HAMZAOUI et al., 2018). Seguindo esta linha de pesquisa, outros estudos incluíram os mosquitos de importância médica, dentre eles: *Anopheles gambiae*, *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. Albopictus* (TANDINA et al., 2016). Em nosso estudo, verificamos a microbiota de *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. albopictus* e *Ae. Aegypti* (laboratório e silvestre).

Através de técnicas cultiváveis e identificação por MALDI-TOF MS, este trabalho revela uma microbiota diversificada, em que 90.40% dos isolados foram identificados. O filo Proteobacteria apresentou a maior frequência em mosquitos de laboratório e silvestres, com a maioria das bactérias pertencentes à classe γ -Proteobacteria. Esses resultados são semelhantes a outro estudo que utilizou MALDI-TOF MS para detectar microbiota em mosquitos de importância médica (TANDINA et al., 2016). Outros estudos cujo o sequenciamento de genes ribossômicos 16S foi utilizado para detectar microbiota, também mostraram que o filo Proteobacteria foi predominante (MINARD et al., 2014; MUTURI et al., 2016; YADAV et al., 2015).

Comparando-se os mosquitos criados em laboratório com os mosquitos silvestres, observamos três gêneros bacterianos em comum para *Cx. quinquefasciatus*. Em *Ae. aegypti*, encontramos dois gêneros em comum e para *Ae.*

albopictus, cinco gêneros em comum foram observados. A baixa semelhança mostrada na microbiota do intestino médio entre mosquitos de laboratório e silvestres sugerem que o ambiente desempenha um papel importante na diversidade de gêneros bacterianos, especialmente em *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*. Estes resultados correlacionam-se com outros estudos que citam as condições ambientais dos vetores determinantes e fundamentais na formação da microbiota do intestino médio (BOISSIÈRE et al., 2012; MUTURI et al., 2017; TANDINA et al., 2016; ZOUACHE et al., 2011). Entre *Ae. albopictus* criados no laboratório e os capturados no campo, foi observado cinco gêneros em comum, de sete possibilidades. Essa semelhança em nossos resultados sugere que mais estudos são necessários para avaliar se as circunstâncias ambientais são, de fato, não determinantes na moldagem da microbiota de *Ae. albopictus*.

Uma análise da microbiota obtida em comparação interespecífica dos mosquitos mostra que *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. albopictus* apresentam o maior número de gêneros bacterianos semelhantes entre as espécies de mosquitos estudadas, especialmente em mosquitos silvestres. Nossos resultados diferem dos achados de Tandina *et al.* (2016), cujo mosquitos *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. albopictus* silvestres apresentaram apenas um único gênero bacteriano em comum. Estudos envolvendo mosquitos de outras regiões são necessários para entender se essa alta similaridade de gêneros bacterianos entre a *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. albopictus* encontradas em nosso estudo será mantida. Além disso, também é importante avaliar se os mosquitos dessas espécies criados em diferentes laboratórios também mantêm a alta similaridade de gêneros bacterianos.

Entre todas as bactérias identificadas, o gênero *Rahnella* esteve presente em todas as espécies de mosquitos, tanto do laboratório como silvestre. Bactérias do gênero *Rahnella* estão entre os patógenos frequentes em humanos (MARTINS et al., 2015), mas seu efeito sobre os mosquitos é desconhecido. *Bacillus*, *Ewingella*, *Micrococcus*, *Klebsiella* e *Pantoea* foram os gêneros que predominaram entre os mosquitos estudados. Estes dados fornecem uma base para estudos futuros no impacto que cada gênero bacteriano encontrado tem sobre o ciclo biológico dos mosquitos, bem como a interação de patógenos nesses vetores. Porém, as bactérias com baixa incidência em nosso estudo não podem ser excluídas de estudos futuros.

No presente estudo foi verificado também a influência da microbiota na expressão de importantes AMPs. Fêmeas de *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* sem microbiota expressaram níveis inferiores de Defensina A e Cecropina A em resposta ao tratamento antibiótico, resultando em uma diminuição da expressão desses AMPs. Nossos resultados corroboram com outros estudos que afirmam a existência de uma relação entre a microbiota intestinal e a indução da expressão de alguns peptídeos da resposta imune, como observado em *Anopheles gambiae* (BEIER et al., 1994; RICHMAN et al., 1997) e *Ae. aegypti* (XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008). Permitindo assim, conectar a microbiota de mosquitos com ativação das vias de sinalização, uma vez que essas vias são importantes para a modulação da expressão de genes do sistema imune (JUPATANAKUL; SIM; DIMOPOULOS, 2014; SIM; JUPATANAKUL; DIMOPOULOS, 2014).

Em seguida, fizemos uma infecção de DENV-1 em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* tratados com antibióticos comparado aos não tratados para avaliar a expressão de Def-A e de Cec-A no 4° e 7° dpi. Os resultados para *Ae. aegypti* mostram que a expressão de Def-A e Cec-A aumentou em mosquitos tratados quando comparada não tratados no 4° e 7° dpi. Esta maior expressão de AMPs em mosquitos tratados é esperada, uma vez que a ausência ou baixa incidência de microbiota faz com que o nível basal desses peptídeos sejam baixos (CHENG et al., 2016; XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008). Logo, o mosquito tratado tende a ter uma maior expressão destes AMPs quando ocorre uma nova infecção. Os resultados de *Cx. quinquefasciatus* foram diferentes em relação àqueles encontrados em *Ae. aegypti*. *Cx. quinquefasciatus* tratado com antibióticos e infectado com o DENV-1 teve uma diminuição na expressão dos AMPs.

Sabendo que os mosquitos tratados têm uma diminuição na expressão de Def-A e Cec-A, e que quando infectados com DENV-1 essa expressão tem comportamento antagônicos nas espécies de mosquito estudadas, comparamos a dinâmica viral da infecção por DENV-1 em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* tratados e não tratados com antibióticos. Para *Cx. quinquefasciatus*, não houve alteração na dinâmica da infecção por DENV-1 mesmo em mosquitos tratados, consequentemente a redução na expressão, como foi mostrado nos resultados da expressão, de importantes genes imunes não foi determinante para que a infecção por vírus da dengue se tornasse viável. Portanto, como não existe infecção ativa no

4° e 7° dpi, os níveis de expressão de Def-A e Cec-A tendem a diminuir devido a remoção da microbiota. De acordo com Kumar et al. (2018) outros fatores como a compartimentação do vírus pela matriz peritrófica, a digestão dos patógenos por enzimas do intestino médio e a ausência de receptores de superfície no epitélio do intestino, sugerem que o intestino médio, como barreira da infecção, é o mecanismo mais importante envolvido na refratariedade desta espécie de mosquito ao vírus da dengue.

Alguns estudos sugerem que a microbiota pode modular a resposta imune do inseto e influenciar a infecção do patógeno em mosquitos (DENNISON et al., 2014; LIU et al., 2017; SARAIVA et al., 2016) e outros estudos demonstraram que a remoção da maioria das bactérias do intestino médio utilizando o tratamento com antibiótico mostra uma maior suscetibilidade de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* ao *Plasmodium falciparum* e vírus da dengue, respectivamente (DONG; MANFREDINI; DIMOPOULOS, 2009; XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008). No presente estudo, mostramos uma melhor taxa de infecção e disseminação de DENV-1 quando *Ae. aegypti* são tratados com antibióticos, atingindo 100% de TDI no 7° dpi. Portanto, a redução da microbiota, através do tratamento melhorou a dinâmica viral do DENV-1. Nossos resultados apoiam a influência da microbiota no potencial de transmissão de DENV, em que o PTV foi positivo aos 4° e 7° dpi e este resultado é importante uma vez que os mosquitos com sua microbiota natural não apresentaram positividade para PTV no 4° dpi, apenas 7° dpi. Portanto, a redução da microbiota em *Ae. aegypti* usando o tratamento antibiótico, torna esses mosquitos vetores mais competentes.

Os estudos desenvolvidos por Guedes (2012), Carvalho-Leandro et al. (2012) e Moura et al. (2015) mostraram que a replicação do DENV pode mudar de acordo com a suscetibilidade da população de mosquitos, uma vez que *Ae. aegypti* do Recife (Brasil) e Ilha de Santiago (Cabo Verde) infectados com o mesmo sorotipo e estirpe de DENV exibem diferentes competências vetoriais. Nosso estudo e o desenvolvido por Xi et al. (2008) demonstraram que independente do sorotipo usado, os mosquitos tratados com antibióticos aumentaram sua suscetibilidade ao patógeno da dengue.

11 CONCLUSÃO

- a) Nosso estudo mostra que o meio ambiente é importante na aquisição de bactérias pelos mosquitos estudados, principalmente em *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*.
- b) Este estudo demonstra uma grande diversidade da microbiota do mosquito, que podem ser alvos para o impacto do ciclo biológico e em estratégias de controle de vetores.
- c) *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. albopictus* apresenta maior similaridade bacteriana entre os mosquitos estudados.
- d) *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* com a microbiota reduzida apresentaram uma diminuição na expressão de Def-A e Cec-A.
- e) A redução da microbiota em *Cx. quinquefasciatus* não altera a dinâmica da infecção por DENV-1, mesmo que os níveis de expressão gênica de Def-A e Cec-A estejam reduzidos.
- f) A redução da microbiota em *Ae. aegypti* alterou a dinâmica da infecção por DENV-1, tornando os mosquitos mais susceptíveis a infecção.

REFERÊNCIAS

- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: Situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avancados**, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.
- BARTHOLOMAY, L. C. et al. Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 125–32, 2004.
- BECKER, N. et al. **Mosquitoes and their control**. 2nd. ed. New York: Springer, 2003.
- BEIER, M. S. et al. Effects of Para-Aminobenzoic Acid, Insulin, and Gentamicin on *Plasmodium falciparum* Development in Anopheline Mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 31, n. 4, p. 561–565, 1994.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013a.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013b.
- BISSET, J. A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Habana, v. 54, n. 3, p. 202–219, 2002.
- BOISSIÈRE, A. et al. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3364955/>. Acesso em: 21 jan. 2019.
- BRASIL. **Monitoreamento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus da Zika até a semana epidemiológica, 2016**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/17/2016-019.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- BULET, P.; STÖCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and Peptide Letters**, Hilverum, v. 12, n. 1, p. 3–11, 2005.
- CABRERA, L. O.; BERNAL, S. I.; CARMEN, M. Los mosquitos (Diptera: Culicidae) De Tlaxcala, México. **Folia Entomologica Mexicana**, Cidade do México, v. 45, n. 3, p. 223–225, 2006.
- CAO-LORMEAU, V.-M. Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. **Virology Journal**, London, v. 6, n. 1, p. 35, 2009.
- CARVALHO-LEANDRO, D. et al. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. **Acta Tropica**, Basel, v. 124, n. 2, p. 113–9, 2012.
- CASTILLO, J. C.; REYNOLDS, S. E.; ELEFThERIANOS, I. Insect immune responses to nematode parasites. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 537–547, 2011.

CHENG, G. et al. Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 177–186, 2016.

CHO, W. L. et al. Cloning and characterization of cDNAs encoding the antibacterial peptide, defensin A, from the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 395–402, 1996.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004543>. Acesso em: 10 out. 2018.

COCIANCICH, S. et al. The inducible antibacterial peptides of insects. **Parasitology Today**, v. 10, n. 4, p. 132–9, 1994.

CONSOLI, R. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

COSTA-DA-SILVA, L. et al. Glytube : A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito , *Aedes aegypti*. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 1–5, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053816>. Acesso em: 17 ago. 2016

DENNISON, N. et al. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens ScienceDirect The mosquito microbiota influences vector competence. **Insect Science**, v. 3, n. 1, p. 6–13, 2014.

DIAS, L. B. A. et al. Dengue : transmissão , aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina**, v. 43, n. 2, p. 143–152, 2010.

DIMOPOULOS, G. Microreview Insect immunity and its implication in mosquito – malaria. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 3–14, 2003.

DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. 1–10, 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000423>. Acesso em: 30 mar. 2017.

EL HAMZAoui, B. et al. Detection of *Bartonella* spp. in fleas by MALDI-TOF MS. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 2, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006189>. Acesso em: 01 nov. 2018.

ELEFThERIANOS, L. et al. Endosymbiotic bacteria in insects: Guardians of the immune system? **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 46, p. 1–10, 2013.

FALL, B. et al. The Ongoing Revolution of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microbiology Reaches Tropical Africa. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 3, p. 641–647, 2015.

FORATTINI, O. P. Identification of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 244–245, 1986.

FRANZ, A. W. E. et al. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3741–3767, 2015.

FRENTIU, F. D. et al. Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with Wolbachia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1–10, fev. 2014.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE (BRASIL). **Dengue Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor - Manual de Normas Técnicas**. 3. ed. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde, 2001.

GAO, Y.; HERNANDEZ, V. P.; FALLON, A. M. Immunity proteins from mosquito cell lines include three defensin A isoforms from *Aedes aegypti* and a defensin D from *Aedes albopictus*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 311–8, ago. 1999.

GASPER, J. et al. Identification of *Apis mellifera* Gut Microbiota with MALDI-TOF MS Biotyper. **Animal Science and Biotechnologies**, v. 50, n. 1, p. 192–196, 2017.

GHOSH, A. K. et al. Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the Plasmodium TRAP and the Anopheles saglin proteins. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000265>. Acesso em: 03 abr. 2018

GOMES, A. C. et al. Registro de *Aedes albopictus* em áreas epizooticas de febre amarela das Regiões Sudeste e Sul do Brasil (Diptera : Culicidae). **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 17, n. 1, p. 71–76, 2008.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses : Why today? **One Health**, v. 4, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5501887/>. Acesso em: 04 jan. 2019.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 3, p. 215–217, 2004.

GUEDES, D. R. D. **Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco**. 2012. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 8, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28790458>. Acesso em: 12 mar. 2018.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews. Microbiology**, London, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, dez. 2010.

GUZZETTA, G. et al. Assessing the potential risk of Zika virus epidemics in temperate areas with established *Aedes albopictus* populations. **Euro Surveillance**, Saint-Maurice, v. 21, n. 15, p. 1–6, 2016.

HALSTEAD, S. B. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 23, n. 5, p. 974–982, 1974.

HARBACH, R. E.; KNIGHT, K. L. **Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy**.

New Jersey: Plexus Publishing, 1980.

HEGDE, S.; RASGON, J L.; HUGHES, G. L. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. **Current Opinion in Virology**, v. 15, n. 1, p. 97–102, 2015.

HILL, C. L. et al. Dynamics of midgut microflora and dengue virus impact on life history traits in *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, Basel, v. 140, p. 151–157, 2014.

HILL, S.; CONNELLY, R. **Southern House Mosquito**. Disponível em: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern_house_mosquito.htm. Acesso em: 21 set. 2018.

HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, London, v. 426, n. 1, p. 33–38, 2003.

HUGHES, G. L. et al. Wolbachia infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002043>. Acesso em: 12 mar. 2018

HULL, R.; KATETE, R.; NTWASA, M. Therapeutic potential of antimicrobial peptides from insects. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 7, n. 2, p. 31–47, 2012.

JUPATANAKUL, N.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. The Insect Microbiome Modulates Vector Competence for Arboviruses. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4294–4313, 2014.

KANTOR, A. M. et al. Identification and Initial Characterization of Matrix Metalloproteinases in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 113–126, 2017.

KINGSOLVER, M. B.; HUANG, Z.; HARDY, R. W. Insect antiviral innate immunity: Pathways, effectors, and connections. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 425, n. 24, p. 4921–4936, 2013.

KLOWDEN, M. J. Making generalizations about vectors: Is there a physiology of “the mosquito”? **Entomological Research**, London, v. 37, n. 1, p. 1–13, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1748-5967.2007.00044.x>. Acesso em: 24 out. 2018.

KOKOZA, V. et al. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 18, p. 8111–8116, 2010.

KONG, Y. Y. et al. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 138, n. 1–2, p. 123–130, 2006.

KRAGER, A. Current developments to use linear MALDI-TOF spectra for the identification and typing of bacteria and the characterization of other cells/organisms related to infectious diseases. **Proteomics Clinical Application**, Brussels, v. 10, n. 9, p. 982–993, 2016.

KUMAR, A. et al. Mosquito innate immunity. **Insects**, Basel, v. 9, n. 95, p. 1–34, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6165528/>. Acesso em: 24 out. 2018.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 5, p. 1–9, 2010. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000646>. Acesso em: 4 ago. 2018.

LESLIE, R.; MARUNIAK, J. E. **Asian tiger mosquito**. Disponível em: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/asian_tiger.htm. Acesso em: 4 ago. 2018.

LIU, T. et al. Antiviral systems in vector mosquitoes. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 83, n. 2018, p. 34–43, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOWENBERGER, C. et al. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 29, p. 20092–20097, 1999.

LOWENBERGER, C. Innate immune response of *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, n. 2001, p. 219–229, 2001.

LUPLERTLOP, N. et al. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following Infection with Dengue Virus. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1001252>. Acesso em: 24 out. 2018.

MAMANI, E. Nuevo Serotipo 5 del virus dengue: necesidad de fortalecer la vigilancia molecular en Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental Salud Publica**, Lima, v. 31, n. 1, p. 171–173, 2014.

MARTINA, B. E. E. Clinical course, pathogenesis and treatment of dengue : An overview. **Culture**, London, v. 32, n. 1, p. 1–4, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2772360/>. Acesso em: 24 out. 2018.

MARTINS, W. et al. Co-transmission of *Rahnella aquatilis* between hospitalized patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 19, n. 6, p. 648–650, 2015.

MATSUYAMA, K.; NATORI, S. Purification of Three Antibacterial Proteins from the Culture Medium of. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 263, n. 32, p. 17112–17116, 1988.

MINARD, G. et al. Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: a pilot study. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Tampa, v. 4, n. 59, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860790>. Acesso em: 24 out.2018.

MOLOO, A. **World Health Assembly approves comprehensive global approach**

against vector-borne diseases. Disponível em:

https://www.who.int/neglected_diseases/news/comprehensive_global_approach_against_vector-borne_diseases/en/. Acesso em: 2 out. 2018.

MOURA, A. J. F. DA et al. Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 114, p. 1–9, 2015. Disponível em:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-0706-8>. Acesso em: 10 nov. 2018.

MUTURI, E. J. et al. *Culex pipiens* and *Culex restuans* mosquitoes harbor distinct microbiota dominated by few bacterial taxa. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1299-6>. Acesso em: 20 nov. 2018.

MUTURI, E. J. et al. Comparative analysis of gut microbiota of mosquito communities in central Illinois. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. 1–18, 2017. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005377>. Acesso em: 20 nov. 2018.

NELSON, M. **Aedes aegypti: biologia y ecologia.** 1 ed. Washington: Organización Mundial de La Salud, 1986.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana.** 7. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, Washington, v. 342, n. 6157, p. 405–415, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Health topics Dengue.** Disponível em: <http://www.who.int/topics/dengue/en/>. Acesso em: 11 jan. 2019a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Filariasis.** Disponível em: http://www.who.int/lymphatic_filariasis/en/. Acesso em: 30 jan. 2019b.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: Guías pra su prevención y control.** Washington, DC: Organización Panamericana de La Salud, 1995.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Folha informativa: Dengue e dengue grave.** Disponível em:

https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5963:folha-informativa-dengue-e-dengue-grave&Itemid=812. Acesso em: 4 abr. 2019.

PAN, X. et al. Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 1, p. 23–31, 2012.

PASSARELLI, A. L. Barriers to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections. **Virology**, New York, v. 411, n. 2, p. 383–392, 2012.

PAUPY, C. et al. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. **Microbes and Infection**, Paris, v. 11, n. 14, p. 1177–1185, dez. 2009.

- PERLATTI, B. et al. MALDI-TOF MS identification of microbiota associated with pest insect *Diabrotica speciosa*. **Agricultural and Forest Entomology**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 408–417, 2017.
- PICIANTO, M. A. C. et al. Dengue : uma visão sobre o vetor urbano *Aedes aegypti* e a difícil interface do seu controle. **Veterinária em Foco**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 11–25, 2015.
- PIDIYAR, V. J. et al. Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16S ribosomal RNA gene analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 70, n. 6, p. 597–603, 2004.
- PRAET, J. et al. *Apibacter mensalis* sp. nov. : a rare member of the bumblebee gut microbiota. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading v. 66, p. 1645–1651, 2016.
- RAMIREZ, J. L. et al. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1–11, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001561>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- REID, W. R. et al. The Transcriptome Profile of the Mosquito *Culex quinquefasciatus* following Permethrin Selection. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. 1–12, 2012.
- RICHMAN, A. M. et al. Plasmodium activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. **EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 20, p. 6114–6119, 1997.
- ROSALAES, C. Phagocytosis , a cellular immune response in insects. **Insect Science Journal**, Tucson, v. 8, n. 1, p. 109–131, 2011.
- SALAZAR, M. J.; MANCADA, M. I. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas em Bogotá. **Biomédica**, Bogotá. v. 24, n. 4, p. 386–387, 2004.
- SALDAÑA, M. A.; HEGDE, S.; HUGHES, G. L. Microbial control of arthropod-borne disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n. 2, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5293117/>. Acesso em: 20 out. 2018.
- SAN MARTÍN, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 82, n. 1, p. 128–135, 2010.
- SANTOS, I. C.; HILDENBRAND, Z. L.; SCHUG, K. A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. **Analyst**, Cambridge, v. 141, n. 10, p. 2827–2837, 2016.
- SANTOS, J. J. et al. Construction and characterisation of a complete reverse genetics system of dengue virus type 3. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 8, p. 983–991, 2013.
- SANTOS, R. C. Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brazil (1997-

2002). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 671–673, 2003.

SARAIVA, R. G. et al. Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford, v. 64, p. 1–12, 2016.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X16300155?via%3Dihub>. Acesso em: 24 mar. 2018.

SCHNEIDER, B. S.; HIGGS, S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 5, p. 400–408, 2009.

SIM, S.; JUPATANAKUL, N.; DIMOPOULOS, G. Mosquito immunity against arboviruses. **Viruses**, Basel, v. 6, n. 11, p. 4479–4504, 2014.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **New England Journal of Medicine and Journal of Medicine**, Boston, v. 366, p. 1423–1432, 2012.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry : an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, Amsterdam, v. 6, n. 791, p. 1–16, 2015. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00791/full>. Acesso em: 20 mar. 2018.

STRAND, M. The insect cellular immune response. **Insect Science**, Tucson, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2008. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>. Acesso em: 20 mar. 2018.

SUTER, T. et al. Insecticide susceptibility of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* from Brazil and the Swiss-Italian border region. **Parasites & Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2364-5>. Acesso em: 20 nov. 2018.

TANDINA, F. et al. Use of MALDI-TOF MS and culturomics to identify mosquitoes and their midgut microbiota. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, n. 495, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5018162/>.

Acesso em: 27 out. 2018.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue : twenty-fi ve years since reemergence in Brazil. **Caderno Mídia e Saúde Pública**, Belo Horizonte, v. 25, n. 1, p. 7–18, 2009.

THAI, K. T. D.; ANDERS, K. L. The role of climate variability and change in the transmission dynamics and geographic distribution of dengue. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v. 236, n. 8, p. 944–54, 1 ago. 2011.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Introduction to the Study of Insects**. 7. ed. Belmont: Brooks/Cole, 2005.

TSAKAS, S.; MARMARAS, V. J. Insect immunity and its signalling : an overview. **Insect Science Journal**, Tucson, v. 7, p. 228–238, 2010.

VALIENTE MORO, C. et al. Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. **BMC Microbiology**, London, v. 13, n. 1, p. 70, 2013.

- VARELLA, M. H. **Doenças transmitidas por Aedes aegypti e Aedes albopictus**. Disponível em: <<https://drauziovarella.uol.com.br/infectologia/doencas-transmitidas-por-aedes-aegypti-e-aedes-albopictus/>>. Acesso em: 4 set. 2018.
- WANG, Y.; ROZEN, D. E. Gut microbiota colonization and transmission in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* throughout development. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 83, n. 9, p. 1–26, 2017.
- WASINPIYAMONGKOL, L.; MISSE, D.; LUPLERTLOP, N. Induction of defensin response to dengue infection in *Aedes aegypti*. **Entomological Science**, Tokyo, v. 18, n. 2, p. 199–206, 2015.
- WEAVER, S. C. et al. Togavirus-Associated Pathologic Changes in the Midgut of a Natural Mosquito Vector. **Journal of Virology**, Washington, v. 62, n. 6, p. 2083–2090, 1988.
- WILKE, A. B. B.; MARRELLI, M. T. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 342, p. 1–19, 2015. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-0959-2>. Acesso em: 10 mar. 2018.
- WILKS, J.; GOLOVKINA, T. Influence of microbiota on viral infections. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. 5–7, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3355081/>. Acesso em: 10 nov. 2018.
- XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 4, n. 7, p. 1–12, 2008.
- YADAV, K. K. et al. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. **Parasites & vectors**, London, v. 8, n. 1, p. 641, 2015.
- YE, Y. H. et al. Wolbachia Reduces the Transmission Potential of Dengue-Infected *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 6, p. 1–19, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26115104>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- YI, H.-Y. et al. Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 13, p. 1–16, 9 maio 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-014-5792-6>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- ZOUACHE, K. et al. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 377–389, 2011.

APÊNDICE A – Artigo publicado na revista Acta Tropica

Acta Tropica 200 (2019) 105174



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Use of MALDI-TOF MS to identify the culturable midgut microbiota of laboratory and wild mosquitoes



Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves^{a,b,*}, Ana Paula Sampaio Feitosa^b,
Nairomberg Cavalcanti Portela-Júnior^b, Cláudia Maria Fontes de Oliveira^c,
José Luiz de Lima Filho^b, Fábio André Brayner^{a,b}, Luiz Carlos Alves^{a,b}

^a Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária, Recife, PE, 52171-011, Brazil

^c Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Aedes aegypti
Aedes albopictus
Culex quinquefasciatus
MALDI-TOF MS
Microbiota

ABSTRACT

Mosquitoes are responsible for transmitting many pathogens to humans and *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* are important vectors in the world. The microbiota plays an important role in developmental studies that involve impacts on the biological cycle of mosquitoes and vector control strategies. In this study, the aim was to understand the environment plays in the microbiota culturable diversity of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. Midgut of studied mosquitoes (laboratory-reared and wild) were dissected and analyzed by MALDI-TOF MS to identify the microbiota. Most of the bacteria identified in the microbiota of mosquitoes from the laboratory and field belong to the phylum Proteobacteria. We reported on the microbial diversity among the mosquito species studied where *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus* show greater bacterial similarity. The genus *Rahnella* was present in all mosquito species studied, both in those from the laboratory and those from the wild. *Bacillus*, *Ewingella*, *Micrococcus*, *Klebsiella* and *Pantoea* are genera was predominant among the mosquitoes studied. The difference of microbiota diversity between mosquitoes laboratory-reared and wild shows that the environment plays an important role in the acquisition of bacteria, mainly in *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*.

1. Introduction

Mosquitoes are responsible for transmitting pathogens that cause diseases with high levels of mortality, morbidity, and economic loss worldwide; such diseases are estimated to account for 17% of the global burden of communicable diseases (Moloo, 2017). *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and *Cx. quinquefasciatus* are important disease-carrying vectors in the world and there is an urgent need to control them. Pathogens such as Dengue virus, Chikungunya virus, and Zika virus are arboviruses that cause serious problems for public health, and can be transmitted by different species of mosquitoes (Moloo, 2017; Saldaña et al., 2017; Tandina et al., 2016). It is known that *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*

can transmit Dengue, Chikungunya, and Zika viruses (Gould et al., 2017; Guzzetta et al., 2016), while *Culex quinquefasciatus* has recently been associated with Zika virus transmission (Guedes et al., 2017). Thus, these mosquitoes have a great impact on public health and turn be targets for study.

The midgut of mosquitoes is the first tissue barrier that pathogens must pass to complete their life cycle (Franz et al., 2015). This tissue has been used in many studies focusing on microbiota since it provides details on the microbial diversity and its potential influence on mosquito vector competence (Muturi et al., 2017; Ramirez et al., 2012; Tandina et al., 2016; Yadav et al., 2015). Studies involving the microbial identification of different mosquito species from the laboratory and

Abbreviations: MALDI-TOF MS, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; PBS, Phosphate buffered saline; BHI, Brain Heart Infusion; DHB, dihydroxybenzoic acid; TFA, trifluoroacetic acid; Da, Daltons

* Corresponding author at: Instituto Aggeu Magalhães, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus UFPE, 50740465 Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: gabrielgazzoni@hotmail.com (G. Gazzoni Araújo Gonçalves), claudia@cpqam.fiocruz.br (C.M.F. de Oliveira), lcalves@cpqam.fiocruz.br (L.C. Alves).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105174>

Received 7 December 2018; Received in revised form 26 August 2019; Accepted 12 September 2019

Available online 13 September 2019

0001-706X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

field provided information about how the microbiota in these mosquitoes are influenced by environmental conditions (Muturi et al., 2017; Tandina et al., 2016; Yadav et al., 2015).

There are many techniques for bacterial identification, but matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF MS) has proven to be an alternative and emerging technique for microbial identification since this technique is rapid, of low cost and can provide reliable identification of bacterial genera (Fall et al., 2015; Krager, 2016; Singhal et al., 2015). Proteomic profiles by MALDI-TOF MS for rapid identification of intact bacteria were firstly used in 1996 (Holland et al., 1996). Furthermore, the number of studies that use MALDI-TOF MS for identifying bacterial microbiota in arthropods has been increasing in recent years (Gasper et al., 2017; Perlatti et al., 2017; Praet et al., 2016; Tandina et al., 2016).

In this study, we used MALDI-TOF MS to characterize the midgut microbiota of laboratory and wild mosquito species. Our aim was to identify the diversity of the culturable midgut microbiota making a comparison between these mosquitoes and to assess the effect of the environment on bacterial populations.

2. Methods

2.1. Mosquitoes reared in the laboratory

Three mosquito species from a laboratory colony, *Ae. aegypti* (Recl), *Ae. albopictus* (Recl) and *Cx. quinquefasciatus* (CqSLab) were used in this study. These colonies have been kept for more than 15 years under controlled laboratory conditions, $26 \pm 1^\circ\text{C}$, a relative humidity between 65 and 85% and a photoperiod of 14:10 h (light:dark), at the Insectarium of the Department of Entomology, Aggeu Magalhães Institute (IAM/FIOCRUZ) in Recife, Brazil. A total of 10 female mosquitoes of each species, starting on the third day after their emergence, were maintained under standard conditions with 10% (w/v) sucrose solution on cotton until they were used for microbiota midgut identification.

2.2. Wild mosquitoes collected in the field

Female mosquitoes were collected at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Campus (Recife, Brazil). These mosquitoes were captured with an insect net, allocated in an entomological bottle, transported to the laboratory and morphologically identified using the Mosquito Taxonomic Glossary proposed by Harbach and Knight (1980). For this study, we used only *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* and *Cx. quinquefasciatus*; any other mosquito species that were collected were discarded. A total of 10 mosquitoes of each species were utilized for microbial identification.

2.3. Midgut dissection

Mosquitoes were dipped first in 70% ethanol for 2 min for surface sterilization and then in sterile PBS to withdraw excess ethanol. Midguts were subsequently dissected from each individual mosquito over a sterile glass slide containing a 50- μl drop of sterile PBS, then transferred to a microcentrifuge tube containing 100 μl of sterile BHI (Brain Heart Infusion) broth and macerated for 30 s. Individual midguts were analyzed separately.

2.4. Isolation of midgut microbiota

Each midgut homogenate was plated onto blood agar and incubated at 28°C for 48 h. All procedures were done in a sterile environment following aseptic practices. Initial isolation was based on morphology, color, and size of the colony. We evaluated bacteria isolated from the mosquitoes' midgut and sent them for MALDI-TOF MS analysis. We made bacterial stocks of each isolate if another analysis was needed,

colonies were suspended in 2 mL of BHI broth and incubated at 37°C for 12 h. We mixed 800 μL of the bacterial suspension with 200 μL of sterile glycerol in cryotubes and stored them at -20°C until posterior analyses, if necessary.

2.5. MALDI-TOF MS preparation

A polished steel target plate (FlexiMass, Shimadzu Biotech, UK) was used to put a tiny sample of a single colony for each isolate from the mosquito midgut. After this, aliquots of 1.0 μL of 25% formic acid were added and mixed gently with each isolate, and when this mix had almost evaporated, 1.0 μL of matrix solution (75 mg/mL 2,5-dihydroxybenzoic acid [DHB] in ethanol/water/acetonitrile [1:1:1; v/v/v]) with 0.03% trifluoroacetic acid [TFA] was added and mixed gently. All samples were dried for several minutes at room temperature and finally analyzed by MALDI TOF MS.

2.6. MALDI-TOF microbial identification

An Axima LNR system (Kratos Analytical, Shimadzu, UK) equipped with a nitrogen laser (337 nm) was used for the analyses. Ribosomal proteins of intact *E. coli* DH5 cells (4365.4, 5096.8, 5381.4, 6241.4, 6255.4, 6316.2, 6411.6, 6856.1, 7158.8, 7274.5, 7872.1, 9742 and 12227.3 Da) were used as external calibrants of the MALDI-TOF MS equipment. A MALDI-TOF mass spectrometer was used for bacterial identification according to the manufacturer's recommendations. Spectra were recorded in a linear mode, within a mass range of 2000–20,000 Daltons (Da) and the final spectra were generated by summing 20 accumulated laser shots per profile. Each sample produced 50 profiles, leading to 1000 laser shots per summed spectrum. The resulting peak lists were exported to the database of the SARAMIS package software (Spectral Archiving and Microbial Identification System, AnagnosTec, Germany, www.anagnostec.eu), where the final identifications were achieved. Identifications by the SARAMIS package are based on the presence or absence of each peak in the spectra. The identification criteria used were as follows: a score of 2.300–3.000 indicated highly probable species-level identification, a score of 2.000–2.299 indicated a secure genus identification with probable species identification, a score of 1.700–1.999 indicated the probable identification to the genus level and a score of <1.700 was considered unreliable.

3. Results

3.1. Microbiota of *Cx. quinquefasciatus*

In total, 64 bacterial strains were subjected to identification using MALDI-TOF, 39 strains from mosquitoes reared in the laboratory (Table 1) and 25 strains from wild mosquitoes (Table 2). As shown in Tables 1 and 2, over 90% of the isolates were positively identified at least to the genus level, with 58 out of 64 isolates producing reliable results according to the software manufacturer's specifications. The other six strains did not produce any reliable results for identification.

Bacteria isolated from mosquitoes reared in the laboratory represent eight genera (*Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Raoultella*, and *Sphingobacterium*), while those isolated from wild mosquitoes, six genera (*Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Rahnella*, *Serratia*, and *Staphylococcus*).

3.2. Microbiota of *Ae. aegypti*

In total, 65 bacterial strains were subjected to identification using MALDI-TOF, 34 strains from laboratory-reared mosquitoes (Table 3) and 31 strains from wild mosquitoes (Table 4). As shown in Tables 3 and 4, over 90% of the isolates were positively identified at least to the genus level, with 60 out of 65 isolates producing reliable results

Table 1
List of bacteria identified in the midguts of laboratory-reared *Culex quinquefasciatus* considering standard reference scores.

Isolate number	Work Code	MALDI-TOF MS best hit	Score value
1	CX.LAB.03.4	<i>Achromobacter piechaudii</i>	1.919
2	CX.LAB.10.2	<i>Achromobacter piechaudii</i>	1.877
3	CX.LAB.01.5	<i>Acinetobacter baileyi</i>	1.788
4	CX.LAB.03.3	<i>Acinetobacter baileyi</i>	1.978
5	CX.LAB.04.1	<i>Acinetobacter baileyi</i>	1.902
6	CX.LAB.05.1	<i>Acinetobacter baileyi</i>	1.779
7	CX.LAB.07.2	<i>Acinetobacter baileyi</i>	1.818
8	CX.LAB.08.2	<i>Acinetobacter baileyi</i>	1.734
9	CX.LAB.10.1	<i>Acinetobacter baileyi</i>	1.954
10	CX.LAB.01.3	<i>Chryseobacterium gleum</i>	2.042
11	CX.LAB.04.4	<i>Chryseobacterium gleum</i>	1.836
12	CX.LAB.06.2	<i>Chryseobacterium gleum</i>	1.981
13	CX.LAB.01.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.785
14	CX.LAB.02.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.904
15	CX.LAB.04.5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.940
16	CX.LAB.07.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.845
17	CX.LAB.03.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.402
18	CX.LAB.04.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.392
19	CX.LAB.06.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.898
20	CX.LAB.09.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.281
21	CX.LAB.10.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.149
22	CX.LAB.01.1	Not reliable identification	–
23	CX.LAB.04.1	Not reliable identification	–
24	CX.LAB.04.2	Not reliable identification	–
25	CX.LAB.10.4	Not reliable identification	–
26	CX.LAB.01.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.966
27	CX.LAB.02.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.931
28	CX.LAB.05.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.799
29	CX.LAB.06.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.901
30	CX.LAB.08.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.947
31	CX.LAB.09.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.899
32	CX.LAB.03.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.769
33	CX.LAB.05.4	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.903
34	CX.LAB.09.3	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.941
35	CX.LAB.05.3	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1.906
36	CX.LAB.01.4	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.888
37	CX.LAB.03.5	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.950
38	CX.LAB.04.3	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.832
39	CX.LAB.07.1	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.893

Table 2
List of bacteria identified in the midguts of wild *Culex quinquefasciatus* considering standard reference scores.

Isolate number	Work Code	MALDI-TOF MS best hit	Score value
1	CX.WILD.09.2	<i>Bacillus cereus</i>	1.922
2	CX.WILD.02.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.755
3	CX.WILD.03.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.831
4	CX.WILD.05.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.849
5	CX.WILD.07.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.978
6	CX.WILD.09.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.032
7	CX.WILD.10.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.991
8	CX.WILD.05.1	Not reliable identification	–
9	CX.WILD.05.2	Not reliable identification	–
10	CX.WILD.01.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.911
11	CX.WILD.02.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.883
12	CX.WILD.04.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.903
13	CX.WILD.04.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	2.073
14	CX.WILD.05.4	<i>Serratia ureilytica</i>	1.743
15	CX.WILD.06.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.971
16	CX.WILD.07.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.945
17	CX.WILD.08.1	<i>Serratia ureilytica</i>	1.879
18	CX.WILD.10.3	<i>Serratia ureilytica</i>	1.802
19	CX.WILD.01.1	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.842
20	CX.WILD.03.2	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.809
21	CX.WILD.08.2	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.975
22	CX.WILD.10.2	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.870
23	CX.WILD.01.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.933
24	CX.WILD.04.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.794
25	CX.WILD.06.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.910

Table 3
List of bacteria identified in the midguts of laboratory-reared *Aedes aegypti* considering standard reference scores.

Isolate number	Work Code	MALDI-TOF MS best hit	Score value
1	AE.LAB.01.3	<i>Aeromonas caviae</i>	1.966
2	AE.LAB.04.5	<i>Aeromonas caviae</i>	1.932
3	AE.LAB.05.3	<i>Aeromonas caviae</i>	1.993
4	AE.LAB.06.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.849
5	AE.LAB.08.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.922
6	AE.LAB.09.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.890
7	AE.LAB.10.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.793
8	AE.LAB.04.4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.977
9	AE.LAB.06.2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.904
10	AE.LAB.07.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1.829
11	AE.LAB.01.2	<i>Bacillus cereus</i>	1.830
12	AE.LAB.02.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.951
13	AE.LAB.06.3	<i>Bacillus cereus</i>	1.908
14	AE.LAB.02.2	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.774
15	AE.LAB.04.6	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.723
16	AE.LAB.05.2	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.981
17	AE.LAB.07.3	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.988
18	AE.LAB.09.5	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.854
19	AE.LAB.10.3	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1.915
20	AE.LAB.03.1	<i>Ewingella americana</i>	1.741
21	AE.LAB.04.1	<i>Ewingella americana</i>	1.812
22	AE.LAB.05.1	<i>Ewingella americana</i>	1.940
23	AE.LAB.09.2	<i>Ewingella americana</i>	1.894
24	AE.LAB.10.4	<i>Ewingella americana</i>	1.911
25	AE.LAB.04.3	Not reliable identification	–
26	AE.LAB.08.2	Not reliable identification	–
27	AE.LAB.10.2	Not reliable identification	–
28	AE.LAB.01.1	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.986
29	AE.LAB.03.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.970
30	AE.LAB.05.4	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.866
31	AE.LAB.09.4	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.796
32	AE.LAB.04.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.902
33	AE.LAB.07.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.957
34	AE.LAB.09.3	<i>Serratia ureilytica</i>	2.159

Table 4
List of bacteria identified in the midguts of wild *Aedes aegypti* considering standard reference scores.

Isolate number	Work Code	MALDI-TOF MS best hit	Score value
1	AE.WILD.02.3	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.944
2	AE.WILD.06.4	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.981
3	AE.WILD.08.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.878
4	AE.WILD.05.2	<i>Burkholderia cepacia</i>	1.908
5	AE.WILD.08.4	<i>Cedecea lapagei</i>	1.922
6	AE.WILD.09.1	<i>Cedecea lapagei</i>	1.748
7	AE.WILD.10.3	<i>Cedecea lapagei</i>	1.871
8	AE.WILD.02.1	<i>Micrococcus luteus</i>	1.711
9	AE.WILD.04.2	<i>Micrococcus luteus</i>	1.934
10	AE.WILD.06.1	<i>Micrococcus luteus</i>	1.893
11	AE.WILD.07.1	<i>Micrococcus luteus</i>	1.951
12	AE.WILD.09.2	<i>Micrococcus luteus</i>	1.807
13	AE.WILD.10.4	<i>Micrococcus luteus</i>	1.911
14	AE.WILD.05.1	Not reliable identification	–
15	AE.WILD.05.3	Not reliable identification	–
16	AE.WILD.01.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.965
17	AE.WILD.04.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.949
18	AE.WILD.07.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.823
19	AE.WILD.08.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.780
20	AE.WILD.10.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.855
21	AE.WILD.01.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.947
22	AE.WILD.03.1	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.932
23	AE.WILD.09.4	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.876
24	AE.WILD.06.3	<i>Serratia marcescens</i>	1.842
25	AE.WILD.07.2	<i>Serratia marcescens</i>	1.891
26	AE.WILD.08.2	<i>Serratia marcescens</i>	1.938
27	AE.WILD.09.3	<i>Serratia marcescens</i>	1.972
28	AE.WILD.02.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.912
29	AE.WILD.03.2	<i>Serratia ureilytica</i>	2.134
30	AE.WILD.06.2	<i>Serratia ureilytica</i>	1.879
31	AE.WILD.10.1	<i>Serratia ureilytica</i>	2.034

Table 5
List of bacteria identified in the midguts of laboratory-reared *Aedes albopictus* considering standard reference scores.

Isolate number	Work Code	MALDI-TOF MS best hit	Score value
1	ALB.LAB.02.2	<i>Achromobacter piechaudii</i>	1.993
2	ALB.LAB.05.1	<i>Achromobacter piechaudii</i>	1.873
3	ALB.LAB.01.1	<i>Aeromonas caviae</i>	2.181
4	ALB.LAB.02.3	<i>Aeromonas caviae</i>	1.745
5	ALB.LAB.06.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.902
6	ALB.LAB.08.1	<i>Aeromonas caviae</i>	1.931
7	ALB.LAB.01.2	<i>Ewingella americana</i>	1.935
8	ALB.LAB.02.1	<i>Ewingella americana</i>	1.811
9	ALB.LAB.03.3	<i>Ewingella americana</i>	1.879
10	ALB.LAB.05.2	<i>Ewingella americana</i>	1.829
11	ALB.LAB.06.4	<i>Ewingella americana</i>	1.906
12	ALB.LAB.07.4	<i>Ewingella americana</i>	1.918
13	ALB.LAB.09.2	<i>Ewingella americana</i>	1.893
14	ALB.LAB.10.1	<i>Ewingella americana</i>	1.867
15	ALB.LAB.04.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.212
16	ALB.LAB.07.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.237
17	ALB.LAB.08.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.127
18	ALB.LAB.01.3	<i>Micrococcus luteus</i>	2.058
19	ALB.LAB.02.4	<i>Micrococcus luteus</i>	1.854
20	ALB.LAB.06.5	<i>Micrococcus luteus</i>	2.098
21	ALB.LAB.08.4	<i>Micrococcus luteus</i>	1.944
22	ALB.LAB.09.1	<i>Micrococcus luteus</i>	1.872
23	ALB.LAB.10.6	<i>Micrococcus luteus</i>	1.807
24	ALB.LAB.06.3	Not reliable identification	–
25	ALB.LAB.07.1	Not reliable identification	–
26	ALB.LAB.07.2	Not reliable identification	–
27	ALB.LAB.09.4	Not reliable identification	–
28	ALB.LAB.10.3	Not reliable identification	–
29	ALB.LAB.03.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.707
30	ALB.LAB.04.2	<i>Pantoea dispersa</i>	2.179
31	ALB.LAB.08.2	<i>Pantoea dispersa</i>	2.055
32	ALB.LAB.10.5	<i>Pantoea dispersa</i>	1.887
33	ALB.LAB.03.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.799
34	ALB.LAB.06.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.752
35	ALB.LAB.07.5	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.949
36	ALB.LAB.09.3	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.937
37	ALB.LAB.10.2	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.891
38	ALB.LAB.02.5	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1.936
39	ALB.LAB.05.3	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2.064

according to the software manufacturer's specifications. The other five bacterial strains did not produce any reliable results for identification.

Bacteria isolated from laboratory-reared mosquitoes represent six genera (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Elizabethkingia*, *Ewingella*, *Rahnella*, and *Serratia*) and those from wild mosquitoes also represent six genera (*Burkholderia*, *Cedecea*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Rahnella*, and *Serratia*).

3.3. Microbiota of *Ae. albopictus*

In total, 67 bacterial strains were subjected to identification using MALDI-TOF, 39 strains from mosquitoes reared in the laboratory (Table 5) and 28 strains from wild mosquitoes (Table 6). As shown in Tables 5 and 6, over 88% of the isolates were positively identified at least to the genus level, with 59 out of 67 isolates producing reliable results according to the software manufacturer's specifications. The other eight bacterial strains did not produce any reliable results for identification.

Bacteria isolated from mosquitoes reared in the laboratory represent eight genera (*Achromobacter*, *Aeromonas*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Rahnella*, and *Raoultella*), while those from wild mosquitoes represent seven genera (*Bacillus*, *Ewingella*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Rahnella*, and *Staphylococcus*).

3.4. Summary of bacterial identifications

Bacteria isolated from the midgut of *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* represent four phyla, seven classes, and 17 genera

Table 6
List of bacteria identified in the midguts of wild *Aedes albopictus* considering standard reference scores.

Isolate number	Work Code	MALDI-TOF MS best hit	Score value
1	ALB.WILD.01.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.833
2	ALB.WILD.05.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.949
3	ALB.WILD.07.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.902
4	ALB.WILD.08.1	<i>Bacillus cereus</i>	1.840
5	ALB.WILD.02.4	<i>Ewingella americana</i>	1.973
6	ALB.WILD.05.2	<i>Ewingella americana</i>	1.989
7	ALB.WILD.01.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.835
8	ALB.WILD.02.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.857
9	ALB.WILD.06.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.887
10	ALB.WILD.07.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.107
11	ALB.WILD.09.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.921
12	ALB.WILD.10.2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.078
13	ALB.WILD.04.3	<i>Micrococcus luteus</i>	1.769
14	ALB.WILD.07.3	<i>Micrococcus luteus</i>	1.791
15	ALB.WILD.08.3	<i>Micrococcus luteus</i>	1.901
16	ALB.WILD.01.2	Not reliable identification	–
17	ALB.WILD.04.2	Not reliable identification	–
18	ALB.WILD.10.3	Not reliable identification	–
19	ALB.WILD.01.4	<i>Pantoea dispersa</i>	2.278
20	ALB.WILD.02.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.904
21	ALB.WILD.05.3	<i>Pantoea dispersa</i>	1.934
22	ALB.WILD.09.2	<i>Pantoea dispersa</i>	1.991
23	ALB.WILD.10.1	<i>Pantoea dispersa</i>	1.858
24	ALB.WILD.04.1	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.938
25	ALB.WILD.06.3	<i>Rahnella aquatilis</i>	1.964
26	ALB.WILD.02.3	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.973
27	ALB.WILD.06.1	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.779
28	ALB.WILD.08.2	<i>Staphylococcus capitis</i>	1.753

Table 7
Summary of identifications of bacteria associated with the mosquito species studied.

Phylum	Class	Genus	Total of identified isolates
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	15
Firmicutes	Bacilli	<i>Bacillus</i>	4
Firmicutes	Bacilli	<i>Staphylococcus</i>	10
Bacteroidetes	Flavobacteria	<i>Chryseobacterium</i>	3
Bacteroidetes	Flavobacteria	<i>Elizabethkingia</i>	6
Bacteroidetes	Sphingobacteria	<i>Sphingobacterium</i>	4
Proteobacteria	β-Proteobacteria	<i>Achromobacter</i>	4
Proteobacteria	β-Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	4
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	7
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	<i>Cedecea</i>	3
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	<i>Ewingella</i>	15
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	<i>Klebsiella</i>	24
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	<i>Pantoea</i>	23
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	<i>Rahnella</i>	18
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	<i>Raoultella</i>	3
Proteobacteria	γ-Proteobacteria	<i>Serratia</i>	16
Proteobacteria	δ-Proteobacteria	<i>Aeromonas</i>	14

(Table 7). The most abundant phylum was Proteobacteria, with the majority of these belonging to the γ-proteobacteria class and the most abundant microbial genus was *Klebsiella* following by *Pantoea*.

4. Discussion

In this work, we analyzed the difference between midgut microbiota of laboratory-reared and wild mosquitoes using MALDI-TOF MS. This technique differ from most other studies which have used molecular approaches based on analyzing sequences of 16S ribosomal RNA (Minard et al., 2014; Muturi et al., 2017, 2016; Yadav et al., 2015). However, MALDI-TOF MS is a fast technique, has high accuracy, is less expensive than molecular and immunological-based detection methods and requires neither trained laboratory personnel nor powerful software interpretation (Singhal et al., 2015). Although the MALDI-TOF MS

is limited to identifying only culturable bacteria (Santos et al., 2016), the use of this technique to identify microbiota can be found in studies of different arthropod species such as bees (Gasper et al., 2017; Praet et al., 2016), beetles (Perlatti et al., 2017; Wang and Rozen, 2017) and fleas (El Hamzaoui et al., 2018). Following this line of research, mosquitoes of medical importance have been studied including *Anopheles gambiae*, *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus* (Tandina et al., 2016). In our study, we verify the microbiota of *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* (laboratory-reared and wild).

Thorough of culturable techniques and MALDI-TOF MS identification, this work reveals a diversity of the microbiota with 90.40% of the isolates identified. The phylum Proteobacteria presented the highest frequency in both laboratory-reared and wild mosquitoes, with the majority of bacteria belonging to the γ -Proteobacteria class. These results are similar to another study that used MALDI-TOF MS to detect microbiota in mosquitoes of medical importance (Tandina et al., 2016). Other studies, where 16S ribosomal gene sequencing was used to detect microbiota, have also shown that the phylum Proteobacteria was predominant (Minard et al., 2014; Muturi et al., 2016; Yadav et al., 2015).

Comparing the mosquitoes reared in the laboratory with those of wild mosquitoes, we observed three bacterial genera in common for *Cx. quinquefasciatus*. In *Ae. aegypti*, we found two genera in common and for *Ae. albopictus* five genera in common were observed. The differences shown in midgut microbiota between laboratory-reared and wild mosquitoes suggest that the environment plays the principal role in variations in diversity of bacterial genera, especially in *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*. However, is necessary consider that wild mosquitoes were capture in a single place and the low sample size of ten insects per group may be study limitations. Ours results correlate with other studies; namely that vector environmental conditions are key determinants in shaping the midgut microbiota (Boissière et al., 2012; Muturi et al., 2017; Tandina et al., 2016; Zouache et al., 2011). *Ae. albopictus* mosquitoes reared in the laboratory and those captured in the field show five genera in common, out of seven. This similarity in our results suggests that more studies are required to assess if environmental circumstances are, in fact, determinants in molding the microbiota of *Ae. albopictus* (Stathopoulos et al., 2014).

An analysis of the microbiota obtained in an interspecific comparison of mosquitoes shows that *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus* have the highest number of similar bacterial genera among the species of mosquitoes studied, especially in wild mosquitoes. Our results differ from the findings of Tandina et al. (2016), where wild *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus* had only a single bacterial genus in common. Studies involving mosquitoes from other regions are necessary to understand if this high similarity of bacterial genera between wild *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus* will be maintained. In addition, it is also important to evaluate if mosquitoes of these species reared in different laboratories also maintain the high similarity of bacterial genera.

Among all bacteria identified, the genus *Rahnella* was present in all mosquito species, both from the laboratory and the wild. Bacteria of the genus *Rahnella* are infrequent pathogens in humans (Martins et al., 2015), but their effect on mosquitoes is unknown. *Bacillus*, *Ewingella*, *Micrococcus*, *Klebsiella* and *Pantoea* are genera was predominant among the mosquitoes studied. These data provide a foundation for future studies of the impacts that each bacterial genus found has on the biological cycle of the mosquitoes as well as the interaction of pathogens in these mosquito vectors. Furthermore, bacteria with a low incidence in our study cannot be excluded from future studies.

5. Conclusions

The three species of mosquitoes studied from the laboratory and field present a diversified microbiota. *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. albopictus* show the greatest bacterial similarity among the mosquito species studied, especially in wild mosquitoes. Our study shows that the

environment plays an important role in the acquisition of bacteria, mainly in *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*. These findings will provide the foundation for investigations on the role of the microbiota on mosquito biology and potential applications in vector control strategies.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 and the PROEP-FIOCRUZ project (APQ-1656-2.13-15), which was funded by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - Brazil (FACEPE).

CRedit authorship contribution statement

Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves: Conceptualization, Funding acquisition, Formal analysis, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Ana Paula Sampaio Feitosa:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Nairomberg Cavalcanti Portela-Júnior:** Formal analysis, Methodology, Writing - review & editing. **Cláudia Maria Fontes de Oliveira:** Formal analysis, Supervision, Writing - review & editing. **José Luiz de Lima Filho:** Formal analysis, Supervision, Writing - review & editing. **Fábio André Brayner:** Formal analysis, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Luiz Carlos Alves:** Conceptualization, Funding acquisition, Formal analysis, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores (SRCCVC)/IAM-Fiocruz-PE for providing the laboratory-reared mosquitoes used in this study and Elisângela Santos Ferreira Dias and Ana Lúcia Albuquerque Texeira of the Insectarium of the Departamento de Entomologia/IAM-Fiocruz for technical support. We would also like to acknowledge Júlia Campos and Isabella Santos (CETENE, Recife, Brazil) for providing help with microbial identification by MALDI-TOF and Iany Raíssa França for help with mosquito dissection. This work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - Brazil (FACEPE).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.actatropica.2019.105174](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105174).

References

- Boissière, A., Tchiffio, M.T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S.E., Shahbazkia, H.R., Awono-Ambene, P.H., Levashina, E.A., Christen, R., Morlais, I., 2012. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002742>.
- El Hamzaoui, B., Laroche, M., Almeras, L., Bérenger, J.M., Raoult, D., Parola, P., 2018. Detection of *Bartonella* spp. in fleas by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006189>.
- Fall, B., Lo, C.I., Samb-ba, B., Perrot, N., Diawara, S., Gueye, M.W., Sow, K., Chatellier, S., Wade, B., Aubadie-ladrix, M., Mediannikov, O., Sokhna, C., Dieme, Y., Chatellier, S., Wade, B., Raoult, D., Fenollar, F., 2015. The ongoing revolution of MALDI-TOF mass spectrometry for microbiology reaches tropical Africa. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 641–647.
- Franz, A.W.E., Kantor, A.M., Passarelli, A.L., Clem, R.J., 2015. Tissue barriers to arbovirus

- infection in mosquitoes. *Viruses* 7, 3741–3767.
- Gaspar, J., Terentjeva, M., Kántor, A., Ivanišová, E., Kluz, M., Kacániová, M., 2017. Identification of *Apis mellifera* Gut Microbiota with MALDI-TOF MS biotyper. *Anim. Sci. Biotechnol.* 50, 192–196.
- Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., Lamballerie, X.D., 2017. Emerging arboviruses: why today? *One Health* 4, 1–13.
- Guedes, D.R.D., Paiva, M.H.S., Donato, M.M.A., Barbosa, P.P., Krokovskiy, L., Rocha, S.W.S., Saraiva, K.L.A., Crespo, M.M., Rezende, T.M.T., Wallau, G.L., Barbosa, R., Oliveira, C.M.F., Melo-santos, M.A.V., Pena, L., Cordeiro, M.T., Franca, R.F.D.O., Oliveira, A.L.S.De, Peixoto, C.A., Leal, W.S., Ayres, C.F.J., 2017. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg. Microbes Infect.* 6, 1–11.
- Guzzetta, G., Poletti, P., Montarsi, F., Baldacchino, F., Capelli, G., Rizzoli, A., Rosà, R., Merler, S., 2016. Assessing the potential risk of Zika virus epidemics in temperate areas with established *Aedes albopictus* populations. *Euro Surveill.* 21, 1–6.
- Harbach, R.E., Knight, K.L., 1980. Taxonomists' Glossary of Mosquito Anatomy. Plexus Pub. ed., New Jersey.
- Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay Jr, J.O., 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1227–1232. doi:10.1002/(SICI)1097-0231(19960731)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6.
- Krager, A., 2016. Current developments to use linear MALDI-TOF spectra for the identification and typing of bacteria and the characterization of other cells/organisms related to infectious diseases. *Proteom. Clin. Appl.* 10, 982–993.
- Martins, W., Carvalhaes, C.G., Cayó, R., Gales, A.C., Pignatari, A.C., 2015. Co-transmission of *Rahnelia aquatilis* between hospitalized patients. *Braz. J. Infect. Dis.* 19, 648–650. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.07.009.
- Minard, G., Tran, F.-H., Dubost, A., Tran-Van, V., Mavingui, P., Moro, C.V., 2014. Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: a pilot study. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–9.
- Moloo, A., 2017. World health assembly approves comprehensive global approach against vector-borne diseases [WWW document]. World Heal. Organ URL. https://www.who.int/neglected_diseases/news/comprehensive_global_approach_against_vector_borne_diseases/en/ Accessed: 10.2.18.
- Muturi, E.J., Kim, C.H., Bara, J., Bach, E.M., Siddappaji, M.H., 2016. *Culex pipiens* and *Culex restuans* mosquitoes harbor distinct microbiota dominated by few bacterial taxa. *Parasit. Vectors* 9, 1–11. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1299-6.
- Muturi, E.J., Ramirez, J.L., Rooney, A.P., Kim, C., 2017. Comparative analysis of gut microbiota of mosquito communities in central Illinois. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–18.
- Perlati, B., Luiz, A.L., Prieto, E.L., Fernandes, J.B., da Silva, M.F.d.G.F., Ferreira, D., Costa, E.N., Júnior, A.L.B., Forim, M.R., 2017. MALDI-TOF MS identification of microbiota associated with pest insect *Diabrotica speciosa*. *Agric. For. Entomol.* 19, 408–417.
- Praet, J., Aerts, M., Brandt, E.De, Meeus, I., Smagghe, G., Vandamme, P., 2016. *Apibacter mensalis* sp. nov.: a rare member of the bumblebee gut microbiota. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1645–1651.
- Ramirez, J.L., Souza-Neto, J., Torres Cosme, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J.M., Dmiopoulos, G., 2012. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001561.
- Saldaña, M.A., Hegde, S., Hughes, G.L., 2017. Microbial control of arthropod-borne disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 1–13. https://doi.org/10.1590/0074-02760160373.
- Santos, I.C., Hildenbrand, Z.L., Schug, K.A., 2016. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst* 141, 2827–2837. https://doi.org/10.1039/c6an00131a.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Virdi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6, 1–16.
- Stathopoulos, S., Neafsey, D.E., Lawniczak, M.K.N., Muskavitch, M.A.T., Christophides, G.K., 2014. Genetic dissection of anopheles gambiae gut epithelial responses to *Serratia marcescens*. *PLoS Pathog.* 10, 1–25. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003897.
- Tandina, F., Almeras, L., Koné, A.K., Doumbo, O.K., Raoult, D., Parola, P., 2016. Use of MALDI-TOF MS and culturomics to identify mosquitoes and their midgut microbiota. *Parasit. Vectors* 9, 1–11.
- Wang, Y., Rozen, D.E., 2017. Gut microbiota colonization and transmission in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* throughout development. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–26. https://doi.org/10.1128/AEM.03250-16.
- Yadav, K.K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H.K., Prasad, G.B.K.S., Veer, V., 2015. Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasit. Vectors* 8, 641. https://doi.org/10.1186/s13071-015-1252-0.
- Zouache, K., Raharimalala, F.N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L.H.R., Ravelonandro, P., Mavingui, P., 2011. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75, 377–389. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x.

APÊNDICE B – Artigo submetido a Acta Tropica 24/05/19 - ACTROP_2019_658

Influence of the microbiota in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* on the expression of defensin and cecropin as well as on the viral dynamic of the Dengue virus, serotype 1.

Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves^{1,2}, Victor Emanuel Petricio Guimarães^{1,5}, Ana Paula Sampaio Feitosa², Fábio André Brayner dos Santos^{1,2}, Marli Tenório Cordeiro⁴, Maria Alice Varjal de Melo Santos³, Claudia Maria Fontes de Oliveira³, José Luiz de Lima Filho², Luiz Carlos Alves^{1,2}

¹Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Recife, Brazil

²Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

³Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Recife, Brazil

⁴Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE), Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Recife, Brazil

⁵Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brazil

E-mails:

Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves - gabrielgazzoni@gmail.com

Victor Emanuel Petricio Guimarães – victorpetricio@gmail.com

Ana Paula Sampaio Feitosa – sampaiofeitosa@gmail.com

Fábio André Brayner dos Santos - brayner.santos@gmail.com

Marli Tenório Cordeiro – marli@cpqam.fiocruz.br

Maria Alice Varjal de Melo Santos – mavarjal@gmail.com

Claudia Maria Fontes de Oliveira – claudia@cpqam.fiocruz.br

José Luiz de Lima Filho – joseluiz60@gmail.com

Luiz Carlos Alves - lcalves@cpqam.fiocruz.br

The corresponding author is Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves

Declarations of interest: none

Abstract

Dengue is an important disease caused by Dengue virus (DENV), whose main vector in Brazil is the mosquito *Aedes aegypti*. *Culex quinquefasciatus* is very common in Brazilian territory but is not considered a vector for this virus. Recently, natural microbiota of mosquitoes relates to susceptible this insect to pathogen infection and we investigated the influence of microbiota in *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus* on the viral dynamic of DENV as well as your influence on the expression of important antimicrobial peptides (AMPs). This included comparisons of mosquitoes treated and not-treated with antibiotics and infected and non-infected with DENV serotype 1. According to our findings, the absence of microbiota decreases the expression of AMPs both in *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*. Furthermore, *Ae. aegypti* treated with antibiotics and infected with DENV has become more susceptible to this viral infection when compared with mosquitoes not-treated. In *Cx. quinquefasciatus* treated with antibiotics doesn't have its viral dynamic altered, remains refractory to the Dengue virus. Taken together, our data suggest that the natural microbiota has importance in the expression of important AMPs in mosquitoes and can modulating the pathogen dynamic in mosquito susceptible to Dengue virus infection.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, Dengue virus, antimicrobial peptides, dynamic viral.