



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

DEIDRE MACHADO SERRÃO

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS ISOLADAS DE *Anopheles darlingi*
ROOT, 1926 PARA O CONTROLE DA MALÁRIA POR PARATRANSGÊNESE

MANAUS
2019

DEIDRE MACHADO SERRÃO

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS ISOLADAS DE *Anopheles darlingi*
ROOT, 1926 PARA O CONTROLE DA MALÁRIA POR PARATRANSGÊNESE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

MANAUS

2019

DEIDRE MACHADO SERRÃO

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS ISOLADAS DE *Anopheles darlingi*
ROOT, 1926 PARA O CONTROLE DA MALÁRIA POR PARATRANSGÊNESE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação: 31/05/2019.

Banca Examinadora:

Dr. Wanderli Pedro Tadei
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio
Universidade do Estado do Amazonas

Dr. Marcos César Fernandes Pessoa
Universidade Federal do Amazonas

**MANAUS
2019**

Ficha Catalográfica
(Catalogação da fonte realizada pela Biblioteca Central – UEA)

487b Serrão, Deidre Machado
Bioprospecção de bactérias cultiváveis isoladas de *Anopheles darlingi* Root, 1926 para o controle da malária por paratransgênese.
/ Deidre Machado Serrão. Manaus : [s.n], 2019.
84 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

Inclui bibliografia

Orientador: Wanderli Pedro Tadei

1. Bactérias simbióticas. 2. Paratransgênese. 3. Bloqueio da transmissão. 4. Malária. 5. Amazônia. I. Wanderli Pedro Tadei (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Bioprospecção de bactérias cultiváveis isoladas de *Anopheles darlingi* Root, 1926 para o controle da malária por paratransgênese.

CRB-11/463

Dedico

*Aos meus pais Maria das Dores Machado e João Alfaia Serrão por todo amor e apoio.
Sou grata e os amo incondicionalmente.*

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.
Simone de Beauvoir

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*
Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus por ouvir minhas preces e me manter forte diante das dificuldades.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - UEA e docentes do curso por todo conhecimento compartilhado.

A FAPEAM pelo auxílio financeiro que possibilitou custear minhas despesas longe de casa.

Ao meu orientador Dr. Wanderli Tadei pela oportunidade, orientação, conhecimento compartilhado e por contribuir na minha formação.

Aos meus pais Maria das Dores e João Alfaia por serem as melhores pessoas desse mundo. Sem o amor, dedicação, esforço, educação e todo suporte emocional e financeiro de vocês eu não seria nada e nunca poderia ir em busca dos meus sonhos. Ficar longe é a pior parte, mas tudo isso é por vocês. Minha gratidão e amor eterno.

Aos meus irmãos, Genner, Gilvandro, Geana, Gilvanni, Júnior, Geandro e Tallyne, obrigada por todo apoio, sei que posso contar com vocês e obrigada por me darem as coisinhas mais preciosas da vida que são os meus sobrinhos, sou apaixonada por cada um: Victória, Genner Júnior, Kalel, Yamê, Maria Luísa, Guilherme, Vinícius e o anjinho que foi morar no céu, Gabriel.

À minha avó Ana Barros por ser tão guerreira e se orgulhar das minhas conquistas. Ao meu avô Antônio Machado (*in memoriam*). Meus tios/tias, primos/primas por me darem o apoio necessário.

Ao meu amor, companheiro e amigo Marvin, por todo suporte emocional, carinho, dedicação, paciência e apoio. Você foi/é fundamental na minha vida. Obrigada por não hesitar em embarcar nessa jornada comigo, com você aqui tudo ficou mais fácil. Eu te amo!

Ao meu co-orientador não oficial Elerson por todos os ensinamentos, amizade, auxílio, caronas e por me apresentar esse projeto tão especial e a Laura pelo companheirismo, amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho. A união da nossa pequena equipe foi fundamental para a realização e conclusão dessa Dissertação.

Aos meus amigos Juan, Vera, Katak e Neila pelo apoio, risadas e motivação, vocês são muito especiais.

Aos amigos do Laboratório de Malária e Dengue do INPA: Martinha, William, Eunice, Augusto, Adriano e Thamiles pelos momentos de descontração, conversas e pelo convívio. E a Rejane por todo auxílio e ensinamento nas coletas, manutenções dos mosquitos e dissecações, juntamente com os técnicos do laboratório.

Ao Laboratório de Tecnologias do DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM-UFAM) por ceder o plasmídeo utilizado nesta pesquisa e aos colegas do laboratório pela ajuda nos momentos de dúvidas, em especial, ao Paulo que nos auxiliou em vários momentos e sempre esteve disponível para ajudar.

Ao Marcos por fornecer materiais e reagentes que, sem dúvida, foram importantíssimos para a conclusão deste trabalho.

À minha turma MBT17 pelas conversas e momentos compartilhados, em especial, a Gabi pelo apoio, incentivo e a Dorothy pelo suporte e auxílio nas questões burocráticas da secretaria.

Às minhas amigas: Maria, Sheina, Luana, Hellem e Michelle por me motivarem sempre.

À família do meu namorado, tias, avós, primas e primos pelo acolhimento, incentivo e carinho, em especial, a minha sogra por todo auxílio e apoio.

E todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta Dissertação e na minha formação acadêmica, muito obrigada!

RESUMO

Os mosquitos do gênero *Anopheles* Meigan, 1818 são os principais vetores de parasitas causadores da malária humana, doença de importância médica mundial que afeta também a economia de muitos países. No Brasil, o vetor mais prevalente é a espécie *Anopheles darlingi* Root, 1926, cuja fêmea é altamente suscetível à infecção pelo protozoário *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, 1890, responsável pela maioria dos casos registrados na Amazônia brasileira. Apesar de inúmeros avanços com amplitude mundial, através de estratégias de controle vetorial, diagnóstico precoce e tratamento, a malária ainda constitui um grave problema de saúde pública. Neste cenário, uma alternativa que apresenta grande potencial no combate à malária e outras doenças vetoriais é a paratrângenese, método que utiliza bactérias simbiotes geneticamente modificadas como condutores de moléculas antiparasitárias. No entanto, para o sucesso da paratransgenia, os microrganismos utilizados devem ter associação constante com o vetor, serem transmitidos vertical, horizontal e transestadialmente, além disso, serem cultiváveis, passíveis de manipulação genética e não patogênicos aos seres humanos. Diante do exposto e levando em consideração os escassos trabalhos relacionados à transmissão de bactérias em *A. darlingi*, bem como a composição da sua microbiota, este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias cultiváveis, que apresentam características de transmissão vertical em *A. darlingi*, para serem utilizadas no controle da malária, por meio de abordagens paratransgênicas. Para isso, foi realizado o isolamento bacteriano, caracterização morfológica e identificação molecular pelo gene 16S rRNA de bactérias, isoladas de ovários dos mosquitos adultos de *A. darlingi*, coletados em uma área periurbana de Manaus, bem como bactérias de ovos, larvas e ovários de mosquitos criados em laboratório. Quatro espécies bacterianas identificadas também foram testadas para verificar seu potencial de transformação, pelo método de eletroporação. Os resultados obtidos demonstraram que das 176 bactérias isoladas, 62 identificadas corresponderam aos filos: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes, com dois gêneros predominantes, *Acinetobacter* e *Enterobacter*. Pela análise molecular também foi possível a detecção de seis gêneros detectados pela primeira vez em *A. darlingi*: *Elizabethkingia*, *Cupriavidus*, *Leucobacter*, *Pectobacterium*, *Rhizobium* e *Nubsella*. As espécies que apresentaram indícios de transmissão vertical no mosquito estudado foram: *Acinetobacter bereziniae*, *Enterobacter asburiae* e *Serratia marcescens*, sendo esta última a que apresentou melhor potencial de transformação com o plasmídeo pKS1-GFP, que expressa a proteína fluorescente GFP, útil para futuros testes de monitoramento em *A. darlingi*.

Palavras-chave: bactérias simbióticas, paratransgênese, bloqueio da transmissão, malária, Amazônia.

ABSTRACT

Mosquitoes of the genus *Anopheles* Meigan, 1818 are the main vectors of parasites that cause human malaria, a disease of global medical importance that also affects the economies of many countries. In Brazil, the most prevalent vector is *Anopheles darlingi* Root, 1926, whose female is highly susceptible to infection by the protozoan *Plasmodium vivax* Grassi and Feletti, 1890, responsible for most cases recorded in the Brazilian Amazon. Despite numerous advances worldwide, through strategies of vector control, early diagnosis and treatment, malaria still constitutes a serious public health problem. In this scenario, an alternative that presents great potential in the fight against malaria and other vector diseases is paratransgenesis, a method that uses genetically modified symbiotic bacteria as conductors of antiparasitic molecules. However, for the success of the paratransgenia, the microorganisms used must have constant association with the vector, being able to be transmitted vertically, horizontally and transestationally, besides being cultivable, susceptible of genetic manipulation and not pathogenic to humans. In view of the above and taking into account the scarce work related to the transmission of bacteria in *A. darlingi*, as well as the composition of its microbiota, this work had the objective to select cultivable bacteria, which present characteristics of vertical transmission in *A. darlingi*, to be used in the control of malaria, through paratransgenic approaches. For this, bacterial isolation was performed, morphological characterization and molecular identification by the 16S rRNA gene of bacteria isolated from ovaries of *A. darlingi* adult mosquitoes collected in a periurban area of Manaus, as well as their eggs, larvae and ovaries of mosquitoes born in the laboratory. Four identified bacterial species were also tested to verify their transformation potential by the electroporation method. The results obtained demonstrated that of the 176 bacteria isolated, 62 identified corresponded to the phyla: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Firmicutes, with two predominant genera, *Acinetobacter* and *Enterobacter*. By molecular analysis it was also possible to detect six genera detected for the first time in *A. darlingi*: *Elizabethkingia*, *Cupriavidus*, *Leucobacter*, *Pectobacterium*, *Rhizobium* and *Nubsella*. The species that presented signs of vertical transmission in the mosquito studied were: *Acinetobacter bereziniae*, *Enterobacter asburiae* and *Serratia marcescens*, the latter being the one with the best potential for transformation with the plasmid pKS1-GFP, which expresses the GFP fluorescent protein, useful for future tests of monitoring in *A. darlingi*.

Key words: symbiotic bacteria, paratransgenesis, transmission blockade, malaria, Amazon.

1 LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Exemplos de bactérias que atuam na interferência de patógenos transmitidos por mosquitos do gênero <i>Anopheles</i> | 25 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

CAPÍTULO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Iniciadores 16S rRNA utilizados..... | 76 |
| Tabela 2. Espécies bacterianas identificadas dos ovários de mosquitos selvagens..... | 83 |
| Tabela 3. Bactérias identificadas nas amostras de ovários de <i>A. darlingi</i> criados em laboratório. | 83 |
| Tabela 4. Bactérias identificadas em ovos de <i>A. darlingi</i> | 84 |
| Tabela 5. Bactérias presentes em amostras de larvas de <i>A. darlingi</i> | 84 |

2 LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Status de países com casos de malária em 2017..... | 19 |
| Figura 2. Morfologia dos estágios de vida de <i>A. darlingi</i> | 21 |
| Figura 3. Esquema de representação da paratransgênese..... | 28 |
| Figura 4. Regiões variáveis do gene 16S rRNA, com ênfase nos primers utilizados nesta pesquisa (27F e 1100R)..... | 32 |

CAPÍTULO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ovários de mosquitos selvagens e criados em laboratório..... | 48 |
| Figura 2. Isolados bacterianos e suas formas celulares..... | 50 |
| Figura 3. Árvore filogenética das amostras bacterianas de ovários de mosquitos selvagens da espécie <i>A. darlingi</i> | 52 |
| Figura 4. Árvore filogenética de bactérias identificadas nas amostras dos ovários de mosquitos <i>A. darlingi</i> criados em laboratório..... | 53 |
| Figura 5. Árvore filogenética de espécies bacterianas presentes nas amostras de ovos de mosquitos <i>A. darlingi</i> | 53 |
| Figura 6. Árvore filogenética das bactérias detectadas em larvas de <i>A. darlingi</i> | 54 |
| Figura 7. Filos bacterianos identificados em todas as amostras de <i>A. darlingi</i> | 55 |
| Figura 8. Gêneros bacterianos presentes em todas as amostras estudadas..... | 56 |
| Figura 9. Diferentes espécies bacterianas detectadas nos ovários, ovos e larvas de <i>A. darlingi</i> | 59 |
| Figura 10. Bactérias que apresentaram indícios de transmissão vertical em <i>A. darlingi</i> | 60 |
| Figura 11. Testes de transformação bacteriana com as quatro cepas selecionadas..... | 62 |
| Figura 12. A) Placa de Petri contendo colônias bacterianas de <i>S. marcescens</i> transformadas; B) Meio Luria Bertani líquido com células bacterianas transformadas..... | 63 |
| Figura 13. Local de coleta de mosquitos adultos..... | 72 |
| Figura 14. (A) Captura noturna de mosquitos adultos; (B) Repasto sanguíneo em hamster; (C) Fêmeas transferidas individualmente para copos parafinados; (D) Identificação..... | 72 |
| Figura 15. (A) Manutenções diárias; (B) Copo contendo larvas..... | 73 |
| Figura 16. Esterelização das amostras; (B) Plaqueamento; (C) Placa com colônias bacterianas; (D-E) Técnica de esgotamento por estrias cruzadas para isolamento e purificação bacteriana..... | 74 |
| Figura 17. Plasmídeo pKS1-GFP..... | 79 |
| Figura 18. Ilustração do plaqueamento de células eletroporadas..... | 80 |
| Figura 19. Morfologia das bactérias isoladas de ovários de mosquitos selvagens..... | 81 |
| Figura 20. Morfologia das bactérias isoladas de ovos de <i>A. darlingi</i> | 81 |
| Figura 21. Morfologia das bactérias isoladas de larvas de <i>A. darlingi</i> | 82 |
| Figura 22. Morfologia das bactérias isoladas de mosquitos <i>A. darlingi</i> criados no laboratório..... | 82 |

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 16 |
| 2.1 Malária..... | 16 |
| 2.2 Epidemiologia..... | 18 |
| 2.3 <i>Anopheles darlingi</i> : principal vetor da malária no Brasil..... | 20 |
| 2.4 Associação simbiótica entre insetos e sua microbiota..... | 22 |
| 2.5 Principais filos e gêneros bacterianos associados ao gênero <i>Anopheles</i> | 24 |
| 2.6 Alternativas de controle da malária..... | 26 |
| 2.7 Paratransgênese..... | 27 |
| 2.8 Identificação molecular bacteriana e engenharia genética na paratransgenia..... | 31 |
| 3 OBJETIVOS..... | 34 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 34 |
| 3.1 Objetivos específicos..... | 34 |
| 4. REFERÊNCIAS..... | 35 |
| CAPÍTULO..... | 44 |
| INTRODUÇÃO..... | 45 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |
| Área de estudo, manutenção de mosquitos e dissecações..... | 47 |
| Isolamento bacteriano e caracterização morfológica..... | 48 |
| Extração de DNA genômico, PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA..... | 48 |
| Transformação genética bacteriana..... | 49 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 50 |
| Isolamento e caracterização morfológica de espécies bacterianas presentes nos ovários, ovos e larvas de <i>A. darlingi</i> | 50 |
| Cepas bacterianas identificadas em todas as amostras de <i>A. darlingi</i> | 51 |
| Composição da comunidade bacteriana de ovários, ovos e larvas de <i>A. darlingi</i> | 54 |
| Indícios de transmissão vertical de bactérias em <i>A. darlingi</i> | 60 |
| Teste de transformação genética em isolados bacterianos..... | 61 |
| CONCLUSÕES..... | 63 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 64 |
| REFERÊNCIAS..... | 65 |
| MATERIAL COMPLEMENTAR..... | 71 |
| Metodologia detalhada..... | 71 |
| Atlas morfológico de 62 colônias bacterianas identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 16S..... | 81 |
| Tabelas das espécies bacterianas identificadas e porcentagem de similaridade..... | 83 |

INTRODUÇÃO

A malária continua sendo uma ameaça global, responsável por inúmeras mortes e perdas econômicas, em suas áreas de ocorrência (WHO, 2018). No Brasil, a doença é prevalente na região Amazônica que registra 99% dos casos e o seu principal causador, *Plasmodium vivax*, é transmitido pelo mosquito *Anopheles darlingi*, cuja fêmea é altamente suscetível à infecção (DEANE, 1986; TADEI et al., 1998).

Evidentemente, os métodos de controle baseados em inseticidas para a eliminação do vetor são insuficientes e os crescentes números de mosquitos resistentes a inseticidas e parasitas resistentes a medicamentos antimaláricos, dificultam os esforços de combate à doença, sendo necessárias medidas suplementares (WANG e JACOBS-LORENA, 2013; GABRIELI et al., 2014; MUEMA et al., 2017; GUÉGAN et al., 2018).

Como a transmissão do parasita da malária depende do sucesso do *Plasmodium* spp. nos diferentes estágios de transição e há uma perda significativa de oocinetos, quando estes atravessam o epitélio do intestino médio para se transformar em oocistos e, posteriormente, em esporozoítos, uma alternativa viável seria impedir o desenvolvimento do parasita ainda dentro do mosquito, evitando a transmissão das formas infectantes aos hospedeiros vertebrados (GHOSH et al., 2000; BISI e LAMPE, 2011; CIRIMOTICH et al., 2011; WANG e JACOBS-LORENA, 2013). A paratransgênese apresenta-se como uma alternativa promissora para entrega de genes anti-*Plasmodium*, pois esta visa impedir o desenvolvimento de patógenos dentro do hospedeiro invertebrado, por meio de bactérias simbióticas geneticamente modificadas que compartilham os mesmos locais que os parasitas (DURVASULA et al., 1997; BEARD et al., 2002; BISI e LAMPE, 2011; WANG e JACOBS-LORENA, 2013).

Alguns estudos relatam que comunidades bacterianas associadas a insetos podem desempenhar funções importantes e atuar na digestão, metabolismo, reprodução, desenvolvimento e proteção contra patógenos, por isso estas são propostas como alternativas viáveis no combate de patógenos, por meio da paratransgenia que utiliza técnicas da engenharia genética (MORAN, 2006; DOUGLAS, 2011; MINARD et al., 2013; WANG e JACONBS-LORENA, 2013; GUÉGAN et al., 2018)

No entanto, para a aplicação da paratransgênese são necessárias algumas recomendações quanto ao simbionte adequado: 1) este deve ser cultivável e passível de manipulação; 2) ser transmitido durante as fases do mosquito e habitar diferentes partes do corpo do inseto, estando em constante associação; 3) não ser considerada patogênica aos humanos; 4) deve permanecer estável após a transformação genética e se propagar

eficientemente nas populações de insetos (BEARD et al., 2002; WANG e JACOBS-LORENA, 2013; WILKE e MARRELLI, 2015). Além disso, a identificação de genes efetores eficientes contra patógenos é essencial (WANG e JACOBS-LORENA, 2013).

Algumas espécies bacterianas gram-negativas, pertencentes ao filo Proteobacteria e aos gêneros *Serratia*, *Asaia*, *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Enterobacter* já foram identificadas em populações de mosquitos *Anopheles* spp. do continente africano e estas foram propostas como simbiossomas que apresentam grande potencial na paratransgenia (FAVIA et al., 2007; WANG et al., 2012; CAPONE et al., 2013; MINARD et al., 2013; DEHGHAN et al., 2017; CHAVSHIN et al., 2015; MANCINI et al., 2016; WANG et al., 2017). No entanto, poucas espécies de bactérias foram relatadas em mosquitos transmissores da malária no continente americano e os estudos da microbiota de anofelinos brasileiros ainda são escassos.

Dessa forma, embora o uso de simbiossomas bacterianos seja promissor, faz-se necessária a identificação de espécies bacterianas bem estabelecidas em *A. darlingi*, principal vetor da malária no Brasil, bem como investigações sobre as interações da microbiota associada e suas rotas de transmissão para seleção de potenciais candidatos para alternativas de controle (COUTINHO-ABREU et al., 2010; GUÉGAN et al., 2018).

Portanto, este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias cultiváveis que apresentam características de transmissão vertical, em *A. darlingi*, para utilizá-las em futuras abordagens paratransgênicas no controle da malária.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Malária

A malária é uma doença vetorial, transmitida por mosquitos e causada por protozoários pertencentes ao gênero *Plasmodium* spp. Machiafava e Celli, 1983, filo Apicomplexa (PHILLIPS et al., 2017). No homem, pode ser desencadeada por seis espécies diferentes: *Plasmodium malariae* Feletti e Grassi, 1889; *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, 1890; *Plasmodium falciparum* Welch, 1897; *Plasmodium ovale wallikeri* e *Plasmodium ovale curtisi* (espécies distintas, conhecidas anteriormente como *Plasmodium ovale* Stephens, 1922) e *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulliga, 1933 (SUTHERLAND et al., 2010; HIWAT e BRETAS, 2011; OGUIKE et al., 2011; AHMED e COX-SINGH, 2015; AMIR et al., 2016; COWMAN et al., 2016; PHILLIPS et al., 2017). Dentre elas, *P. falciparum*, predominante no continente Africano e *P. vivax*, amplamente distribuído em regiões tropicais, correspondem às espécies responsáveis pelos maiores números de casos da infecção (WHO, 2018).

Em geral, a sua transmissão ocorre quando a fêmea do mosquito *Anopheles* Meigan, 1818 realiza o repasto sanguíneo no homem e por meio da saliva injeta a forma infectante do *Plasmodium* spp., o esporozoíto (NAING et al., 2014; PHILLIPS et al., 2017; CDC, 2018). No entanto, para o sucesso da transmissão, o protozoário deve se desenvolver dentro do corpo do inseto, superar o sistema imunológico do mesmo e se alojar nas glândulas salivares (BLUT, 2009; RÍOS-VELÁSQUEZ et al., 2013).

O ciclo do parasita da malária inicia-se quando os esperozoítos, após serem injetados no homem, caem diretamente na corrente sanguínea e movem-se rapidamente para as células hepáticas, replicando-se de forma assexuada em esquizontes multinucleares (PHILLIPS et al., 2017; CDC, 2018). Os esquizontes geram milhares de merozoítos (esta fase dura dias ou semanas, dependendo da espécie de *Plasmodium* spp.) e estes acabam rompendo as células hepáticas parasitadas e caindo na corrente sanguínea (BLUT, 2009). Uma parcela de merozoítos são fagocitados ou destruídos e, os que continuam invadindo eritrócitos, amadurecem e diferenciam-se em gametócitos femininos e masculinos (BLUT, 2009; COWMAN et al., 2016; PHILLIPS et al., 2017).

O ciclo continua quando o mosquito, ao realizar o repasto sanguíneo no homem, ingere as formas sexuais do parasita (gametócitos), presentes na corrente sanguínea (BLUT, 2009; RÍOS-VELÁSQUEZ et al., 2013). Estes, por sua vez, migram para o tubo digestivo do inseto onde se fundem por reprodução sexuada, dando origem a um zigoto flagelado, o oocineto que,

posteriormente, penetra no intestino do mosquito e gera a forma denominada oocisto (RÍOS-VELÁSQUEZ et al., 2013; CDC, 2018). Na parte interna do oocisto, ocorre um processo de divisão esporogônica, que ocasiona a ruptura e liberação de esporozoítos para todo o corpo do inseto. Algumas destas formas infectantes deslocam-se para as glândulas salivares do mosquito a espera de uma refeição sanguínea, para invadir o hospedeiro vertebrado e continuar o seu desenvolvimento (BLUT, 2009; COWMAN et al., 2016; PHILLIPS et al., 2017).

Em alguns casos, indivíduos parasitados por *P. vivax* e *P. ovale* podem abrigar hipnozoítos (formas inativas do parasita) em suas células hepáticas e, após meses ou anos, estas formas podem ser reativadas para continuar o ciclo eritrocítico e causar as chamadas “recaídas” (BLUT, 2009; PHILLIPS et al., 2017; CDC, 2018).

Os sintomas da infecção são desencadeados pela resposta imune do hospedeiro e pela invasão dos parasitas nos glóbulos vermelhos que, afetados pelo forte consumo e degradação de proteínas intracelulares, são destruídos (BLUT, 2009). Isso ocorre em torno de 7 a 12 dias, após da inoculação do parasita no homem e os sintomas incluem: febre, calafrios, dor de cabeça, dores nos membros e músculos, náuseas, vômitos e hipotensão ortostática (CDC, 2018). No entanto, os aspectos característicos da infecção são ataques periódicos e intensos de calafrios, febre alta, sudorese e exaustão que acontecem em intervalos de 2 dias quando causado por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale*, e a cada 3 dias por *P. malariae* (FRANÇA et al., 2008; BRASIL, 2009; BLUT, 2009; CDC, 2018). Nos casos mais críticos, em sua maioria, causados pelo protozoário *P. falciparum*, pode ocorrer anemia grave, convulsões, hemoglobina na urina, comprometimento das funções renais e hepáticas, danos nos órgãos e “malária cerebral”, que inclui anormalidades neurológicas, muitas vezes, fatal ao enfermo (BLUT, 2009; CDC, 2018).

Devido aos sintomas iniciais da malária serem semelhantes a outras doenças, o diagnóstico rápido é imprescindível, pois possibilita o tratamento imediato antes do desenvolvimento progressivo da transmissão (GLÓRIA et al., 2018). Em vista disso, existem métodos que detectam a presença do parasita. Um deles é o exame microscópico, que pode ser realizado tanto pela técnica do esfregaço sanguíneo delgado, corado com Giemsa ou pelo exame de gota espessa, em que a lâmina com o material é corada pela técnica de Walker (azul de metileno e Giemsa) (BLUT, 2009; BRASIL, 2009; GLÓRIA et al., 2018). Ambos são de baixo custo e permitem a identificação do plasmódio, porém o método de gota espessa é mais utilizado na prática. Além desses, existem outros métodos como: RDTs (Testes Rápidos de Diagnóstico), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), imunofluorescência, diagnósticos moleculares, dentre outros que, apesar de eficientes, possuem alto custo e são de difícil acesso (BLUT, 2009; BRASIL, 2009; CDC, 2018; GLÓRIA et al., 2018).

Em relação à profilaxia, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a quimioprevenção sazonal, que envolve a administração mensal de amodiaquina e sulfadoxina-pirimetamina (WHO, 2018). Considerando o tratamento, os medicamentos variam de acordo com a espécie parasitária e gravidade da infecção. Em casos de malária não-complicada, causada por *P. falciparum*, são recomendadas terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs), com dose adicional de primaquina, em áreas de baixa transmissão (WHO, 2018). Levando-se em conta os casos com *P. vivax* é usada cloroquina (quando não há espécie resistente) e ACTs. Já no tratamento de malária grave, indica-se artesunato injetável por pelo menos 24 horas, seguido de 3 dias de ACTs (WHO, 2018).

2.2 Epidemiologia

Segundo o relatório anual sobre malária, publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2017, a estimativa de casos foi de 219 milhões, distribuídos em mais de 90 países e territórios, pertencentes às regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2018). A maioria destes, reportados à OMS, foram provenientes da África, Ásia e Mediterrâneo Oriental, com 92% de notificações vindas da África Subsaariana, que abriga a maior concentração da doença (WHO, 2018).

Ainda no presente relatório, de 15 países do continente Africano e da Índia, que apresentaram 80% do total de casos globais, cinco tiveram maior participação: Nigéria (25%), República Democrática do Congo (11%), Moçambique (5%), Índia (4%) e Uganda (4%), sendo o principal causador o protozoário *P. falciparum*, espécie predominante nessas regiões. Fora da África, *P. vivax* foi o mais prevalente e representou quase 74% de casos estimados, principalmente no Continente Americano.

Em relação às mortes por malária, foram estimadas aproximadamente 435 mil, com 93% concentradas na região onde há maior incidência da doença (WHO, 2018). Em comparação com o ano anterior, 16 mil mortes foram evitadas, mas crianças menores de 5 anos ainda constituem o grupo mais vulnerável e representam 61% de todas as mortes em nível global (WHO, 2018).

Apesar de inúmeros esforços na prevenção, tratamento e desenvolvimento de pesquisas ao longo dos anos, a malária continua sendo uma ameaça para quase metade da população mundial (3,2 bilhões) (COWMAN et al., 2016; WHO, 2018). Por isso, em 2016 foi criado um programa que visa a sua eliminação até 2030 (Global Technical Strategy - GTS) e este, até o momento, vem expressando bons resultados. No relatório mais recente (2018), foi observado

que 26 países apresentaram menos de 100 casos indígenas, 20 possuem potencial para eliminá-la até 2020 e somente o Paraguai foi certificado neste ano como livre da doença (WHO, 2018) (Figura 1).

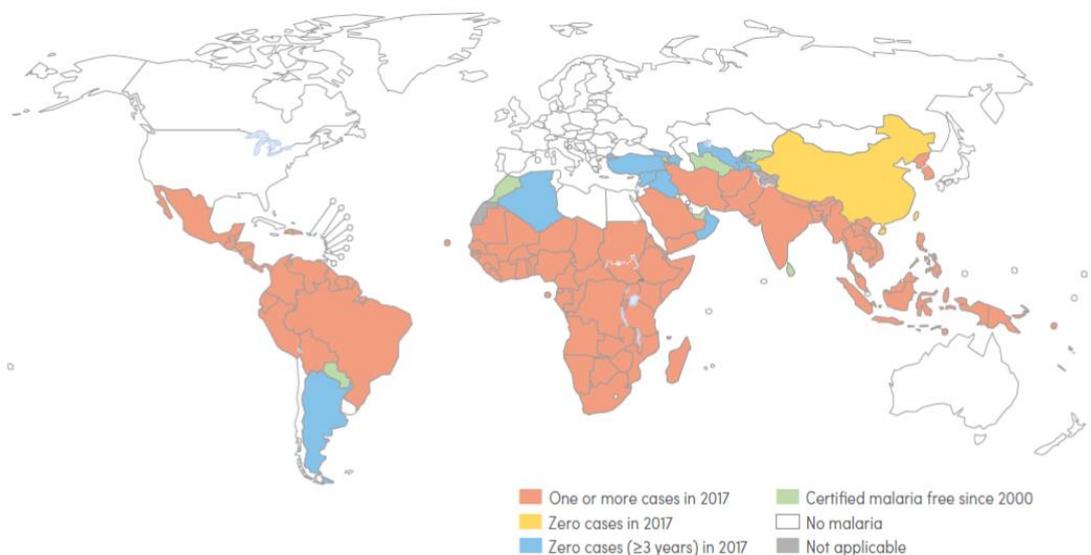


Figura 1. Status de países com casos de malária em 2017. Fonte: WHO.

Referente à Região das Américas, Venezuela (53%), Brasil (22%) e Colômbia (8%) são os países com maior participação no número de casos de malária, a maioria causada por *P. vivax* e *P. falciparum* (WHO, 2018). Especialmente, o Brasil está entre os seis países dessa região que apresentaram potencial para atingir redução de 20% a 40% de casos até 2020. No entanto, em 2018 foi relatado aumento, com mais de 194 mil casos notificados no país, sendo 99% deste total provenientes da Região Amazônica (193.519 casos) (WHO, 2018; BRASIL, 2019). Dentre os Estados pertencentes a essa área, os registros maiores ocorreram no Amazonas, Pará, Acre, Roraima e Amapá, com participação de casos em torno de 37%, 24%, 14%, 12% e 8%, respectivamente (BRASIL, 2019).

Esses dados devem-se principalmente aos aspectos característicos da região, como o grande índice pluviométrico e elevadas temperaturas, que possibilitam a criação dos locais de reprodução do vetor e seu desenvolvimento (TADEI et al., 2012; TADEI et al., 2017). Aliado a isso, desmatamentos desordenados, ações antrópicas e falta de programas de prevenção contínuos têm sua parcela de contribuição para os altos índices de malária na Amazônia (TADEI et al., 2012; SAMPAIO et al., 2015; TADEI et al., 2017).

2.3 *Anopheles darlingi*: principal vetor da malária no Brasil

As espécies do gênero *Anopheles* são conhecidas por sua importância epidemiológica, como vetores da malária, sendo alvo de estudos científicos que visam conhecer aspectos importantes da sua interação com o *Plasmodium*, bem como combater e controlar a transmissão da doença (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

Mundialmente, cerca de 486 espécies deste gênero já foram descritas, sendo 54 delas encontradas no Brasil (DEANE, 1986; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; TADEI e THATCHER, 2000). A de maior ocorrência e importância vetorial no país, especificamente na Amazônia, é o *A. darlingi*, cuja fêmea é altamente suscetível à infecção por *P. vivax* e apresenta comportamento antropofílico e endofílico (DEANE, 1986; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; TADEI et al., 1998). Esta espécie, pertencente à ordem dos dípteros, família Culicidae e subgênero *Nyssorhynchus*, possui uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em grande parte do Continente Americano (ARRUDA et al., 1986; DEANE, 1986; GALARDO, 2010; TADEI, 1987; MANOEL et al., 2010; TADEI et al., 2017). No Brasil, está presente em praticamente todos os Estados, exceto em regiões com alta altitude, no extremo Sul e regiões secas do Nordeste (DEANE, 1986; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

Nas áreas onde *A. darlingi* ocorre ele geralmente é o anofelino mais frequente, atacando o homem dentro de sua própria casa, mesmo em baixa densidade (DEANE, 1986; TADEI et al., 1989; MANOEL et al., 2010; TADEI et al., 2012). O período de hematofagia das fêmeas ocorre geralmente nas primeiras horas noturnas (18h às 20h) e pode variar dependendo de fatores como: área rural ou urbana, densidade do anofelino e de outras espécies, época do ano, distância entre as casas ou floresta e presença ou ausência de outros hospedeiros (TADEI et al., 1983; TADEI et al., 1989; TADEI e THATCHER, 2000; GAMA et al., 2009). Vale ressaltar ainda que o bioma e o padrão comportamental desta espécie não foram totalmente elucidados e, conforme a localidade, podem ocorrer variações (DEANE, 1986). Segundo Tadei e colaboradores (1982) isso decorre do alto polimorfismo cromossômico de *A. darlingi*, que o permite explorar diferentes habitats, durante o período das chuvas.

O ciclo de vida da espécie é completo, ou seja, denominado holometábolo e, portanto, passa por quatro estágios de desenvolvimento que ocorrem parte em ambiente aquático e terrestre (FORATTINI, 2002). No meio aquático, ovos, larvas e pupas crescem em criadouros de água limpa, sombreadas ou iluminadas, com pouca matéria orgânica e vegetação flutuante, como remansos, lagoas, represas, açudes, poças de água e tanques de piscicultura (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). Os ovos (Figura 2A) são postos isoladamente, possuem forma elíptica,

apresentam flutuadores laterais e uma estrutura denominada corola que permite a identificação taxonômica da espécie (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). As larvas (Figura 2B) diferenciam-se de outros dípteros, por possuir uma posição de repouso peculiar, em que ficam em paralelo à superfície da água. São de aspecto vermiforme, passam por 4 estádios larvais e o tempo de desenvolvimento depende de temperatura, luz, vegetação, poluentes, predadores e alimentos disponíveis (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Ainda nesta fase, alimentam-se de uma diversidade de bactérias, algas, esporos de fungos e partículas de matéria orgânica presentes em seu hábitat. Já as pupas (Figura 2C) possuem aspecto de vírgula e, geralmente, estão sempre paradas, não se alimentam e, assim como as larvas, precisam entrar em contato com a superfície da água para respirar (FORATTINI et al., 1973; CONSOLI e FERREIRA, 1994; GALARDO, 2010).

Após passarem pela fase aquática, os mosquitos completam seu ciclo transformando-se em adultos por meio da metamorfose (Figura 2D). Estes se alimentam de carboidratos provenientes de seivas, flores e frutos, mas somente as fêmeas são hematófagas, pois necessitam das proteínas que constituem o sangue para a maturação de ovos e aumento do tempo de vida (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).



Figura 2. Morfologia dos estágios de vida de *A. darlingi*. (A) ovo; (B) larva; (C) pupa; (D) fêmea adulta.

Fonte: Acervo pessoal.

A cópula dos anofelinos ocorre no voo nupcial e, após a sua realização, as fêmeas procuram sangue por meio de seus estímulos sensoriais (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). O hábito hematófago faz com que elas repousem dentro das casas, mas geralmente não permanecem ali por muito tempo (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Além disso, os intervalos entre cada refeição sanguínea duram em torno de três dias e após a postura, elas retornam para sugar mais sangue e continuar o ciclo de oviposição. Em geral, uma única cópula realizada pelas fêmeas permite a oviposição durante todo o seu tempo de vida.

2.4 Associação simbiótica entre insetos e sua microbiota

Dentro de um ecossistema ocorrem inúmeras interações entre organismos vivos e estas são classificadas de acordo com o tipo de dependência entre ambos, podendo ser intra ou interespecíficas, benéficas ou prejudiciais (ROSENBERG e ZILBER-ROSENBERG, 2011; CONTI et al., 2012). A simbiose é um exemplo de relação interespecífica, facultativa ou obrigatória e de longa duração, considerada de fundamental importância para a geração de diversidade biológica (MORAN, 2006). Além de ser onipresente por natureza, animais e plantas estabelecem esta relação simbiótica e, geralmente, as associações mais comuns são com microrganismos (ROSENBERG e ZILBER-ROSENBERG, 2016).

Em um postulado proposto por Rosenberg e colaboradores (2007), derivado de anos de estudos em microbiologia de corais, é retratada essa relação entre organismos. Segundo a teoria, denominada Teoria Hologenoma, o organismo hospedeiro e toda a sua microbiota simbiótica (holobionte) são indissociáveis e seus genes agrupados atuam como uma unidade de seleção, exercendo funções importantes na vida do holobionte (RESHEF et al., 2006; ROSENBERG et al., 2007; ZILBER-ROSENBERG e ROSENBERG, 2008; ROSENBERG e ZILBER-ROSENBERG, 2011).

De fato, após inúmeras pesquisas realizadas ao longo dos anos, a microbiota bacteriana, principalmente a associada a insetos, demonstrou ser imprescindível para o hospedeiro, atuando na defesa de agentes patogênicos, nutrição, reprodução, desenvolvimento e tolerância a estresses abióticos (MORAN, 2006; DOUGLAS, 2011; MINARD et al., 2013). Esses microrganismos simbióticos, geralmente encontrados nas seções intestinais e cavidades corporais de insetos, apresentam-se de forma mutualística obrigatória, contribuindo na vida do hospedeiro, ou de forma facultativa, causando algumas vezes efeitos negativos (HOSOKAWA et al., 2006). Como exemplos de simbiose obrigatória, temos a associação da bactéria *Wigglesworthia glossinidi* com moscas tsé-tsé e *Buchnera* em afídeos, que fornecem nutrientes importantes ao hospedeiro em troca de benefícios (KIKUCHI et al., 2007; PAIS et al., 2008).

Além disso, acredita-se que alguns simbiossomas bacterianos são transmitidos para outra geração verticalmente, ou seja, do progenitor para a prole, por um mecanismo denominado transmissão transovariana, que ocorre nos estágios iniciais da oogênese e embriogênese (HOSOKAWA et al., 2006; MORAN, 2006; KIKUCHI et al., 2007). Um exemplo são bactérias do gênero *Wolbachia*, simbiossomas intracelulares de artrópodes que foram constantemente relatadas, presentes nas linhas germinativas maternas, na maioria dos insetos (FAST et al.,

2011). Nesse mecanismo, a fêmea desempenha um papel maior em quase todos os casos, porém há também relatos de transmissão paterna (DAMIANI et al., 2008).

Em certos casos, ocorre ainda a transmissão vertical por meio de uma “cápsula simbiote”, como é o caso de percevejos da família Plataspidae (HOSOKAWA et al., 2006; KIKUCHI et al., 2007). No entanto, esta não é considerada uma rota obrigatória em insetos, pois existe a ocorrência de transmissão horizontal, no qual os simbiotes são adquiridos de uma fonte externa, geralmente do ambiente em que vivem durante a fase larval (MORAN, 2006; BRIGHT e BULGHERESI, 2010).

Muitas vezes, outros simbiotes, são considerados facultativos e podem causar efeitos negativos na reprodução e expectativa de vida de seus hospedeiros ou interferir na replicação de patógenos (HOSOKAWA et al., 2006). Como exemplos, têm-se bactérias do gênero *Wolbachia* que, além de serem encontradas em associação com inúmeros insetos, como *Drosophila*, *Aedes* e *Culex*, já foram relatadas como simbiotes que interferem na aptidão do seu hospedeiro (ITURBE-ORMAETXE et al., 2011).

Uma grande quantidade de microrganismos pode ser encontrada nas superfícies e dentro do corpo de insetos, mas geralmente a composição da microbiota bacteriana de um hospedeiro pode ser influenciada pela fase de desenvolvimento, aptidão, sexo, propriedades físico-químicas, hábitos alimentares, habitat, competição bacteriana, dentre outros (DOUGLAS, 2011; GENDRIN e CHRISTOPHIDES, 2013; MINARD et al., 2013).

Em um trabalho de Moll e colaboradores (2001), no qual estudaram as alterações do número de bactérias presentes no intestino médio de mosquitos *Anopheles punctipennis*, *Culex pipiens*, *Aedes aegypti*, durante a sua metamorfose, foi observado que após a emergência dos mosquitos adultos, havia pouca ou nenhuma bactéria no intestino médio das espécies estudadas. Este fato se deve a eliminação de todo intestino da pupa, que ocorre durante a metamorfose de insetos holometábolos e resulta em sua esterelização.

Outros trabalhos, realizados por Tchioffo e colaboradores (2013) e Wang e colaboradores (2011) com *Anopheles gambiae*, coletados na África, também relataram que durante a transição de pupa para adulto, a composição da comunidade intestinal mudou drasticamente, entretanto, foi observado que a maioria das bactérias perdidas eram bactérias comensais do ambiente. Ainda, segundo esses autores e outras publicações, a microbiota presente no intestino de mosquitos holometábolos é diversa e, após a emergência do adulto, o intestino pode não ser esterelizado completamente (RANI et al., 2009; WANG et al., 2011; BANDO et al., 2013; THIOFFO et al., 2013). Um exemplo disso pode ser observado em insetos heterópteros, considerados paurometabólicos, cuja região terminal do intestino médio apresenta

criptas (sacos) e o lúmen presente ali é preenchido com uma bactéria simbiote específica que, se retirada, pode causar danos durante a fase ninfal do inseto hospedeiro e conseqüentemente levá-lo à morte (FUKATSU e HOSOKAWA, 2002).

Deve-se ressaltar que os registros sobre a relação simbiótica de bactérias com insetos hematófagos, principalmente os vetores da malária e seus mecanismos moleculares de interação, são escassos. Os exemplos mais conhecidos são de simbiose de moscas tsé-tsé e *Wigglesworthia* spp. e, recentemente, associações específicas de *Wolbachia* com alguns insetos (GUÉGAN et al., 2018). Além disso, os trabalhos publicados nas últimas décadas visaram, em sua maioria, conhecer a composição da microbiota, o que é significativamente importante. No entanto, desvendar os mecanismos de interação dos principais mosquitos de importância médica com seus simbiotes, pode futuramente gerar estratégias eficientes de interferência no desenvolvimento de patógenos no vetor e, conseqüentemente, podem reduzir e/ou eliminar doenças vetoriais que comprometem a saúde humana.

2.5 Principais filios e gêneros bacterianos associados ao gênero *Anopheles*

Investigações a respeito da diversidade bacteriana associada a insetos vêm crescendo nos últimos anos e parte disso se deve principalmente ao avanço significativo de técnicas moleculares. Neste contexto, por meio das constantes investigações foi possível a identificação de filios, gêneros e espécies bacterianas presentes no corpo de diferentes mosquitos do gênero *Anopheles*.

Dentre os filios, os que possuem maior destaque correspondem a: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes (RANI et al., 2009; WANG et al., 2011; BOISSIÈRE et al., 2012; GIMONNEAU et al., 2014; SHARMA et al., 2014; THIOFFO et al., 2015; MWADONDO et al., 2017; ROMOLI E GENDRIN, 2018). Outros menos frequentes e identificados em anofelinos são: Tenericutes, Actinomycetes, Acidobacteria, Fusobacteria e Fibrobacter (WANG et al., 2011; GIMONNEAU et al., 2014; SHARMA et al., 2014)

Bactérias gram-negativas pertencentes ao filo Proteobacteria, são constantemente relatadas em várias espécies de *Anopheles* spp. e estas já foram relatadas em inúmeros trabalhos, como fortes candidatas na inibição do desenvolvimento de parasitas da malária (PUMPUNI et al., 1993; BANDO et al., 2013). De acordo com Guégan e colaboradores (2018), a microbiota bacteriana é imprescindível na modulação da capacidade vetorial do hospedeiro, podendo ajudá-lo na suscetibilidade à infecção, aumentar sua resistência e impedir o desenvolvimento de patógenos. Neste contexto, a interação entre patógenos, microbiota e hospedeiro tornou-se

alvo de pesquisas que tem por objetivo desenvolver novas estratégias de controle de doenças vetórias de importância médica. Alguns estudos sobre a interferência de bactérias específicas presentes em anofelinos podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de bactérias que atuam na interferência de patógenos transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles*.

| Mosquito | Patógeno | Bactéria | Interferência | Referências |
|---------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>A. stephensi</i> | <i>P. falciparum</i> | <i>Escherichia coli</i> H243, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ewingella americana</i> | Inibem a formação de oocistos | Pumpuni et al., (1993) |
| <i>A. gambiae</i> | <i>P. falciparum</i> | <i>Enterobacter</i> | Inibe o desenvolvimento do parasita mediante ao estresse oxidativo | Cirimotich et al., (2011) |
| <i>A. stephensi</i> | <i>P. berghei</i> | <i>Serratia marcescens</i> | Exerce atividade anti- <i>Plasmodium</i> e inibe o desenvolvimento de oocistos | Bando et al., (2013) |
| <i>A. gambiae</i> | <i>P. falciparum</i> | <i>E. coli</i> , <i>Serratia marcescens</i> e <i>Pseudomonas stutzeri</i> | Reduzem a prevalência e intensidade de <i>P. falciparum</i> à infecção | Thioffo et al., (2013) |
| <i>A. gambiae</i> | <i>P. falciparum</i> | <i>Chromobacterium</i> | Exerce atividade anti- <i>Plasmodium</i> e aumenta a resitência à infecção | Ramirez et al., (2014) |
| <i>A. stephensi</i> | <i>P. berghei</i> | <i>Asaia bogorensis</i> | Inibe o desenvolvimento do parasita quando secreta proteínas com genes anti- <i>Plasmodium</i> | Bongio e Lampe, (2015) |

Acredita-se que a maioria dos gêneros bacterianos gram-negativos, que compartilham espécies em comum com anofelinos diferentes fazem parte de uma microbiota central. Por exemplo, em uma pesquisa de Segata e colaboradores (2016), foi verificado o tropismo tecidual da microbiota central, com os gêneros bacterianos *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Geobacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, presentes em machos e fêmeas de *A. gambiae* e tecidos reprodutivos de *A. coluzzi*. Thioffo e colaboradores (2015), também identificaram uma microbiota central formada por *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Burkholderia* e alguns membros da família Enterobacteriaceae, em ovários, intestino e glândulas salivares. No entanto, a existência da microbiota comum compartilhada

entre espécies não está clara, sendo necessários estudos adicionais (ROMOLI e GENDRIN, 2018).

Sabe-se apenas que alguns gêneros são frequentes em anofelinos coletados em campo e criados em laboratórios, dentre eles destacam-se: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Ewingella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Asaia*, *Comamonas*, *Aeromonas*, *Elizabethkingia* e *Chryseobacterium* (GENDRIN e CHRISTOPHIDES, 2013; ROMOLI E GENDRIN, 2018). No entanto, ressalta-se que no trabalho de revisão os autores relatam que nenhum gênero bacteriano citado anteriormente foi encontrado em todos os estudos e presumem que não há presença de um simbionte obrigatório em anofelinos (ROMOLI e GENDRIN 2018).

2.6 Alternativas de controle da malária

Um dos elementos fundamentais para eliminação ou redução da malária é o uso de medidas de controle vetorial, devido principalmente à vasta quantidade de insetos transmissores de patógenos distribuídos pelo mundo. Essas medidas são geralmente voltadas ao controle mecânico, químico, biológico e genético (ZARA et al., 2016).

O controle mecânico está relacionado aos métodos de eliminação de áreas onde os vetores se desenvolvem e a diminuição do contato homem-vetor, por meio de telas de proteção em janelas, portas, mosquiteiros e roupas de proteção (ZARA et al., 2016). Já o controle químico é voltado para o uso de inseticidas, produtos amplamente utilizados no controle de pragas agrícolas e insetos transmissores de doenças. Suas formulações químicas foram desenvolvidas para combater as diferentes fases e hábitos dos mosquitos, cujos produtos são classificados como larvicidas, que combatem as larvas no ambiente aquático e adulticidas, que controlam os insetos na fase adulta, por meio da aplicação residual ou espacial (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; ZARA et al., 2016).

Em meados da década de 1940, com a introdução do DDT (diclorodifeniltricloroetano), em muitas regiões registrou-se a eliminação rápida de doenças vetoriais, pois o mesmo demonstrou ser eficaz no controle de insetos (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). No entanto, sua utilização indiscriminada tornou-se um problema por se tratar de um produto não biodegradável, com elevada toxicidade e amplo espectro de ação, prejudicial à saúde humana, a espécies de animais não-alvo e para o meio ambiente (KAMAREDDINE, 2012; WILKE & MARRELLI, 2012). Além disso, a constante exposição a estes compostos foi gradativamente selecionando e aumentando, em nível de população, certas espécies de mosquitos, naturalmente resistentes. Na continuidade das aplicações, com o passar das décadas,

foi constatada a diminuição considerável da eficiência desse produto, em função da resistência que foi desenvolvida (ABDUL-GHANI et al., 2012).

Segundo dados recentes da OMS, em 2017, 61 países relataram resistência de mosquitos *Anopheles* spp., a pelo menos uma das quatro classes de inseticidas, recomendados atualmente. Cerca de pelo menos 50 notificaram resistência a duas classes ou mais (WHO, 2018).

Com o avanço da ciência em vários aspectos, alternativas de controle biológico e genético, que pouco causam prejuízos ao homem ou à natureza, vêm sendo amplamente estudadas e estas propõem diferentes mecanismos de ação, como dispersão de inseticidas, novos agentes naturais e procedimentos moleculares para o controle populacional de insetos (FINKLER, 2011-2012; ABDUL-GHANI et al., 2012; ZARA et al., 2016).

A utilização de fungos transgênicos, que produzem peptídeos antimaláricos e bloqueiam a transmissão por mosquitos, ou fungos utilizados para a entrega de inseticidas químicos, são métodos biológicos que se mostram promissores (FANG et al., 2011; KAMAREDDINE, 2012). Além disso, abordagens voltadas para o uso de bactérias simbiotes, geneticamente modificadas, que bloqueiam o desenvolvimento do parasita dentro do vetor e a criação de mosquitos transgênicos, que o tornam incapazes de transmitir parasitas, já estão em andamento (BEATY, 2000; BEARD et al., 2002; BENEDICT e ROBINSON, 2003; MANCINI et al., 2016).

Estas estratégias apresentam grande potencial para aplicação em campo. Contudo, é importante compreender os mecanismos exatos da interação mosquito-patógeno para implementação de futuros métodos que visam o controle da malária e outras doenças infecciosas, transmitidas por mosquitos vetores (KAMAREDDINE, 2012).

2.7 Paratransgênese

A paratransgênese é uma das alternativas de controle mais promissoras para o controle da malária e outras doenças vetoriais (BEARD et al., 2002; WILKE & MARRELLI, 2015). Essa abordagem visa modificar, por meio da transformação genética, microrganismos simbiotes que habitam os órgãos de insetos com genes efetores antiparasitários, que serão reintroduzidos dentro do mosquito, a fim de inibir o desenvolvimento de patógenos e bloquear sua transmissão às populações humanas (Figura 3) (DURVASULA et al., 1997; BEARD et al., 2002; COUTINHO-ABREU et al., 2010; WILKE & MARRELLI, 2015).

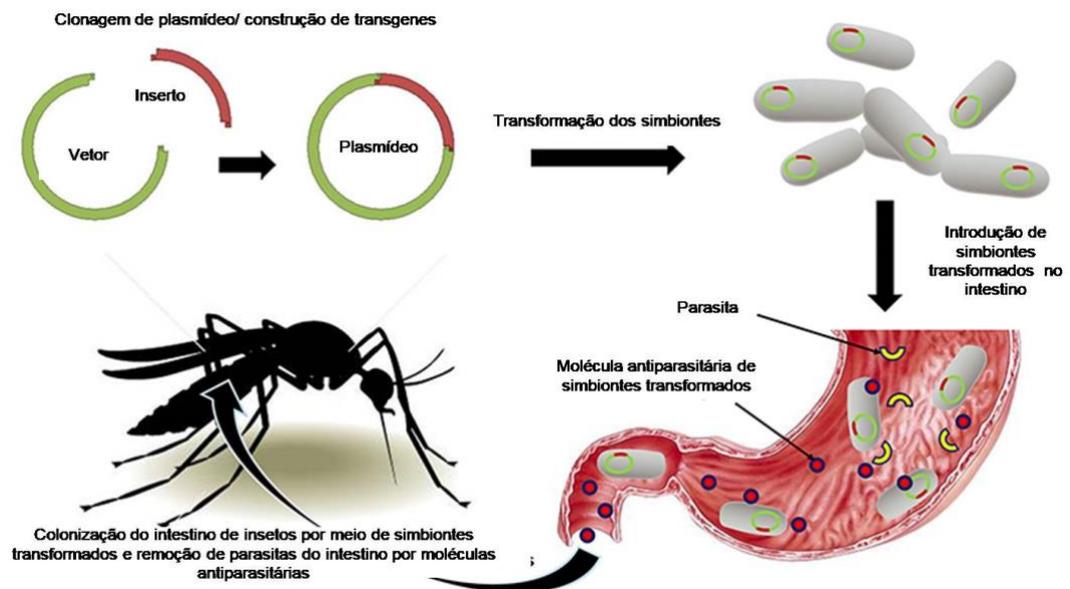


Figura 3. Esquema de representação da paratransgênese: os genes antiparasitários são clonados em um plasmídeo e inseridos, por meio da transformação genética, em microrganismos simbios adequados. Quando o simbiote geneticamente modificado é reintroduzido no inseto, estes o colonizam e as moléculas antiparasitárias dos transgenes agem contra os parasitas, inibindo o seu desenvolvimento. Fonte: OGAUGWU e DURVASULA (2017), com modificações.

As bactérias são os principais microrganismos empregados nessa técnica e algumas já foram identificadas e transformadas geneticamente com genes anti-*Plasmodium*, para esse fim (CAPONE et al., 2013). No entanto, autores relatam critérios necessários para a utilização eficaz da paratransgênese, tais como: (a) a bactéria utilizada deve ter uma associação constante e estável com o vetor, mesmo após a metamorfose; (b) deve ser propícia ao cultivo e manipulação genética; (c) não pode ser patogênica para humanos e insetos; (d) deve permanecer estável após a modificação e sua aptidão não deve ser comprometida, nem suas funções normais alteradas; (e) os produtos antiparasitários liberados pelos simbios transformados devem interagir eficazmente com o patógeno alvo; (f) o produto do gene efetor deve ser secretado para assegurar a interação com o patógeno alvo; (g) um método eficaz de dispersão de simbios geneticamente modificados deve existir entre as populações vetoriais naturais (BEARD et al., 2002; CAPONE et al., 2013; RIEHLE e JACOBS-LORENA, 2005; WANG e JACOBS-LORENA, 2013; WILKE e MARRELLI, 2015). A capacidade de uma bactéria ser transmitida vertical, horizontal e transtetadialmente é também um fator importante para sua utilização em abordagens paratransgênicas (WANG et al., 2017).

Uma das primeiras aplicações da paratransgenia foi em um vetor da doença de Chagas, na qual utilizaram a bactéria *Rhodococcus rhodni*, modificada geneticamente com um gene de cecropina-A, que reduziu em 99% a intensidade da infecção pelo protozoário *Trypanosoma*

cruzi, no intestino do vetor *Rhodnius prolixus* (DURVASULA et al., 1997). Ainda neste estudo, foi desenvolvido um método de dispersão da bactéria modificada, em populações naturais do inseto, por meio da contaminação de fezes, devido o comportamento alimentar da espécie (coprofagia).

Yoshida e colaboradores (2001) apresentaram um dos primeiros relatos voltados para a malária, utilizando uma bactéria recombinante de laboratório *E. coli*, que expressava uma imunotoxina de cadeia única (scFv) e que inibiu em pelo menos 93% o desenvolvimento de *P. berghei* no intestino médio de mosquitos. Em outro estudo, *E. coli* modificada geneticamente com anti-*Plasmodium* SM1 e fosfolipase-A (2), inibiu o desenvolvimento de *P. berghei* em *A. stephensi* (RIEHLE et al., 2007). Entretanto, por se tratar de uma cepa não simbiote em mosquitos *Anopheles* spp., a inibição do parasito foi modesta e, em ambos os casos, as bactérias com o anti-*Plasmodium* não podiam se difundir pelo corpo do inseto e acompanhar seu ciclo de vida (YOSHIDA et al., 2001; RIEHLE et al., 2007).

Wang e colaboradores (2012) descreveram seus resultados promissores utilizando a bactéria simbiótica recombinante *Pantoea agglomerans* nos mosquitos *A. stephensi* e *A. gambiae*. Neste estudo verificaram a ação de algumas moléculas efetoras, dentre elas, Escorpina e EPIP 4, foram as mais eficientes e inibiram em ~98% a formação de *P. falciparum* e *P. berghei*. Além disso, avaliaram o impacto da cepa recombinante na vida útil dos mosquitos e relataram que estas não afetaram a sua longevidade, em condições de laboratório. Bisi e Lampe (2011), também utilizaram uma cepa de *P. agglomerans* em testes e verificaram sua eficiência em secretar proteínas anti-*Plasmodium*.

Uma cepa de *Serratia marcescens* isolada de *A. stephensi* também foi investigada por Wang e colaboradores (2017). Os resultados mostraram que *S. marcescens* (AS1-GFP) coloniza estavelmente o intestino médio, ovários e glândulas acessórias masculinas de *A. stephensi* e pode se espalhar, de forma vertical e horizontal, por meio das populações de mosquitos. Também foi construído um sistema de secreção *Serratia* AS1 HasA para testar cinco moléculas anti-*Plasmodium* e as cepas recombinantes que expressavam escorpina e múltiplas proteínas efetoras foram as mais efetivas, reduziram em até 93% os estágios infecciosos de *P. falciparum* e não afetaram a longevidade, fecundidade e fertilidade dos mosquitos (WANG et al., 2017).

Além de estudos sobre a efetividade de bactérias modificadas geneticamente, cepas bacterianas também foram testadas para verificar seu potencial de colonização dentro de insetos. Por exemplo, bactérias do gênero *Asaia* foram propostas como simbioses promissoras para a paratransgênese, por possuírem características ecológicas necessárias. Além disso, estas são passíveis de manipulação genética e amplamente encontradas em regiões do corpo dos

mosquitos, onde ocorre o desenvolvimento dos parasitas da malária (FAVIA et al., 2007; CAPONE et al., 2013; MINARD et al., 2013; MANCINI et al., 2016).

Favia e colaboradores (2007), por meio de técnicas como sequenciamento do gene 16S rRNA, PCR quantitativo, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise de *Hibridização In Situ* (ISH), demonstraram que bactérias (α -proteobacteria) do gênero *Asaia* sp. colonizam estavelmente larvas e diferentes órgãos de *A. stephensi* adultos. Bem como, *Asaia* sp. transformada geneticamente com uma proteína que expressa fluorescência verde [Cepa SF2.1 (Gfp)], consegue se alojar no intestino médio, órgãos reprodutivos e glândulas salivares de mosquitos, podendo ainda ser transmitida verticalmente de fêmeas adultas para a prole. Capone e colaboradores (2013), também relataram que a replicação de bactérias recombinantes de *Asaia* (GFP-*Asaia* e DsRed-*Asaia*) foi eficiente e os estudos imunológicos *in vitro* demonstraram que essa bactéria induz a expressão de péptidos antimicrobianos.

Em concordância com esses dados, Mancini e colaboradores (2016) realizaram o primeiro ensaio na condição de semi-campo para verificar, por meio de microscopia fluorescente e análise molecular, a transmissão vertical, horizontal e transestadial de *Asaia* sp. SF2.1 (*Asaia*^{gfp}). Para tanto, foi inserido na bactéria um plasmídeo endógeno modificado que expressa a proteína fluorescente verde (GFP) e, posteriormente, *Asaia*-gfp foi dispersa para colonizar *A. gambiae* e *A. stephensi*. Os resultados obtidos reafirmaram a capacidade dessa bactéria em se espalhar a altas taxas nas populações dos mosquitos estudados, colonizando com sucesso o intestino médio dos mesmos (MANCINI et al., 2016).

O gênero de bactérias *Pseudomonas* encontrados em mosquitos transmissores da malária, em especial em *A. stephensi*, vetor dominante na África, também foi estudado por Chavshin e colaboradores (2015). Segundo os autores, além do intestino médio, os túbulos malpighianos de larvas e mosquitos adultos foram colonizados pela bactéria modificada com GFP. Além disso, demonstraram que *Pseudomonas* sp., transformada geneticamente, foi transmitida em todos os estágios de vida do mosquito, sendo considerada um potencial simbionte para a aplicação da técnica de paratransgênese.

Em relação aos processos para introduzir bactérias modificadas em mosquitos, Dehghan e colaboradores (2017) estudaram a bactéria *Enterobacter cloacae*, outro simbionte da microbiota intestinal de *Anopheles* spp. Os autores sugeriram a transmissão e dinâmica transestadial de *E. cloacae*, modificada com plasmídeo GFP-D, dentro de mosquitos *A. stephensi*, com foco em dois recursos de entrega bacteriana: diretamente no ambiente aquático e por meio de iscas açucaradas. Observaram que a bactéria *E. cloacae* GFP-D não foi eficiente para propagação em habitat aquático e não é transferida de forma transestadial (em condições

de laboratório). No entanto, a colonização de *E. cloacae* GFP-D ocorreu com sucesso no intestino médio de mosquitos adultos, após uma refeição de iscas açucaradas com bactérias, sendo esta uma alternativa viável para introduzir bactérias modificadas geneticamente em populações de mosquitos selvagens (DEHGHAN et al., 2017).

Nesse contexto, embora a transformação de bactérias simbiotes possa ser uma alternativa promissora no combate de doenças infecciosas, ainda há poucos estudos de bactérias bem estabelecidas em anofelinos e que foram transformadas com sucesso. Por isso, para que sua aplicação seja efetiva são necessários estudos de investigação microbiológica adicionais, em mais espécies de mosquitos, especialmente anofelinos do continente americano, vetores de *Plasmodium* spp. (COUTINHO-ABREU et al., 2010). Também são necessários estudos das vias de transmissão bacteriana e mecanismos de interação de bactérias e mosquitos, a fim de selecionar simbiotes que possam ser utilizados em abordagens paratransgênicas para o controle da malária e outras doenças zoonóticas de importância médica, que afetam inúmeras pessoas em regiões endêmicas (GUÉGAN et al., 2018).

2.8 Identificação molecular bacteriana e engenharia genética na paratransgenia

Os avanços tecnológicos, principalmente voltados para o ramo da biologia molecular, contribuíram significativamente para os estudos taxonômicos de espécies, que se baseiam nas detecções e análises de sequências genômicas (ROSSELLÓ-MÓRA, 2012).

Um dos métodos mais utilizados é o sequenciamento, que gera informações sobre a ordem das sequências nucleotídicas de um fragmento de DNA (SANGER et al., 1977). Este pode ser feito por vários métodos, dentre os quais se destaca o sequenciamento de Sanger, que consiste na utilização de didesoxinucleotídeos incorporados em fragmentos de cadeia simples de DNA durante a reação, resultando em sequências de diferentes tamanhos de pares de bases, sendo a última base um fluoróforo detectável pelos equipamentos de análises (SANGER et al., 1977; SHENDURI e HANLEE, 2008; CARVALHO e SILVA, 2010). No entanto, para determinar as relações filogenéticas e a identificação de espécies, gêneros e famílias bacterianas é necessário o sequenciamento de um gene alvo (PATEL, 2001; YANG et al., 2016).

Os primeiros indícios sobre as relações filogenéticas partiram de Woese e colaboradores, no qual demonstraram que as relações entre bactérias podiam ser determinadas comparando seu código genético pelos genes que codificam suas subunidades ribossomais: 5S, 16S e 23s (WOESE, 2000; CLARRIDGE, 2004). Desde então, o gene 16S rRNA, em especial,

tem sido utilizado como marcador filogenético e o modelo para o seu estudo foi baseado no genoma da bactéria *E. coli* (WANG e QIAN, 2009).

A sequência gênica do gene 16S rRNA é considerada universal em todas as espécies bacterianas, apresenta 1.500 pares de bases (pb), é constituída de regiões altamente conservadas, importantes para o desenho de iniciadores e 9 regiões variáveis, que permitem identificar e distinguir microrganismos próximos (Figura 4) (WANG e QIAN, 2009; YANG et al., 2016).

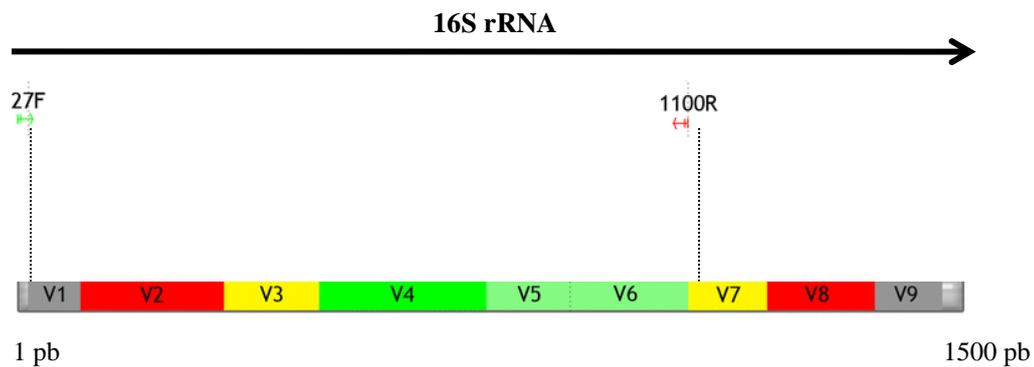


Figura 4. Regiões variáveis do gene 16S rRNA, com ênfase nos iniciadores utilizados nesta pesquisa (27F e 1100R). Fonte: YANG et al., (2016), com modificações.

As análises da sequência do gene 16S rRNA são baseadas na homologia das sequências geradas com as sequências depositadas em banco de dados comparativos disponíveis: NCBI - BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL - EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/nucleotide.html>) e outros. No entanto, antes é feito um processo de análise minucioso nos eletroferogramas gerados pelo sequenciamento que envolve a exclusão de fragmentos ou nucleotídeos de procedência duvidosa e alinhamento das fitas dos iniciadores F e R, para geração de uma fita consenso que, posteriormente, é comparada nos bancos de dados (PATEL, 2001; KLINDWORTH et al., 2013).

Juntamente com os avanços tecnológicos, que permitiram a identificação de espécies, principalmente bactérias que atuam na interação de patógenos de doenças zoonóticas, à utilização de técnicas da Engenharia Genética também possibilitaram progressos importantes na paratransgênesis, que visa alterar geneticamente simbiontes bacterianos e transmiti-los entre as populações de mosquitos vetores de doenças (WANG e JACOBS-LORENA, 2013).

Um dos primeiros passos para aplicação da paratransgênese é encontrar bactérias simbiontes de mosquitos cultiváveis e manipuláveis geneticamente (WANG e JACOBS-

LORENA, 2013; WILKE e MARRELLI, 2015). Depois, são necessários testes que verifiquem a propagação das mesmas no corpo e na prole dos insetos.

A utilização da proteína verde fluorescente (GFP), proteína isolada do cnidário *Aequorea victoria*, que expressa uma fluorescência esverdeada, quando iluminada por luz ultravioleta, tem sido útil na detecção e monitoramento de simbioses geneticamente modificados em populações de insetos (CHALFIE et al., 1994; FRANKE-FAYARD et al., 2004). No entanto, faz-se necessário a utilização de técnicas da Engenharia Genética, como a construção de um vetor (plasmídeo) contendo em sua estrutura a GFP, bem como a eletrotransformação, que torna o simbiote bacteriano competente para receber o plasmídeo de expressão (LIMA, 2008; WANG et al., 2017).

Neste contexto, a expressão da proteína GFP dentro da bactéria é um fator importante para que esta seja utilizada nos próximos passos da paratransgenia, que consiste em inserir genes antiparasitários capazes de bloquear ou inibir o desenvolvimento de patógenos em mosquitos, a fim de combater doenças vetoriais como a malária (WANG e JACOBS-LORENA, 2013; WILKE e MARRELLI, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Selecionar bactérias cultiváveis que apresentam características de transmissão vertical em *Anopheles darlingi*, para utilização em abordagens paratransgênicas.

3.1 Objetivos específicos

- Isolar bactérias cultiváveis de ovos, larvas e ovários de *A. darlingi*, coletados na cidade de Manaus;
- Caracterizar morfológicamente os isolados bacterianos;
- Identificar pelo gene 16S rRNA os isolados bacterianos morfológicamente semelhantes, presentes em todas as amostras estudadas;
- Selecionar linhagens bacterianas com potencial de transmissão vertical em *A. darlingi* para futuros testes paratransgênicos.

4 REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, R.; AL-MEKHLAFIB, A.M.; ALABSID, M. S. **Microbial control of malaria: Biological warfare against the parasite and its vector.** Acta Tropica, v. 121, p. 71-84, 2012.
- AHMED, M. A.; COX-SINGH, J. **Plasmodium knowlesi - an emerging pathogen.** ISBT science series, vol. 10 (1), p. 134-140, 2015.
- AMIR, A.; RUSSELL, B.; LIEW, J. W. K.; LUA, R. W.; FONG, M. Y.; VYTHILINGAM, I.; SUBRAMANIAM, V.; SNOUNOU, G.; LAU, Y. L. **Invasion characteristics of a Plasmodium knowlesi line newly isolated from a human.** Scientific Reports, v. 6 (24623), p. 1-8, 2016.
- ARRUDA, M.; CARVALHO, M. B.; NUSSENZWEIG, R. S.; MARACIC, M.; FERREIRA, A. W.; COCHRANE, A. H. **Potential vector of malaria and their diferente susceptibility to Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in Northern Brazil identified by immunoassay.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 335(5), p. 873-881, 1986.
- BANDO, H.; KIYOSHI, O.; WAMDAOGO, M. G.; BADOLO, A.; AONUMA, H.; NELSON, B.; FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; SAGNON, N.; KANUKA, H. **Intra-specific diversity of Serratia marcescens in Anopheles mosquito midgut defines Plasmodium transmission capacity.** Scientific reports, v. 3 (1641), p. 1-9, 2013.
- BEARD C. B, CORDON-ROSALES C, DURVASULA R. V. **Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission.** Annual Review of Entomology, v.47, p. 123-41, 2002.
- BEATY, B. J. **Genetic manipulation of vectors: A potential novel approach for control of vector-borne diseases.** Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 97 (19), p. 10295-10297, 2000.
- BENEDICT, M. Q.; ROBINSON, A. S. **The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique.** Trends in Parasitology, v.19 (8), p. 349-355, 2003.
- BISI, D. C.; LAMPE, D. J. **Secretion of anti-Plasmodium effector proteins from a natural Pantoea agglomerans isolate by using PelB and HlyA secretion signals.** Applied And Environmental Microbiology, v. 77 (13), p. 4669-4675, 2011.
- BLUT, A.; Untergruppe «Bewertung Blutassoziierter Krankheitserreger». **Malária.** Transfusion medicine and hemotherapy: offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie, v. 36 (1), p. 48-60, 2009.
- BOISSIÈRE, A.; TCHIOFFO, 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. **Midgut microbiota of the malaria mosquito vector Anopheles gambiae and interactions with Plasmodium falciparum infection.** PLoS Pathogens, v. 8 (5), e1002742, p. 1-12, 2012.

BONGIO, N. J.; LAMPE, D. J. **Inhibition of *Plasmodium berghei* development in mosquitoes by effector proteins secreted from *Asaia* sp. bacteria using a novel native secretion signal.** PloS One, v.10 (12), p. 1-17, e0143541, 2015.

BRASIL, SIVEP-Malária/SVS – Ministério da Saúde. **Boletim Malária Região Amazônica.** Situação epidemiológica da malária na região Amazônica, entre 2017 e 2019. Disponível em: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1519_2019_03_11/casos_notificados_2018_regio_Amaznica. Acesso: 17/03/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária** (Série A. Normas e Manuais Técnicos) / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde - 2. ed. - Brasília: Ministério da Saúde, 116 p., 2009.

BRIGHT, M.; BULGHERESI, S. **A complex journey: transmission of microbial symbionts.** Nature Reviews Microbiology, v.8, p. 218-230, 2010.

CAPONE, A.; RICCI, I.; DAMIANI, C.; MOSCA, M.; ROSSI, P.; SCUPPA, P.; CROTTI, E.; EPIS, S.; ANGELETTI, H.; VALZANO, H.; SACCHI, G; BANDI, C.; DAFFONCHIO, D.; MANDRIOLI, H.; FAVIA, L. **Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control.** Parasites & Vectors, 6 (1):182, p. 1-13, 2013.

CARVALHO, M. C.; SILVA, D. C. **Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas.** Ciência Rural. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), v. 40 (3), p. 735-744, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/29442>>.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Biology parasites.** About Malaria. Edição: novembro de 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Acesso em: 14/02/2019.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** Science, v. 263 (5148), p. 802-805, 1994.

CHAVSHIN, A. R.; OSHAGHI, M. A.; VATANDOOST, H.; YAKHCHALI, B.; ZARENEJAD, F.; TERENIUS, O. **Malpighian tubules are important determinants of *Pseudomonas* transstadial transmission and longtime persistence in *Anopheles stephensi*.** Parasites & Vectors, 8 (36), p. 1-7, 2015.

CIRIMOTICH, C. M.; DONG, Y.; CLAYTON, A. M.; SANDIFORD, S. L.; SOUZA-NETO, J. A.; MULENGA, M.; DIMOPOULOS, L. **Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*.** Science, vol. 332 (6031), p. 855-858, 2011.

CLARRIDGE, J. E. **Impact of 16s rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases.** Clinical Microbiology Reviews, v. 17 (4), p. 840-862, 2004.

CONSOLI, R. A. G. B; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** In: Capítulos 1-3. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 228 p., 1994. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/th/pdf/consoli-8585676035.pdf>.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. **Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos.** Ciência e Cultura, v. 64 (3), p. 43-47, 2012.

COUTINHO-ABREU, I.V., ZHU, K.Y., RAMALHO-ORTIGAO, M. **Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges.** Parasitology International., v. 59 (1), p. 1-8, 2010.

COWMAN, A. F.; HEALER, J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. **Malaria: Biology and Disease.** Cell Review, v, 167 (3), p. 610-624, 2016.

DAMIANI, C.; RICCI, I.; CROTTI, E.; ROSSI, P.; RIZZI, A.; SCUPPA, P.; ESPOSITO, F.; BANDI, C.; DAFFONCHIO, D.; FAVIA, G. **Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors.** Current Biology, v. 18 (23), p. 1087-1088, 2008.

DEANE, L.M. **Malaria vectors in Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.81, p. 5-14, 1986.

DEGHAN, H.; OSHAGHI, M. L.; MOOSA-KAZEMI, S. H.; YAKHCHALI, B.; VATANDOOST, H.; MALEKI-RAVASAN, N.; RASSI, Y.; MOHAMMADZADEH, H.; ABAI, M. R.; MOHTARAMI, F. **Dynamics of transgenic *Enterobacter cloacae* expressing Green Fluorescent Protein-Defensin (GFP-D) in *Anopheles stephensi* under laboratory condition.** Journal of arthropod-borne diseases, v. 11 (4), p. 515-532, 2017.

DOUGLAS, A. E. **Lessons from Studying Insect Symbioses.** Cell Host & Microbe, v. 10 (4), p. 359-367, 2011.

DURVASULA R. V.; GUMBS, A.; PANACKAL A., KRUGLOV, O.; AKSOY, S.; MERRIFIELD, R. B.; RICHARDS, F. F.; BEARD, C. B. **Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 94 (7), p. 3274-3278, 1997.

FANG, W.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; GHOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M.; KANG, A.; LEGER, R. J. ST. **Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes.** Science, 331(6020), p. 1074-1077, 2011.

FAST, E. M.; TOOMEY, M. E.; PANARAM, K.; DESJARDINS, D.; KOLACZYK, E. D.; FRYDMAN, H. M. ***Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche.** Science, v. 334 (6058), p. 990-992, 2011.

FAVIA, G.; RICCI, I.; DAMIANI, C.; RADDADI, N.; CROTTI, E.; MARZORATI, M.; RIZZI, A.; URSO, R.; BRUSETTI, L.; BORIN, S.; MORA, D.; SCUPPA, P.; PASQUALINI, L.; CLEMENTI, E.; GENCHI, M.; CORONA, S.; NEGRI, I.; GRANDI, G.; ALMA, A.; KRAMER, L.; ESPOSITO, F.; BANDI, C.; SACCHI, L.; DAFFONCHIO, D. **Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America (USA), v. 104, p. 9047-9051, 2007.

FINKLER, C. L. L. **Controle de insetos: uma breve revisão.** Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica. Recife, v. 8 e 9, p. 169-189, 2011-2012.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. In: Capítulos 1, 2, 3 e 10. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, vol. 2, 860 p., 2002.

FORATTINI, O. P.; GOMES, A. C.; SANTOS, J. L. F.; GALATI, E. A. B.; RABELLO, E. X.; NATAL, D. **Observações sobre atividade de mosquitos Culicidae, em mata residual no Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil**. Revista de Saúde Pública, v.5, n.6, p. 557-586, 1973.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Malária: Aspectos históricos e quimioterapia**. Química Nova, v. 31 (5), p. 1271-1278, 2008.

FRANKE-FAYARD, B.; TRUEMAN, H.; RAMESAR, J.; MENDOZA, J.; KEUR, M.; LINDEN, R.; SINDEN, R. E.; WATERS, A. P.; JANSE, C. J. **A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle**. Molecular & Biochemical Parasitology, v. 137, p. 23-33, 2004.

FUKATSU, T.; HOSOKAWA, T. **Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima***. Applied and Environmental Microbiology, v. 68 (1), p. 389-396, 2002.

GABRIELI, P.; SMIDLER, A.; CATTERUCCIA, F. **Engineering the control of mosquito-borne infectious diseases**. Genome biology, v. 15:11(535), p. 1-9, 2014.

GAMA, R. A.; SANTOS, R. L. C.; SANTOS, F.; SILVA, I. M.; RESENDE, M. C., EIRAS, A. E. **Periodicidade de captura de *Anopheles darlingi* Raiz (Diptera: Culicidae) em Porto Velho, RO**. Neotropical Entomology, v. 38 (5), p. 677-682, 2009.

GARLARDO, A. K. R. **A importância dos *Anopheles darlingi* Root, 1926 e *Anopheles marajoara* Galvão e Damasceno, 1942 na transmissão de malária no município de Macapá/AP-Brasil**. 147 f. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém/PA. 2010.

GENDRIN M, CHRISTOPHIDES GK. The *Anopheles* mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. In: Manguin S, editor. ***Anopheles* Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors**, cap. 3, p. 525-548, 2013. (Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-newinsights-into-malaria-vectors>).

GHOSH, A.; EDWARDS, M.J.; JACOBS-LORENA, M. **The journey of the malaria parasite in the mosquito: Hopes for the New Century**. Parasitology Today, vol. 16 (5), p. 196-201, 2000.

GIMONNEAU, G.; TCHIOFFO, M. T.; ABATE, L.; BOISSIÈRE, A.; AWONO-AMBÉNÉ, P. H.; NSANGO, S. E. **Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages**. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, v. 28, p. 715-724, 2014.

GLÓRIA, J. C.; ALMEIDA, M. E.; ALVES, K. C.; ARAÚJO, F.; ÁVILA, R. A.; NOGUEIRA, P. A.; MARIÚBA, L. A. **Métodos para diagnóstico de Malária: Atualização e desafios**. Scientia Amazônia, v. 7, n. 2, p. 24-31, 2018.

GUÉGAN, M.; ZOUACHE, K.; DÉMICHEL, C.; MINARD, G.; TRAN, V. V.; POTIER, P.; MAVINGUI, P.; VALIENTE, M. C. **The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions.** *Microbiome*, v. 6 (49), p. 1-17, 2018.

HIWAT, H.; BRETAS, G. **Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review.** *Parasites & Vectors*, v. 4:177, p. 1-13, 2011.

HOSOKAWA T, KIKUCHI Y, NIKOH N, SHIMADA M, FUKATSU T. **Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria.** *PLoS Biology*, v. 4 (10), p. 1841-1851, 2006.

ITURBE-ORMAETXE, I.; WALKER, T.; O'NEILL, S. L. ***Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease.** *EMBO Reports*, 12(6), p. 508-518, 2011.

KAMAREDDINE, L. **The biological control of the malaria vector.** *Toxins (Basel)*, v. 4, p. 748-767, 2012.

KIKUCHI Y, HOSOKAWA T, FUKATSU T. **Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation.** *Applied and environmental microbiology*, v. 73(13), p. 4308-4316, 2007.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F.O. **Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies.** *Nucleic Acids Research*, v. 41 (1), p. 1-11, 2013.

LIMA, L. M. **Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular.** Campina Grande - Embrapa Algodão (Documentos 191). 1ª ed, 27 p., 2008.

MANCINI, M. V.; SPACCAPELO, R.; DAMIANI, C.; ACCOTI, A.; TALLARITA, M.; PETRAGLIA, E.; PAOLO, R.; CAPPELLI, A.; CAPONE, A.; PERUZZI, G.; VALZANO, M.; PICCIOLINI, M.; DIABATÉ, A.; FACCHINELLI, L.; RICCI, I.; FAVIA, G. **Paratransgenesis to control malaria vectors: a semi-field pilot study.** *Parasites & Vectors*, v. 9 (1), p. 140, 2016.

MANOEL, E. R.; SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. **Espécies de *Anopheles* (Díptera, Culicidae) em municípios com risco e autoctonia de malária no estado de Goiás.** *Revista de Patologia Tropical*, v. 39 (2), p. 137-144, 2010.

MINARD, G.; MAVINGUI, P.; MORO, C. V. **Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont.** *Parasites & Vectors*, 6:146, 2013.

MOLL, R. M.; ROMOSER, W. S.; MODRAKOWSKI, C. M.; MONCAYO, A. C.; LERDTHUSNEE, K. **Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis.** *Journal of Medical Entomology*, v. 38 (1), p. 29-32, 2001.

MORAN, N. A. **Symbiosis.** *Current Biology*, v. 16(20), 2006.

MUEMA, J. M.; BARGUL, J. L.; NJERU, S. N.; ONYANGO, J. O.; IMBAHALE, S. S. **Prospects for malaria control through manipulation of mosquito larval habitats and**

olfactory-mediated behavioural responses using plant-derived compounds. *Parasites & Vectors*, v. 10:184, p. 1-18, 2017.

MWADONDO, E. M.; GHILAMICHAEL, A.; ALAKONYA, A. E.; KASILI, R. W. **Midgut bacterial diversity analysis of laboratory reared and wild *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Kenya.** *African Journal of Microbiology Research*, v. 11(29), p. 1171-1183, 2017.

NAING, C.; WHITTAKER, M. A.; NYUNT WAI, V.; WAH MAK, J. **Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: A systematic review and meta-analysis.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8 (8), p. 1-11, 2014.

OGAUGWU, C. E.; DURVASULA, R. V. Developing the arsenal against pest and vector dipterans: inputs of transgenic and paratransgenic biotechnologies. In: SHIELDS, V. D. C., editor. **Biological control of pest and vector insects**, cap. 15, p. 325-347, 2017. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/biological-control-of-pest-and-vector-insects/developing-the-arsenal-against-pest-and-vector-dipterans-inputs-of-transgenic-and-paratransgenic-bio>. Acesso: 29/05/19.

OGUIKE, M. C.; BETSON, M.; BURKE, M.; NOLDER, D, STOTHARD, J. R.; KLEINSCHMIDT, I.; PROIETTI, C.; BOUSEMA, T.; NDOUNGA, M.; TANABE, K.; NTEGE, E.; CULLETON, R.; SUTHERLAND, C. J. ***Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities.** *International Journal for Parasitology*, v. 41 (6), p. 677-683, 2011.

PAIS, R.; LOHS, C.; WU, Y.; WANG, J.; AKSOY, S. **The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74 (19), p. 5965-5974, 2008.

PATEL, J. B. **16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory.** *The Journal of Molecular Diagnostics*, v.6 (4), p. 313-321, 2001.

PHILLIPS, M. A.; BURROWS, J. N.; MANYANDO, C.; HUIJSDUIJNEN, R. H. V.; VOORHIS, W. C. V.; WELLS, T. N. C. **Malaria.** *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3 (17050), p. 1-24, 2017.

PUMPUNI, C. B.; BEIER, M. S.; NATARO, J. P.; GUERS, L. D.; DAVIS, J. R. ***Plasmodium falciparum*: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria.** *Experimental Parasitology*, v. 77 (2), p. 195-199, 1993.

RAMIREZ, J. L.; SHORT, S. M.; BAHIA, A. C.; SARAIVA, R. G.; DONG, Y.; KANG, S.; TRIPATHI, A.; MLAMBO, G.; DIMOPOULOS, G. ***Chromobacterium Csp_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities.** *PLoS Pathogens*, v.10 (10), e1004398, p. 1-13, 2014.

RANI, S.; SHARMA, A.; RAJAGOPAL, R.; ADAK, T.; BHATNAGAR, R. K. **Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector.** *BMC Microbiology*, v. 9 (96), p. 1-22, 2009.

RESHEF, L.; KOREN, O.; LOYA, Y.; ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. **The coral probiotic hypothesis.** *Environmental Microbiology*, v. 8 (12), p. 2068-2073, 2006.

RIEHLE, M. A.; JACOBS-LORENA, M. **Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35 (7), p. 699-707, 2005.

RIEHLE, M.A; MOREIRA, C.K; LAMPE, D; LAUZON, C; JACOBS-LORENA, M. **Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut.** *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 595-603, 2007.

RÍOS-VELÁSQUEZ, M. C.; MARTINS-CAMPOS, K. N.; SIMÕES, R. C.; IZZO, T.; SANTOS, E. V.; PESSOA, F. A. C.; LIMA, J. B. P.; MONTEIRO, W. M.; SECUNDINO, N. F. C.; LACERDA, M. V. G.; TADEI, W. P.; PIMENTA, P. F. P. **Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon.** *Malaria Journal*, v 12 (460), p. 1-3, 2013.

ROMOLI, O.; GENDRIN, M. **The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and *Plasmodium*.** *Parasites & Vectors*, v. 11 (200), p. 1-8, 2018.

ROSENBERG, E.; KOREN, O.; RESHEF, L.; EFRONY, R.; ZILBER-ROSENBERG, I. **The role of microorganisms in coral health, disease and evolution.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 355-362, 2007.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. **Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept.** *American Society for microbiology: mBio*, v. 7 (2), p. 1-8, 2016.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. **Symbiosis and Development: The Hologenome Concept.** *Birth Defects Research, Part C Embryo Today: Reviews*, v. 93, n. 1, p. 56-66, 2011.

ROSSELLÓ-MÓRA, R. **Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories.** *Environmental Microbiology*, v. 14 (2), p. 318-134, 2012.

SAMPAIO, V. S.; SIQUEIRA, A. M.; ALECRIM, M. G. C.; MOURÃO, M. P. G.; MARCHESINI, P. B.; ALBUQUERQUE, B. C.; NASCIMENTO, J.; FIGUEIRA, E. A. G.; ALECRIM, W. D.; MONTEIRO, W. M.; LACERDA, M. V. G. **Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48 (Suppl I), p. 4-11, 2015.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v. 74 (12), p. 5463-5467, 1977.

SEGATA, N.; BALDINI, F.; POMPON, J.; GARRETT, W. S.; TRUONG, D. T.; DABIRÉ, R. K. **The reproductive tracts of two malaria vectors are populated by a core microbiome and by gender and swarm-enriched microbial biomarkers.** *Scientific reports*, v. 6 (24207), p. 1-10, 2016.

SHARMA, P; SHARMA, S.; MAURYA, R. K.; DE, T. D.; THOMAS, T.; LATA, S.; SINGH, N.; PANDEY, K. C.; VALECHA, N.; DIXIT, R. **Salivary glands harbor more diverse microbial communities than gut in *Anopheles culicifacies*.** *Parasites & Vectors*, v. 7 (235), p. 1-7, 2014.

SHENDURI, J.; HANLEE, J. **Next - Generation sequencing DNA**. Nature Biotechnology, v. 26 (10), p. 1135–1145, 2008.

SUTHERLAND, C.J; TANOMSING, N; NOLDER, D; OGUIKE, M; JENNISON, C; PUKRITTAYAKAMEE, S.; DOLECEK, C.; HIEN, T. T.; ROSÁRIO, V. E.; AREZ, A. P.; PINTO, J.; MICHON, P.; ESCALANTE, A. A.; NOSTEN, F.; BURKE, M.; LEE, R.; BLAZE, M.; OTTO, T. D.; BARNWELL, J. W.; DOR, A.; WILLIAMS, J.; BRANCO, N. J.; DIA, N. P.; SNOUNOU, G.; LOCKHART, P. J.; CHIODINI, P. L.; IMWONG, M.; POLLEY, S. D. **Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally**. The Journal of Infectious Diseases, v. 201 (10), p. 1544-1550, 2010.

TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M.; RAHBANI, M. G. Biologia de anofelinos amazônicos. V. **Polimorfismo cromossômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera, Culicidae)**. Acta Amazônica, v. 12 (2), p. 353-369, 1982.

TADEI, W. P.; MASCARENHAS, B. M.; PODESTÁ, M. G. Biologia de anofelinos amazônicos VIII. **Conhecimentos sobre a distribuição de espécies de *Anopheles* na região de Tucuruí-Marabá (Pará)**. Acta Amazônica, v. 13, p. 103-140, 1983.

TADEI, W. P. Biologia de anofelinos amazônicos XI. **Estudos em populações de *Anopheles* e controle da malária em Ariquemes (Rondônia)**. Acta Amazônica, v. 16/17 (único), p.151-167, 1987.

TADEI, W. P.; THATCHER, B. D.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. **Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brasilian Amazon**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 59, p. 325-335, 1989.

TADEI, W.P.; THATCHER, B.D.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I.B.; RAFAEL, M.S. **Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 59, p. 325-335, 1998.

TADEI, W. P.; DUTARY THATCHER, B. **Malaria vectors in the Brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus***. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 42 (2), p. 87-94, 2000.

TADEI, W.P; SANTOS, J. M. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S.; PITHAN, O. A. Malária em São Gabriel da Cachoeira, AM: fatores entomológicos genéticos, dinâmica de transmissão e controle. In: Souza, L. A. G; Castellón, E. G., editores. **Desvendando as fronteiras do conhecimento na Região Amazônica do Alto Rio Negro**. Manaus: [s.n.], cap. ;20, p. 287-309, 2012.

TADEI, W. P.; RODRIGUES, I. B; RAFAEL, M. S.; SAMPAIO; R. T. M.; MESQUITA,H. G.; PINHEIRO, V. C. S.; ZEQUI, J. A. C.; ROQUE, R. A.; SANTOS, J. M. M. **Adaptive processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region**. Hydrobiologia, 789 (1), p. 1-18, 2017.

TCHIOFFO, M. T.; BOISSIÈRE, A.; CHURCHER, T. S.; ABATE, L.; GIMONNEAU, G.; NSANGO, S. E. **Modulation of malaria infection in *Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria**. PLoS ONE, v. 8 (12), e81663, 2013.

TCHIOFFO, M. T.; BOISSIÈRE, A.; ABATE, L.; NSANGO, S. E.; BAYIBÉKI, A. N.; AWONO-AMBÉNÉ, P. H.; CHRISTEN, R.; GIMONNEAU, G.; MORLAIS, I. **Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia**. *Frontiers in Microbiology*, v. 6 (500), p. 1-9, 2015.

WANG, Y.; QIAN, P-Y. **Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies**. *PLoS ONE*, v. 4 (10), e7401, p. 1-9, 2009.

WANG, Y.; GILBREATH, T. M.; KUKUTLA, P.; YAN, G.; XU, J. **Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya**. *PLoS ONE*, v. 6 (9), e24767, p. 1-9, 2011.

WANG, S.; GHOSH, A. K.; BONGIO, N.; STEBBINGS, K. A.; LAMPEB, D. J.; JACOBS-LORENA, M. **Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109 (31), p. 12734-12739, 2012.

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

WANG, S; DOS-SANTOS, A; HUANG, W; LIU, K.C; OSHAGHI, M.A; WEI, G; AGRE, P; JACOBS-LORENA, M. **Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria**. *Science*, v. 357 (6358), p. 1399-1402, 2017.

WHO - World Health Organization World. **World Malaria Report 2018**: Global malaria programme. Geneva, 2018.

WILKE, A.B.B.; MARRELLI, M.T. **Genetic control of mosquitoes: population suppression strategies**. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 54, n. 5, p. 287-92, 2012.

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

WOESE, C. R. **Interpreting the universal phylogenetic tree**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97(15), p. 8392-8396, 2000.

YANG, B; WANG, Y; QIAN, P.Y. **Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis**. *BMC Bioinformatics*, v. 17 (135), p. 1-8, 2016.

YOSHIDA, S; IOKA, D; MATSUOKA, H; ENDO, H; ISHII, A. **Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes**. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 113, p. 89-96, 2001.

ZARA, A. L. S.; SANTOS, S. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. F.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. **Aedes aegypti control strategies: a review**. *Epidemiology and Health Services*, v. 25 (2), p. 391-404, 2016.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. **Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution**. *FEMS Microbiology Reviews*, v.32 (5), p. 723–735, 2008.

CAPÍTULO

Prospecção de bactérias cultiváveis com características de transmissão vertical em *Anopheles darlingi* Root, 1926

Prospecção de bactérias cultiváveis com características de transmissão vertical em *Anopheles darlingi* Root, 1926

Serrão, D. M.¹; Rocha, E. M.²; Correa, L. V.¹; Pessoa, M. C. F.²; Tadei, W.P.³

¹ Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas - UEA.

² Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

³ Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.

Resumo

Bactérias são conhecidas por desempenhar papéis importantes na vida de seus hospedeiros. Estes microrganismos vêm sendo propostos em uma alternativa de controle promissora, a paratransgênese, que visa selecionar bactérias simbiotes de mosquitos, modificá-las geneticamente com genes efetores antiparasitários e reinseri-las em populações de mosquitos selvagens, a fim de inibir o desenvolvimento dos parasitas dentro do vetor. Na sua aplicação, o primeiro passo é selecionar espécies bacterianas cultiváveis, transmitidas em todas as fases do mosquito, manipuláveis geneticamente e não patogênicas aos humanos. Dessa forma, com os constantes registros de malária na Amazônia brasileira, causados por *Plasmodium vivax* e transmitidos por *Anopheles darlingi*, este trabalho selecionou bactérias cultiváveis, que apresentam características de transmissão vertical no principal vetor da malária no Brasil, o mosquito *A. darlingi*, para utilização em futuras abordagens paratransgênicas. Por meio de isolamento bacteriano, caracterização morfológica, identificação molecular pelo gene 16S rRNA de espécies bacterianas associadas a ovários, ovos e larvas de *A. darlingi* e teste de transformação genética por eletroporação, foram possíveis os seguintes resultados: 176 bactérias foram isoladas e caracterizadas morfológicamente, dentre elas, 62 foram identificadas e pertencem aos filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes; os gêneros predominantes foram *Acinetobacter* e *Enterobacter*. Seis gêneros foram registrados pela primeira vez em *A. darlingi*: *Elizabethkingia*, *Cupriavidus*, *Leucobacter*, *Pectobacterium*, *Rhizobium* e *Nubsella* e três destes, detectados pela primeira vez em associação com anofelinos (*Leucobacter*, *Pectobacterium* e *Nubsella*); três bactérias apresentaram indícios de transmissão vertical no mosquito estudado: *Acinetobacter bereziniae*, *Enterobacter asburiae* e *Serratia marcescens*, sendo esta última a espécie que apresentou melhor potencial de transformação bacteriana, com o plasmídeo pKS1-GFP, útil para futuros testes de monitoramento em *A. darlingi*.

Palavras-chave: transmissão vertical, paratransgênese, Amazônia, alternativas de controle.

INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente metade da população mundial está em risco de contrair malária e mais de 200 milhões de casos ocorrem anualmente em regiões tropicais e

subtropicais do mundo (WHO, 2018). Nas Américas, os países que abragem a Amazônia são os mais atingidos e no Brasil 99% do total de casos provém dessa região (BRASIL, 2019).

O principal transmissor do parasita da malária na Amazônia brasileira é o mosquito *Anopheles darlingi*, cujo comportamento antropofílico e a alta suscetibilidade à infecção por *Plasmodium* spp. o tornam um vetor competente (DEANE, 1986; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; TADEI et al., 1998). Além disso, as alterações climáticas e atividades humanas realizadas na região contribuem para o aumento populacional dos vetores e, conseqüentemente, para a grande incidência da doença (TADEI et al., 1998; SAMPAIO et al., 2015; TADEI et al., 2017).

Apesar de inúmeros esforços para a eliminação da malária é evidente que as medidas atuais são insuficientes. A falta de vacinas, aliado ao crescente número de mosquitos resistentes aos inseticidas e parasitas às múltiplas drogas, comprometem os programas de eliminação da doença, sendo necessárias medidas urgentes de combate (RIEHLE et al., 2005; BISI e LAMPE, 2011; GUÉGAN et al., 2018; WHO, 2018).

Uma alternativa aos métodos de controle utilizados atualmente é a paratransgênese, manipulação genética de bactérias simbióticas para expressarem genes anti-*Plasmodium* dentro de mosquitos, a fim de interferir no desenvolvimento e transmissão do parasita (DURVASULA et al., 1997; BEARD et al., 2002; WANG e JACOBS-LORENA, 2013; WILKE e MARRELLI, 2015). Para sua aplicação os requisitos básicos são: (a) isolamento de espécies bacterianas adequadas; (b) identificação de genes anti-*Plasmodium*; (c) secreção dos genes efetores pelo simbionte e (d) criação de meios eficientes para introduzi-los em populações de mosquitos selvagens (BEARD et al., 2002; CAPONE et al., 2013; WANG e JACOBS-LORENA, 2013; WILKE e MARRELLI, 2015).

As bactérias são os principais microrganismos utilizados nesta abordagem, pois estas vivem em associação constante com insetos, compartilham os mesmos órgãos que o parasita, estando presentes até mesmo durante a fase mais vulnerável do desenvolvimento do *Plasmodium* spp., que ocorre no intestino, e podem atuar na nutrição, reprodução, desenvolvimento e defesa de seu hospedeiro (MORAN, 2006; DOUGLAS, 2011; MINARD et al., 2013; WANG e JACONBS-LORENA, 2013). Além disso, bactérias simbióticas podem ser transmitidas de diferentes formas em mosquitos (vertical, horizontal e transestadial), sendo a rota de transmissão vertical, onde simbiontes são transmitidos do progenitor para a prole, um requisito importante para a escolha de potenciais candidatos a paratransgenia (HOSOKAWA et al., 2006; MORAN, 2006; KIKUCHI et al., 2007).

Outras recomendações quanto ao simbionte adequado também devem ser consideradas: este deve ser cultivável e passível de manipulação genética; deve colonizar

estavelmente o corpo do inseto durante todas as fases de desenvolvimento; não ser patogênico aos humanos; após a manipulação genética suas funções simbióticas não devem ser alteradas e deve se propagar eficazmente entre populações de insetos (BEARD et al., 2002; WANG e JACOBS-LORENA, 2013; WILKE e MARRELLI, 2015).

Resultados promissores já foram descritos em triatomíneos, moscas tsé-tsé e mosquitos do gênero *Anopheles*, onde conseguiram reduzir significativamente o desenvolvimento dos parasitas (DURVASULA et al., 1997; YOSHIDA et al., 2001; FAVIA et al., 2007; RIEHLE et al., 2007; AKSOY et al., 2008; WANG et al., 2012; WANG et al., 2017). No entanto, embora a estratégia seja promissora para o controle da malária, há poucos estudos de bactérias bem estabelecidas e transformadas geneticamente em anofelinos, além disso, não há relatos de ensaios paratransgênicos em mosquitos do continente americano. Dessa forma, são necessárias pesquisas a fim de identificar novos simbiossomas bacterianos que possam ser transmitidos de forma vertical, horizontal e transestadialmente para propagar genes efetores em diferentes populações de mosquitos *Anopheles* spp. (COUTINHO-ABREU et al., 2010).

Neste contexto, por meio da identificação molecular bacteriana, utilizando o gene rRNA 16S e transformação genética de espécies com potencial de aplicação na paratransgenia, foi realizada a primeira investigação de bactérias cultiváveis que apresentam características de transmissão vertical em *Anopheles darlingi*, o principal vetor da malária na Amazônia.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo, manutenção de mosquitos e dissecações

As fêmeas pertencentes à espécie *Anopheles darlingi* utilizadas neste estudo foram capturadas por meio da técnica de atração humana protegida, nos meses de maio e junho de 2018, em uma área periurbana localizada no bairro Puraquequara, em Manaus - Amazonas, Brasil (-3.036439, -59.871486 W - Google Maps). Estas foram alimentadas com uma refeição sanguínea, transportadas para o Insetário de *A. darlingi* do laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e dispostas separadamente em copos parafinados de 100 mL para aguardar a postura de ovos. Os mosquitos foram identificados em microscópio estereoscópico seguindo as características morfológicas descritas por Consoli e Oliveira (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

Após a oviposição, fêmeas foram submetidas à dissecação para a retirada de ovários (Figura 1) e os ovos eclodidos foram dispostos em novos copos parafinados, contendo 50 mL

de água destilada. Diariamente foram feitas manutenções para que estes completassem o desenvolvimento até a fase adulta. As fêmeas emergidas no laboratório foram novamente submetidas à dissecação de ovários em solução salina (NaCl₂) a 0,9%, com o auxílio de lupa, lâminas estéreis, pinças e estiletes (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

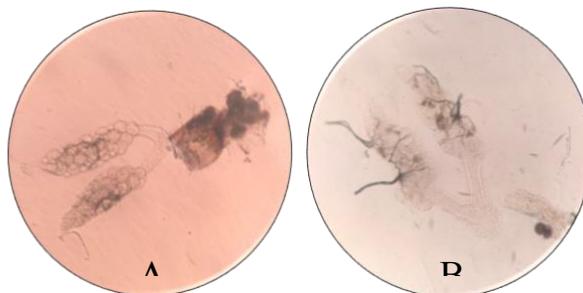


Figura 1. A) Ovários de mosquitos da espécie *Anopheles darlingi*;
B) Ovários retirados.

Isolamento bacteriano e caracterização morfológica

As amostras de ovários, ovos e larvas de *A.darlingi* foram maceradas, centrifugadas e plaqueadas em meio de cultivo Ágar Nutriente (NA) com fluconazol, para evitar o crescimento de fungos. As placas foram encubadas a 30 ° C em estufa incubadora BOD por 24h e após o crescimento bacteriano, estas foram isoladas utilizando a técnica do esgotamento por estrias cruzadas, em placas de Petri, com o mesmo meio de cultivo. A morfologia das colônias foi avaliada macroscopicamente quanto à forma, consistência, cor da colônia e pelo método de coloração de GRAM.

As amostras foram reunidas em grupos, de acordo com as características morfológicas, e apenas os isolados bacterianos semelhantes em ovários, ovos e larvas foram utilizados nas etapas a seguir para as investigações de transmissão vertical.

Extração de DNA genômico, PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o produto Matriz InstaGene (Bio-Rad) e o protocolo seguiu as recomendações do fabricante. A amostra final foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) e ajustada para 150ng de DNA e armazenado a -20°C para a utilização na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As reações de amplificação do gene 16S rRNA consistiram em um volume final de 25 µL utilizando o Kit TaqPol - Master Mix 2X (Cellco Biotec), com iniciadores 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1100 R: 5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3', seguindo o

protocolo do fabricante e realizadas em aparelho termociclador Thermal Cycler (Bio-Rad). O perfil térmico compreendeu a um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos: desnaturação das fitas-molde a 95°C por 1 min, pareamento dos iniciadores a 54°C por 40 s e extensão a 72°C por 1 min e 30 s. Ao final, um ciclo de extensão a 72°C por 5 min.

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (0,8%, p/v), visualizados em fotodocumentador (EagleEye II, Stratagene) e as amostras foram purificadas utilizando o kit PCR Purification (Cellco Biotec).

Para o sequenciamento utilizou-se um alíquota de 50ng de DNA purificado como matriz e o kit BigDye Terminator V 3.1. (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento em aparelho termociclador, precipitadas com etanol e posteriormente inseridas no Analisador Genético ABI 3500 XL (Applied Biosystems).

As sequências geradas foram analisadas na plataforma Electropherogram Quality Analysis - EMBRAPA (disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e comparadas com as sequências bacterianas depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Transformação genética bacteriana

Espécies bacterianas que apresentaram vestígios de transmissão vertical e, segundo pesquisas na literatura, não apresentam patogenicidade foram previamente selecionadas para etapa de transformação genética bacteriana. Utilizou-se o plasmídeo pKS1-GFP, que expressa a Proteína Verde Fluorescente (GFP), quando exposta à luz ultravioleta e possui marcador de seleção para ampicilina, cedido pelo Laboratório de Tecnologia do DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM-UFAM).

Para a transformação foi realizado o método de eletroporação baseado nas condições propostas para *Escherichia coli* (MARANHÃO, 2016). As bactérias foram previamente preparadas para tornarem-se competentes e aptas a receber o plasmídeo e, em seguida, foram submetidas ao choque elétrico, a 1900 V no aparelho Electroporator 2510 (Eppendorf). Após a eletroporação foi adicionado 1 mL de meio LB líquido e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação de 250 rpm. Depois foram dispostas em placas de Petri, contendo meio de cultivo LB sólido com ampicilina e LB sem ampicilina, e armazenadas em estufa a 37 °C por 16 h. Também foram eletroporadas células controle das mesmas bactérias utilizadas com Água Milli-Q e plaqueadas em condições semelhantes. Após o crescimento, as colônias

bacterianas foram visualizadas em luz ultravioleta e as que expressaram a fluorescência verde foram preservadas com glicerol para estudos posteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e caracterização morfológica de espécies bacterianas presentes nos ovários, ovos e larvas de *A. darlingi*

As amostras bacterianas isoladas foram provenientes de 38 mosquitos de *A. darlingi* coletados em uma área periurbana de Manaus-AM. Estas foram caracterizadas quanto à sua morfologia macroscópica e características tintoriais para a sua classificação inicial, perfazendo um total de 176 espécies. Destes isolados, 89 pertencem às amostras de ovários de mosquitos (46 de mosquitos coletados no campo e 43 dos criados em laboratório), 44 de ovos e 43 de larvas.

As colônias bacterianas submetidas ao método de coloração de Gram apresentaram células em formas de bacilos, cocos e cocobacilos. Nas amostras de ovários de mosquitos capturados no campo e ovos, os cocos foram prevalentes (49,5%), em amostras de ovários de mosquitos criados no laboratório e larvas destacaram-se bacilos (50%). Apenas uma bactéria isolada apresentou-se como cocobacilo (0,5%) (Figura 2).

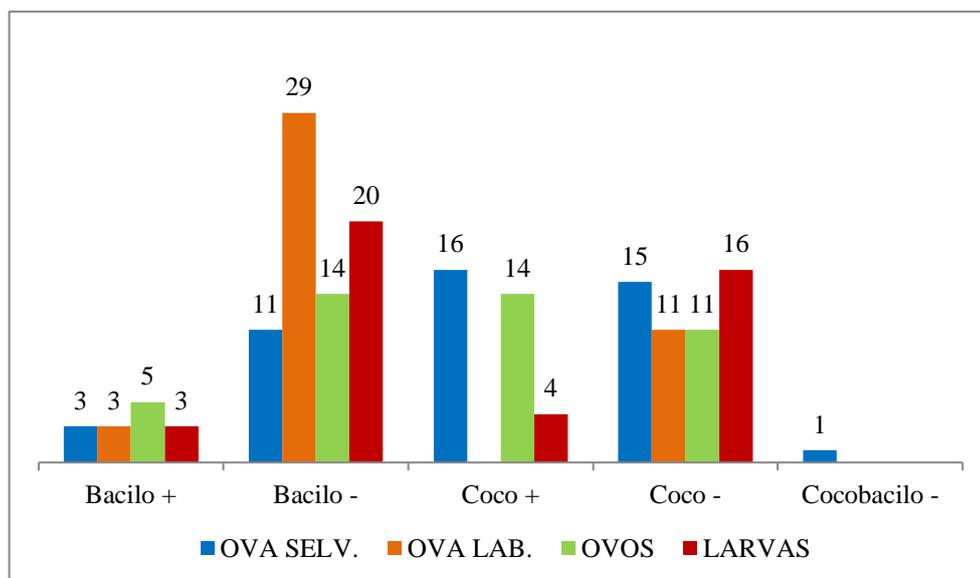


Figura 2. Isolados bacterianos e suas respectivas formas celulares, presentes em: ova selv. (ovários de mosquitos selvagens), ova lab. (ovários de mosquitos criados no laboratório), ovos e larvas de *A. darlingi*.

Observações sobre a morfologia de bactérias associadas a *A. darlingi* são escassas, no entanto, Rejmankova e colaboradores (2000) realizaram um estudo de caracterização de bactérias presentes no habitat larval de quatro anofelinos da América Central, incluindo *A. darlingi*. Os seus resultados demonstraram que bactérias classificadas como cocos foram mais prevalentes em comparação com bacilos.

A frequência de bactérias gram-negativas detectadas em isolados de ovários, ovos e larvas de *A. darlingi*, coletados em Manaus, correspondeu a 72,7% e apenas 23,3% das amostras representou as bactérias gram-positivas. Estudos semelhantes demonstraram a dominância de cepas bacterianas gram-negativas em diferentes anofelinos, como relatado por Djadid e colaboradores (2011) ao investigar bactérias associadas ao intestino de dois vetores de *Plasmodium* spp. no Irã, bem como, nos estudos de Rani e colaboradores (2009) na análise da diversidade bacteriana de larvas e intestinos de *A. stephensi*. Nos resultados de Wang e colaboradores (2011), baseados em pirosequenciamento de fragmentos de rRNA 16S de bactérias intestinais de *A. gambiae*, criados em habitats semi-naturais no Quênia, bactérias gram-negativas também corresponderam a maioria das espécies detectadas.

De acordo com Bando e colaboradores (2013), tais bactérias podem modular a infecção por *Plasmodium* spp. e exercer efeitos antiparasitários em mosquitos infectados, como relatado por Pumpuni e colaboradores (1993), onde observaram que diferentes concentrações de quatro cepas bacterianas gram-negativas inibiram significativamente a formação de *P. falciparum* em *A. stephensi*. Por outro lado, bactérias gram-positivas não demonstraram qualquer efeito inibidor na formação de oocistos, mesmo em altas concentrações. Fortalecendo esses dados, Gonzalez-Ceron e colaboradores. (2003) relataram a inibição de *P. vivax* em mosquitos *A. Albimanus* quando alimentados por cepas gram-negativas e resultados semelhantes foram obtidos por Cirimotich e colaboradores (2011) e Boissière e colaboradores (2012), sugerindo que a forte influência dessas bactérias no desenvolvimento de parasitas, as torna candidatas importantes à paratransgenia.

Cepas bacterianas identificadas em todas as amostras de *A. darlingi*

As características morfológicas observadas nas amostras foram úteis para uma primeira classificação de espécies. Entretanto, somente este método de avaliação é insuficiente, visto que há uma ampla gama de microrganismos morfológicamente semelhantes, o que torna necessária a utilização de métodos moleculares para resultados confiáveis.

Dessa forma, as amostras obtidas neste trabalho foram primeiramente subdivididas em 17 grupos, cada qual contendo bactérias com características semelhantes. Após uma criteriosa avaliação da morfologia dos isolados, 75 representantes foram submetidos à etapa de identificação molecular pelo gene 16S rRNA e 62 sequências bacterianas foram analisadas devido a qualidade dos consensos, totalizando 28 espécies diferentes.

Para cada conjunto de bactérias dos ovários, ovos e larvas de *A. darlingi* foram construídas árvores filogenéticas no programa MEGA 7, utilizando o método Neighbor-Joining. As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método da Máxima Verossimilhança Composta.

Nas amostras de ovários de mosquitos selvagens, as bactérias identificadas pertencem apenas ao filo Proteobacteria, representado por 7 gêneros e 10 espécies diferentes que totalizam 24 isolados (Figura 3). A bactéria mais frequente, *Acinetobacter nosocomialis* estava presente em 50% das amostras, seguida de *Enterobacter asburiae*, *Stenotrophomonas pavanii* *Pantoea dispersa*, com dois representantes cada. Em todas as amostras deste trabalho, a identidade das sequências identificadas variou de 97% a 100% (Material suplementar).

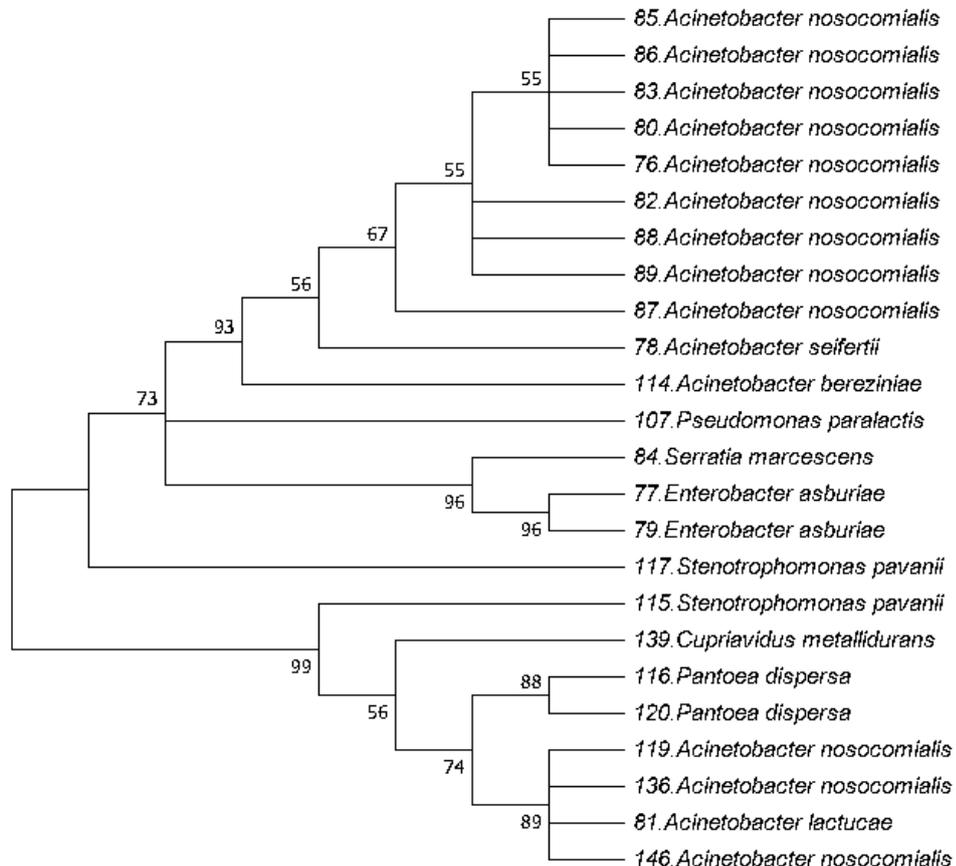


Figura 3. Árvore filogenética das amostras bacterianas de ovários de mosquitos selvagens da espécie *A. darlingi*. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações.

Nos ovários de mosquitos criados em laboratório foram identificadas 10 bactérias, todas com apenas um representante (Figura 4). Os filos presentes foram: Proteobacteria, Bacteriodetes e Actinobacteria, pertencentes aos gêneros: *Enterobacter*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Nubsella*, *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* e *Leucobacter*.

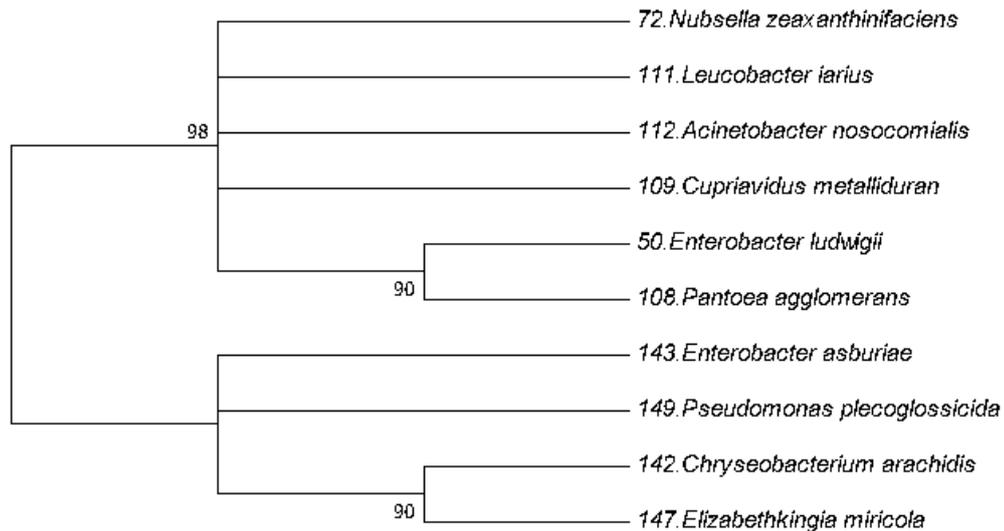


Figura 1. Árvore filogenética de bactérias identificadas nas amostras dos ovários de mosquitos *A. darlingi* criados em laboratório. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações.

Nos isolados bacterianos de ovos, as 13 identificadas pertencem apenas ao filo Proteobacteria (Figura 5). Os gêneros mais predominantes foram *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Stenotrophomonas*. Dentre as espécies com mais de um representante estão: *Acinetobacter nosocomialis*, *Enterobacter tabaci* e *Stenotrophomonas pavanii*.

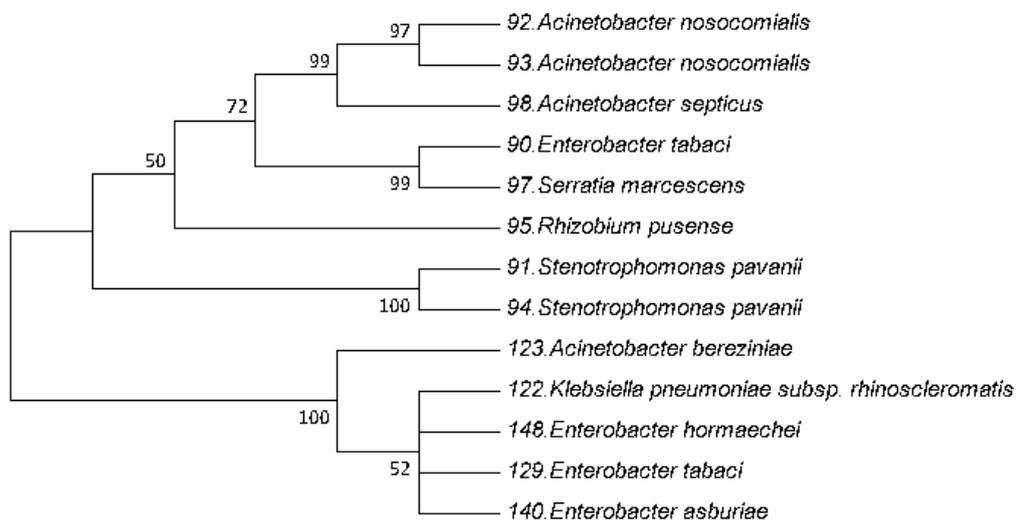


Figura 5. Árvore filogenética de espécies bacterianas presentes nas amostras de ovos de mosquitos *A. darlingi*. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações.

As bactérias identificadas nas amostras de larvas de *A. darlingi* pertencem a quatro filos: Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria e Firmutes, representados por 10 gêneros e 12 espécies diferentes (Figura 6). Dentre os isolados, as espécies com mais de um representante nas amostras foram: *Elizabethkingia miricola*, com três representantes e *Serratia marcescens*, com apenas dois.

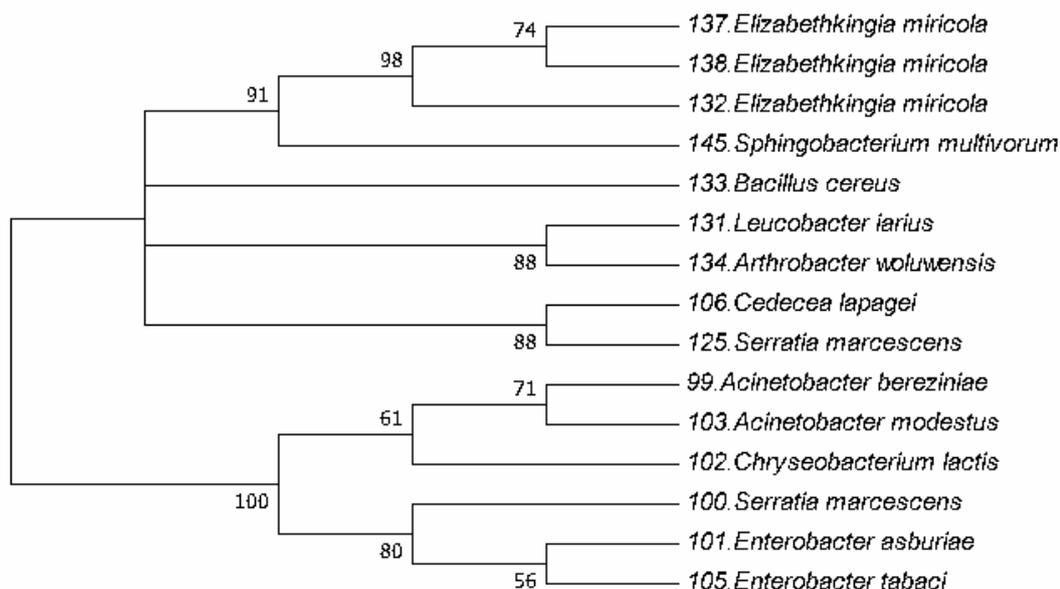


Figura 6. Árvore filogenética das bactérias detectadas em larvas de *A. darlingi*. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações

Composição da comunidade bacteriana de ovários, ovos e larvas de *A. darlingi*

Na composição bacteriana de todas as amostras estudadas foram encontrados os filos: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes, comumente associados a anofelinos (Figura 7). O filo mais abundante, Proteobacteria, correspondeu a 80% do total das amostras e os demais a 13% (Bacteroidetes), 5% (Actinobacteria) e 2% (Firmicutes). Dados semelhantes, também relacionados à espécie *A. darlingi*, foram obtidos por Terenius e colaboradores (2008) ao analisar seis fêmeas adultas e Arruda e colaboradores (2017) ao analisar as fezes de mosquitos por métodos baseados em cultura.

Em estudos de Oliveira (2015), Rocha (2015) e Nilsson e colaboradores (2019), a partir de análises metagenômicas e sequenciamento do gene 16S rRNA de bactérias isoladas de larvas, pupas e amostras de criadouros de *A. darlingi*, a dominância do filo Proteobactéria correspondeu a 80%, 39% e 63%, respectivamente.

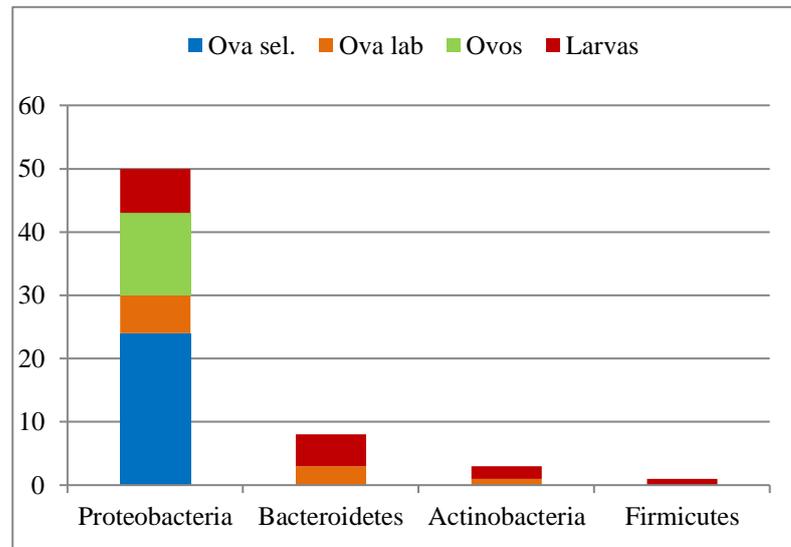


Figura 7. Filos bacterianos identificados em todas as amostras de *A. darlingi*.

A presença do filo Proteobacteria é constantemente descrita em investigações da microbiota intestinal de mosquitos do gênero *Anopheles*, como relatado por Lindh e colaboradores (2005) ao identificar o conteúdo bacteriano de dois vetores da malária na África, *A. gambiae* e *A. funestus*. Outros trabalhos também relataram a predominância deste filo em mosquitos, como é o caso de Chavshin e colaboradores (2014), na investigação de bactérias em *A. culicifacies*, Rani e colaboradores (2009) em *A. sthepensi*, Mwadondo colaboradores (2017) em *A. gambiae* e *C. quinquefasciatus* criados em laboratório e Sharma e colaboradores (2014) na investigação metagenômica da comunidade bacteriana presente nas glândulas salivares de *A. culicifacies*.

Os estudos de pirosequenciamento do gene 16S rRNA para identificar a composição de bactérias nos ovários, intestinos e glândulas salivares de *A. coluzzi* e *A. gambiae* coletados na África também se assemelha aos dados aqui descritos, com a abundância significativa dos filamentos Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes que, juntos, contribuíram com mais de 99% da microbiota total desses anofelinos (THIOFFO et al., 2015).

Em relação às famílias, foram identificadas um total de onze, sendo: Flavobacteriaceae, Xanthomonadaceae, Burkholderiaceae, Pseudomonadaceae, Microbacteriaceae, Rhizobiaceae, Bacillaceae, Micrococcaceae e Sphingobacteriaceae, com prevalência de espécies pertencentes à Moraxellaceae (35%) e Enterobacteriaceae (32%). Em comparação, Arruda e colaboradores (2017) também destacaram a presença significativa de membros da família Enterobacteriaceae em *A. darlingi*, assim como, Boissière e colaboradores (2012) em mosquitos *A. gambiae* infectados por *P. falciparum*.

Dentre os 18 gêneros encontrados em todas as amostras, dois apresentaram maior quantidade de espécies: *Acinetobacter* e *Enterobacter*. O restante foi representado por um número menor de bactérias identificadas (Figura 8).

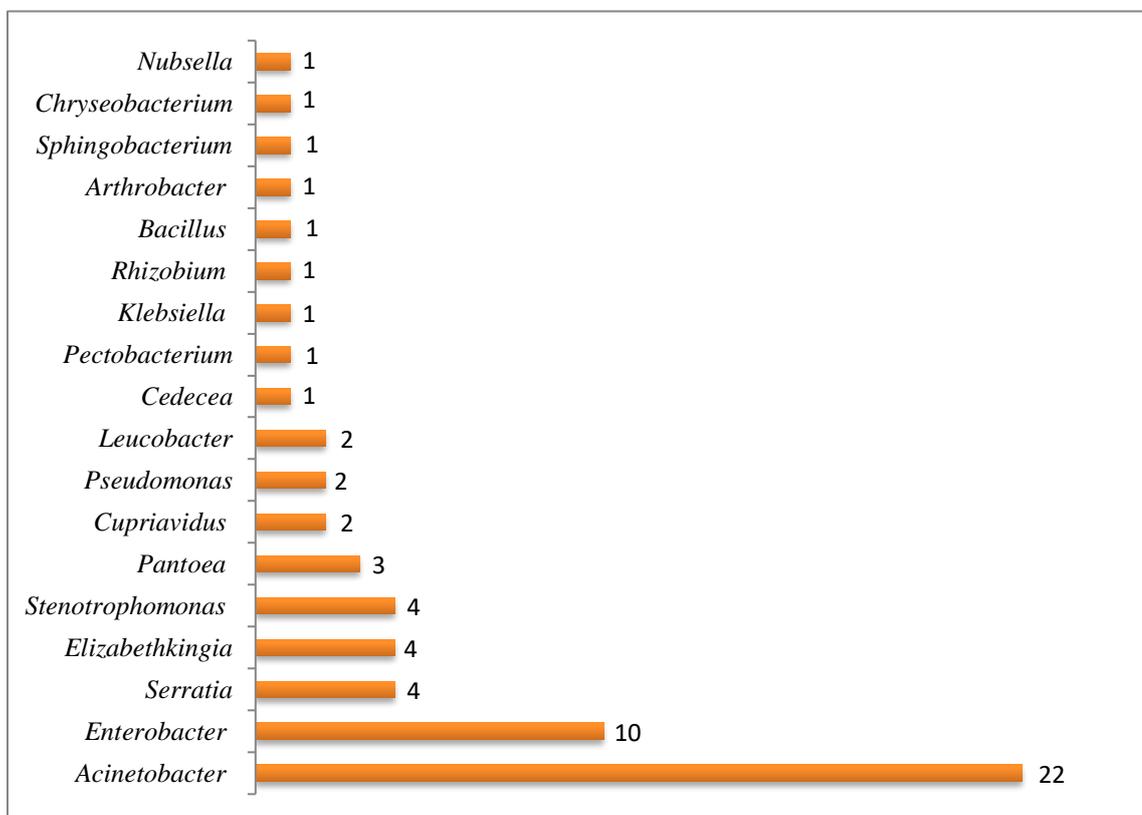


Figura 8. Gêneros bacterianos presentes em todas as amostras estudadas.

A quantidade de gêneros bacterianos encontrados em *A. darlingi* ainda é pouco significativa, no entanto, o número está a crescer. Tenerius e colaboradores (2008) descreveram quatro deles: *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pantoea* e *Pseudomonas*. Oliveira (2015) destacou a prevalência de 11 gêneros, com destaque para: *Paenibacillus*, *Serratia*, *Methylobacterium* e *Burkholderia*. No trabalho de Rocha (2015), dos 23 gêneros bacterianos identificados em *A. darlingi*, *Bacillus* foi predominante e representou 21,7% das amostras, seguido por *Acinetobacter* e *Pseudomonas* com cada um representando 8,7% do total. Também foram relatados gêneros presentes nos dois locais estudados, Coari e Manaus, e estes incluem: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Tsukamurella*. Arruda (2017) relatou a existência de oito gêneros em sua pesquisa e estes incluem: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Cedecea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia* e *Staphylococcus*.

Na análise taxonômica deste estudo foram detectados seis gêneros que ainda não tinham sido relatados em *A. darlingi*: *Elizabethkingia*, *Cupriavidus*, *Leucobacter*, *Pectobacterium*, *Rhizobium* e *Nubsella*. Os resultados aqui obtidos em conjunto com os trabalhos de investigação já existentes de bactérias associadas à *A. darlingi*, até o momento, totalizam a existência de 41 gêneros bacterianos, presentes no principal vetor de *Plasmodium* spp. da Amazônia brasileira.

Em outros anofelinos a presença constante de espécies pertencentes a *Enterobacter* é relatada, como no estudo de Cirimoth e colaboradores (2011), onde cepas bacterianas pertencentes a este gênero foram isoladas de intestinos de mosquitos e testadas para verificar a inibição de *P. falciparum*. Wang e colaboradores (2011) também descobriram níveis maiores de *Enterobacter* em *A. gambiae* após a alimentação sanguínea.

Mwadondo e colaboradores (2017), utilizando sequenciamento de Illumina para investigar a diversidade de bactérias em *A. gambiae* do Quênia, encontraram 12 gêneros no intestino médio de mosquitos criados em laboratório, dentre eles: *Aeromonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Asaia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. Já em mosquitos selvagens a diversidade foi maior, tendo como predominantes: *Serratia*, *Bacillus*, *Agrobacterium* e *Stenotrophomonas*.

Tchioffo e colaboradores (2015) relataram que o teor bacteriano intestinal de duas espécies de mosquitos *Anopheles*, coletados em Camarões, foi bastante variável, sendo dominado por *Comamonas* (43,6%), *Serratia* (9,8%), *Pseudomonas* (6,0%), *Burkholderia* (5,5%) e *Brevundimonas* e 24 horas após a alimentação sanguínea, *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Elizabethkingia* foram predominantes, representando 57%, 15% e 7%, respectivamente. No mesmo trabalho, os autores relataram que nas amostras de ovários e glândulas salivares de *A. coluzzi* e *A. gambiae*, a comunidade bacteriana de mosquitos emergentes foi composta pelo gênero *Comamonas* (38% e 43%), seguido de *Acinetobacter* (18% e 15,5%) e *Pseudomonas* (13,5% e 12,7%).

No presente estudo, onze gêneros foram identificados nas diferentes amostras de ovários: *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Nubsella*, *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Serratia* e *Leucobacter*, com a presença de 17 espécies diferentes. No trabalho de Tchioffo e colaboradores (2015), a diversidade bacteriana de ovários de mosquitos, com 8 dias após a alimentação, foi composta principalmente por *Pseudomonas*, presente em 41,5% dos isolados e cerca de 5% composta por *Acinetobacter* e 2% por *Burkholderia*.

Segata e colaboradores (2016) analisaram tecidos reprodutivos de machos e fêmeas de dois vetores da malária, após o acasalamento. Detectaram que bactérias do gênero *Acinetobacter* foram quantitativamente dominantes na maioria das amostras. Estes dados

corroboram com os descritos neste estudo, onde a presença das espécies deste gênero ocorreu em 47% das amostras dos ovários.

Na análise da literatura não foram encontrados estudos voltados à microbiota bacteriana de ovos de mosquitos *Anopheles* spp. Dessa forma, no presente estudo, foram detectados dois gêneros frequentes nas amostras de ovos de *A. darlingi*: *Acinetobacter* e *Enterobacter*. Estes também foram prevalentes em isolados bacterianos de ovários, sugerindo uma forte relação dos dois gêneros na transmissão vertical.

Chavishin e colaboradores (2014) analisaram diferentes estágios de vida de *A. culicifacies* e de acordo com seus resultados, as amostras da fase larval apresentaram maior diversidade de gêneros, sendo: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Exiguobacterium*, *Kurthia*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Thorsellia* e *Variovorax*. Nas amostras bacterianas de larvas identificadas em nossos estudos, o gênero com mais representantes foi *Elizabethkingia*, seguido de *Acinetobacter*, *Serratia* e *Enterobacter*, cada qual com duas espécies.

Gendrin e Christophides (2013) revisaram 23 estudos de diferentes anofelinos e relataram que dos 91 gêneros descritos, 41 estão presentes em mais de uma espécie, sendo *Pseudomonas* o mais encontrado, seguido de *Aeromonas*, *Asaia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Serratia*. É válido ressaltar que três gêneros descritos aqui (*Leucobacter*, *Pectobacterium* e *Nubsella*) ainda não tinham sido detectados em mosquitos *Anopheles* spp.

As espécies presentes nas amostras de ovários, ovos e larvas de *A. darlingi*, pertencentes à família de maior predominância (Moraxellaceae) foram: *Acinetobacter bereziniae*, *Acinetobacter luctucae*, *Acinetobacter modestus*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter seifertii* e *Acinetobacter septicus*, abrangendo 22 bactérias. Na família Enterobacteriaceae 10 espécies diferentes somaram 20 amostras e estas compreendem: *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter tabaci*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter ludwigii*, *Serratia marcescens*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea dispersa*, *Cedecea lapagei*, *Pectobacterium aroidearum* e *Klebsiella pneumoniae*.

Outras famílias bacterianas foram menos frequentes, entretanto, dentre as espécies pertencentes a elas, destacaram-se: *Elizabethkingia miricola*, *Stenotrophomonas pavanii*, *Cupriavidus metallidurans* e *Leucobacter iarius* (Figura 9). As demais espécies mostraram apenas um representante nas amostras: *Arthrobacter woluwensis*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium arachidis*, *Nubsella zeaxanthinifaciens*, *Pseudomonas paralactis*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Rhizobium pusense* e *Sphingobacterium multivorum*.

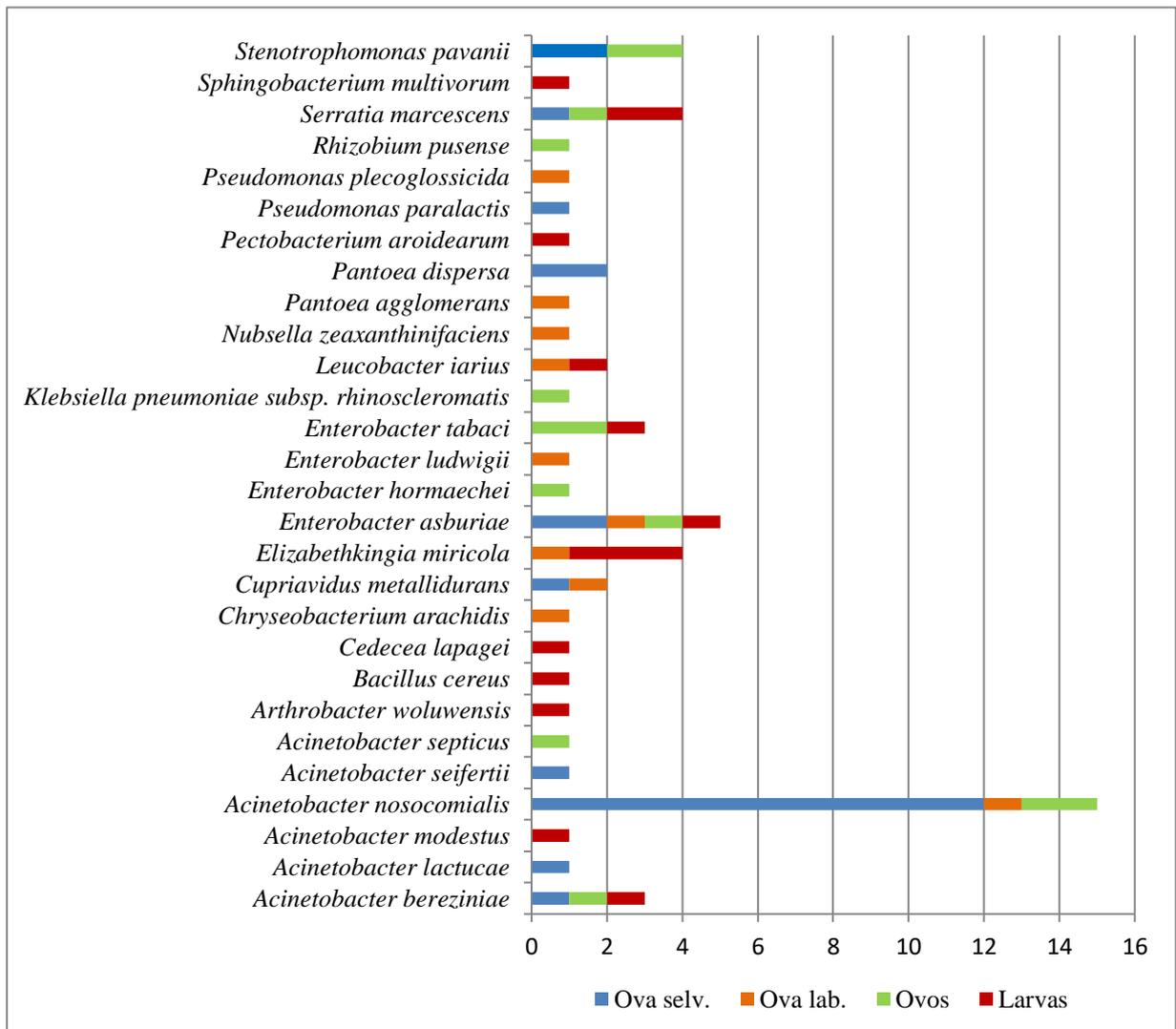


Figura 9. Diferentes espécies bacterianas detectadas nos ovários, ovos e larvas de *A. darlingi*.

Entre as espécies identificadas, a de maior prevalência quanto ao número corresponde a bactéria *A. nosocomialis* (15 espécies), detectada nas amostras de ovários (13) e ovos (2), exceto nas larvas. No estudo de Rocha (2015), *A. nosocomialis* estava presente nos isolados bacterianos de pupas e hábitat larval de mosquitos *A. darlingi*. Isto sugere que a espécie em questão compõe a microbiota associada a *A. darlingi*.

Enterobacter asburiae foi a segunda espécie identificada com maior número. Outras prevalentes foram: *Elizabethkingia miricola*, *Stenotrophomonas pavanii* e *Serratia marcescens*.

A presença da espécie *Elizabethkingia spp.* nos intestinos de *A. gambiae*, criados em laboratório e coletados em campo, foi relatada por Boissière e colaboradores (2012). Neste estudo, os autores sugeriram que a presença da espécie nas seções intestinais pode ter ocorrido devido à associação simbiótica desenvolvida por ela ou por sua ampla presença na natureza.

Outra bactéria, *Pantoea agglomerans*, identificada em apenas uma amostra de ovário, também é constantemente detectada em mosquitos *Anopheles* spp. Esta já foi utilizada em testes paratransgênicos, onde foi verificado o bloqueio do desenvolvimento de dois parasitas da malária: *P. falciparum* e *P. berghei* (BISI e LAMPE, 2011; WANG et al., 2012).

Um dos gêneros que também recebe atenção nas pesquisas de paratransgenia é *Pseudomonas*, tendo espécies constantemente encontradas em vetores da malária e propostas como simbiossiontes promissores. Um exemplo disso encontra-se nos estudos de Thioffo e colaboradores (2013), onde uma cepa de *Pseudomonas* (*P. stutzeri*) inibiu a formação de oocistos em *A. gambiae*. Neste trabalho foram identificadas duas espécies: *Pseudomonas paralactis* e *Pseudomonas plecoglossicida*.

Indícios de transmissão vertical de bactérias em *A. darlingi*

A rota de transmissão vertical é particularmente importante nos estudos da paratransgenia, pois a persistência das bactérias nas fases do mosquito reforça a eficiência desta alternativa de controle.

Neste trabalho, três bactérias identificadas indicaram uma possível transmissão vertical em *A. darlingi* (Figura 6). Estas estavam presentes em pelo menos uma das amostras de ovários, ovos e larvas estudadas.

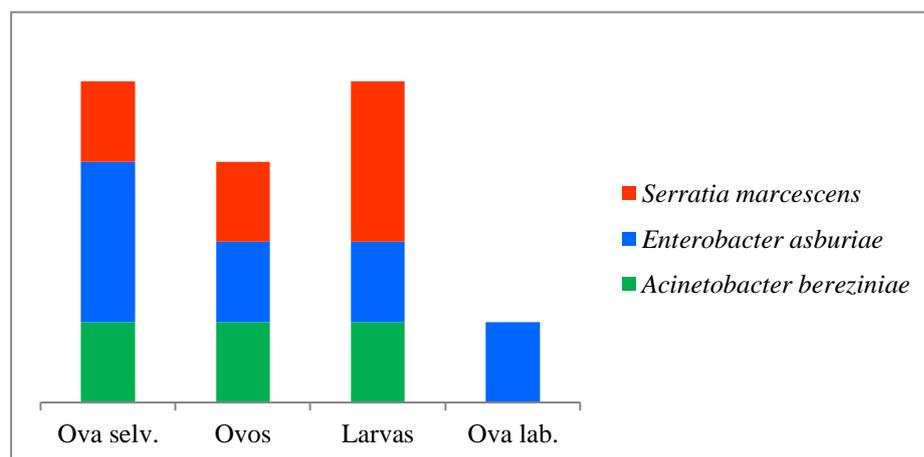


Figura 10. Bactérias que apresentaram indícios de transmissão vertical em *A. darlingi*.

A bactéria *A. bereziniae*, encontrada em três tipos de amostras, exceto em ovários de mosquitos emergidos em laboratório já foi detectada nas seções intestinais de *Musca domestica* (GUPTA et al., 2012). No entanto, não há relatos da espécie em outros estudos de anofelinos, mas sabe-se que é pertencente a um gênero constantemente encontrado em culicídeos,

considerado patogênico e associado a uma ampla gama de infecções. Apesar da bactéria em questão demonstrar indícios de transmissão vertical, esta apresenta certo grau de patogenicidade, portanto, não deve ser utilizada na paratransgenia (VISCA et al., 2011).

Uma espécie gram-negativa, *Enterobacter asburiae* também indicou vestígios de transmissão vertical, sendo relatada em todas as amostras estudadas. Chandel e colaboradores (2013) detectaram *E. asburiae* no trato intestinal de *Culex quinquefasciatus*. Nos estudos de Yadav e colaboradores (2016) a espécie foi a segunda mais prevalente em *Aedes albopictus*, alimentados com solução açucarada. Em *A. gambiae*, a bactéria também dominou o intestino médio de todas as cinco gerações de mosquitos testadas, indicando que o intestino apresenta condições de crescimento favorável para bactérias da família *Enterobacteriaceae* (DONG et al., 2009). Esta espécie é considerada oportunista, entretanto, pode ser utilizada em testes paratransgênicos (YIN et al., 2016).

Outra espécie presente nas fases de *A. darlingi* é *S. marcescens*, constantemente relatada em associação com diferentes anofelinos, colonizando tratos intestinais, reprodutivos, glândulas salivares, larvas, pupas, fezes e locais de reprodução (WANG et al., 2011; TCHIOFFO et al., 2013; ROCHA, 2015; TCHIOFFO et al., 2015; ARRUDA et al., 2017). Neste estudo, esta cepa foi detectada em ovários de mosquitos selvagens, ovos e larvas, exceto em mosquitos criados no laboratório.

Além de sua ampla distribuição na natureza, *S. marcescens* foi proposta como um simbionte promissor em estudos de manipulação genética de bactérias. Seus resultados demonstraram que uma cepa desta espécie, utilizada para testar várias rotas de aquisição em seis vetores, incluindo *A. stephensi*, foi transmitida eficientemente entre o ciclo dos insetos. Além disso, *S. marcescens* modificada geneticamente inibiu a formação de oocistos de *P. falciparum* (BANDO et al., 2013; WANG et al., 2017; KOOSHA et al., 2018).

Apesar de ser uma bactéria oportunista, *S. marcescens* não apresenta resistência a antimicrobianos, pode facilmente colonizar o corpo e hábitat larval de insetos, ser manipulável geneticamente e inibir o desenvolvimento de *Plasmodium*, fatos que reforçam sua utilização na paratransgênese aplicada a diferentes anofelinos que ainda não foram investigados (BANDO et al., 2013; WANG et al., 2017).

Teste de transformação genética em isolados bacterianos

Espécies gram-negativas apresentam características importantes na inibição de parasitas, como relatado por inúmeros estudos (PUMPUNI et al., 1993; GONZALEZ-CERON

et al., 2003; BOISSIÈRE et al., 2012). Desta forma, quatro cepas bacterianas gram-negativas identificadas neste estudo foram selecionadas para a etapa de transformação genética por eletroporação, a fim de verificar a eficiência de transformação utilizando o plasmídeo pKS1-GFP, composto pelo gene da GFP, útil para testes de monitoramento de bactérias.

Duas das espécies selecionadas, *S. marcescens* e *E. asburiae*, apresentaram indícios de transmissão vertical em *A. darlingi*. As outras, *P. dispersa* e *P. agglomerans*, foram escolhidas em função de seu gênero, fortemente encontrado em associação com anofelinos, sendo *P. agglomerans* considerada um simbiote promissor na paratransgenia e *P. dispersa* relatada no trato intestinal de *A. darlingi*, *C. quinquefasciatus* e *A. albopictus* (WANG et al., 2012; CHANDEL et al., 2013; YADAV et al., 2016, ARRUDA, 2017). Estas também foram detectadas nas amostras de ovários de mosquitos selvagens apresentadas neste estudo.

Dentre as cepas utilizadas, *S. marcescens* (Cepa D83) foi a única espécie que incorporou o plasmídeo contendo o gene da GFP, como mostrado na Figura 11 e 12.

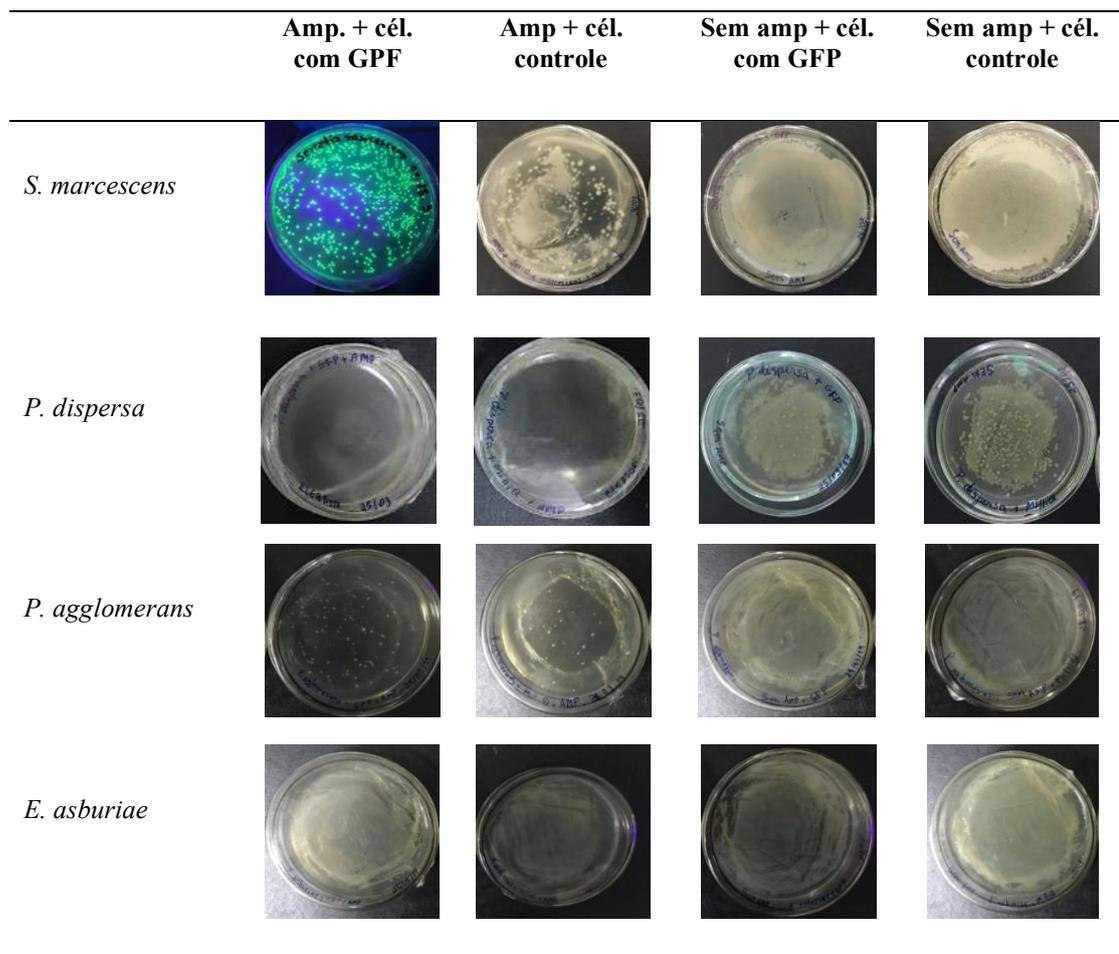


Figura 11. Testes de transformação bacteriana com as quatro cepas selecionadas.

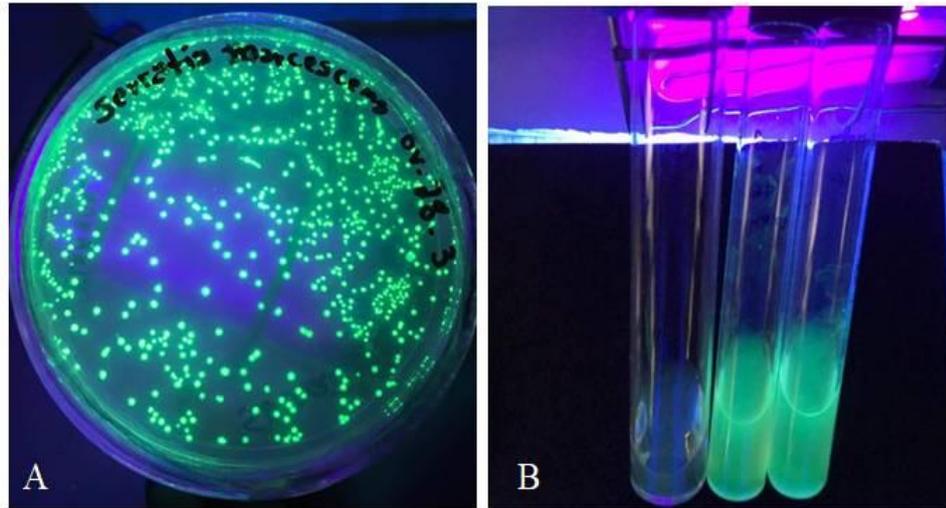


Figura 12. A) Placa de Petri contendo colônias bacterianas de *S. marcescens* transformadas; B) Meio Luria Bertani líquido com células bacterianas transformadas. Fonte: Acervo pessoal.

No trabalho de Wang e colaboradores (2017) esta espécie em questão foi utilizada em testes de paratransgenia. Seus resultados demonstraram que *Serratia* (AS1), contendo plasmídeo com o gene da GFP, colonizou com sucesso o corpo de *A. stephensi* durante todas as suas fases de desenvolvimento, se espalhando rapidamente entre as populações de mosquitos.

No entanto, nos testes de transformação genética realizados nesta pesquisa foi utilizado um plasmídeo (pKS1-GFP) que possui uma origem de replicação desenvolvida para a bactéria *E. coli* (Cepa DH5 α) e, dessa forma, como era de se esperar, nem todas as espécies selvagens, submetidas à eletroporação, foram transformadas.

Entretanto, hipotetizamos que todas as bactérias utilizadas podem ser passíveis de transformação, mas somente se os plasmídeos possuírem origens de replicação desenhadas exclusivamente para cada espécie, bem como os protocolos dos métodos ajustados para cada caso.

CONCLUSÕES

Neste estudo foram isoladas 176 bactérias cultiváveis presentes em amostras de ovários, ovos e larvas de *A. darlingi*, dentre as quais 62 foram identificadas pelo gene 16S rRNA. Algumas das espécies detectadas são fortemente associadas a mosquitos do gênero *Anopheles* spp., em especial, bactérias gram-negativas, capazes de inibir naturalmente parasitas da malária.

Na análise taxonômica foram detectados quatro filos comuns entre mosquitos (Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes) e 18 gêneros, com predomínio de *Acinetobacter* e *Enterobacter*.

Seis novos gêneros foram registrados para *A. darlingi*: *Elizabethkingia*, *Cupriavidus*, *Leucobacter*, *Pectobacterium*, *Rhizobium* e *Nubsella*. Entre estes, três (*Leucobacter*, *Pectobacterium* e *Nubsella*) registrados pela primeira vez em associação com mosquitos *Anopheles* spp.

As bactérias com mais representantes nas amostras de ovários de mosquitos selvagens e criados em laboratório foram: *Acinetobacter nosocomialis*, *Enterobacter asburiae*, *Pantoea dispersa*, *Cupriavidus metallidurans* e *Stenotrophomonas pavanii*.

Nas amostras de ovos *Acinetobacter nosocomialis*, *Enterobacter tabaci* e *Stenotrophomonas pavanii* foram às espécies com mais de dois representantes.

Dentre as bactérias identificadas nas amostras de larvas *Elizabethkingia miricola* foi detectada três vezes, seguida de *Serratia marcescens*, em apenas duas. As demais espécies tinham apenas um representante.

Após a análise taxonômica, três espécies apresentaram indícios de transmissão vertical em *A. darlingi*: *Acinetobacter bereziniae*, *Enterobacter asburiae* e *Serratia marcescens*, presentes em pelo menos uma das amostras de ovários, em ovos e larvas.

Das quatro espécies submetidas a transformação genética (*S. marcescens*, *E. asburiae*, *P. dispersa* e *P. agglomerans*), a bactéria que apresentou melhor resultado foi *S. marcescens*, a qual conseguiu incorporar o plasmídeo e expressar a fluorescência verde, sendo esta apta para utilização em futuros testes de transmissão vertical, horizontal e transtadial em *A. darlingi*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de bactérias transmitidas verticalmente em mosquitos *A. darlingi* se deve ao potencial que estas espécies podem apresentar na paratransgenia, perptuando genes efetores anti-*Plasmodium* para populações de mosquitos nos primeiros estágios de vida.

Neste contexto, a bactérias identificadas neste estudo apresentam um perfil promissor para uma possível utilização em futuros testes paratransgênicos, visando o controle da malária em *A. darlingi*, o principal transmissor de *Plasmodium* spp. na região Amazônica.

REFERÊNCIAS

- AKSOY, S.; WEISS, B.; ATTARDO, G. **Paratransgenesis applied for control of tse-tse transmitted sleeping sickness**. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 627, p. 35-48, 2008.
- ARRUDA, A.; FERREIRA, G., S.; LIMA, N. C. S.; JÚNIOR-SANTOS, A.; CUSTÓDIO, M. G. F.; BENEVIDES-MATOS, N.; Ozakid, L. S.; Stabelib, R. G.; Silva, A. A. **A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)**. *Journal of Microbiological Methods*, v. 14, p. 115-117, 2017.
- ARRUDA, ANDRELISSE. **Identificação de microrganismos cultiváveis associados ao intestino de *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE) com potencial à paratransgênese para o controle da malária**. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas. 170 f., 2017.
- BANDO, H.; KIYOSHI, O.; WAMDAOGO, M. G.; BADOLO, A.; AONUMA, H.; NELSON, B.; FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; SAGNON, N.; KANUKA, H. **Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity**. *Scientific reports*, v. 3 (1641), p. 1-9, 2013.
- BEARD C. B, CORDON-ROSALES C, DURVASULA R. V. **Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission**. *Annual Review of Entomology*, v.47, p. 123-41, 2002.
- BISI, D. C.; LAMPE, D. J. **Secretion of anti-*Plasmodium* effector proteins from a natural *Pantoea agglomerans* isolate by using PelB and HlyA secretion signals**. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 77 (13), p. 4669-4675, 2011.
- BOISSIÈRE, A.; TCHIOFFO, M. T.; BACHAR, D.; ABATE, L.; MARIE, A.; NSANGO, S. E.; et al. **Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection**. *PLoS Pathogens*, v. 8 (5), e1002742, p. 1-12, 2012.
- BRASIL, SIVEP-Malária/SVS – Ministério da Saúde. **Boletim Malária Região Amazônica**. Situação epidemiológica da malária na região Amazônica, entre 2017 e 2019. Disponível em: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1519_2019_03_11/casos_notificados_2018_regio_Amaznica. Acesso: 17/03/2019.
- CAPONE, A.; RICCI, I.; DAMIANI, C.; MOSCA, M.; ROSSI, P.; SCUPPA, P.; CROTTI, E.; EPIS, S.; ANGELETTI, H.; VALZANO, H.; SACCHI, G; BANDI, C.; DAFFONCHIO, D.; MANDRIOLI, H.; FAVIA, L. **Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control**. *Parasites & Vectors*, 6 (1):182, p. 1-13, 2013.
- CHANDEL, K.; MENDKI, M. J.; PARIKH, R. Y.; KULKARNI, G.; TIKAR., S. N.; SUKUMARAN, D.; PRAKASH, S.; PARASHAR, B. D.; SHOUCHE, Y.; VEER, V. **Midgut Microbial Community of *Culex quinquefasciatus* Mosquito Populations from India**. *PLoS ONE*, v. 8 (11), p. 1-10, 2013.

CHAVSHIN, A. R.; OSHAGHI, M. A.; VATANDOOST, H.; POURMAND, M. R.; RAEISI, A.; TERENIUS, O. **Isolation and identification of culturable bacteria from wild *Anopheles culicifacies*, a first step in a paratransgenesis approach.** *Parasites & Vectors*, v. 7 (419), p. 1-8, 2014.

CIRIMOTICH, C. M.; DONG, Y.; CLAYTON, A. M.; SANDIFORD, S. L.; SOUZA-NETO, J. A.; MULENGA, M.; DIMOPOULOS, L. **Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*.** *Science*, vol. 332 (6031), p. 855-858, 2011.

CONSOLI, R.A.G.B; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** In: Capítulos 1-3. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 228 p., 1994. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/th/pdf/consoli-8585676035.pdf>.

COUTINHO-ABREU, I.V., ZHU, K.Y., RAMALHO-ORTIGAO, M. **Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges.** *Parasitology International*, v. 59 (1), p. 1-8, 2010.

DEANE, L.M. **Malaria vectors in Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.81, p. 5-14, 1986.

DJADID, N. D.; JAZAYERI, H.; RAZ, A.; FAVIA, G.; RICCI, I.; ZAKERI, S. **Identification of the midgut microbiota of *An. Stephensi* and *An. Maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria.** *PLoS ONE*, v. 6 (12), p. 1-7, 2011.

DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. **Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites.** *PLoS Pathogens*, v. 5 (5), p. 1-10, 2009.

DOUGLAS, A. E. **Lessons from Studying Insect Symbioses.** *Cell Host & Microbe*, v. 10 (4), p. 359–367, 2011.

DUAN, Y. Q.; ZHOU, X. K.; DI-YAN, L.; LI, Q. Q.; DANG, L. Z.; ZHANG, Y. G.; QIU, L. H.; et al. ***Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco.** *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 108 (5), p. 1161-1169, 2015.

DURVASULA R. V.; GUMBS, A.; PANACKAL A., KRUGLOV, O.; AKSOY, S.; MERRIFIELD, R. B.; RICHARDS, F. F.; BEARD, C. B. **Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94 (7), p. 3274-3278, 1997.

FAVIA, G.; RICCI, I.; DAMIANI, C.; RADDADI, N.; CROTTI, E.; MARZORATI, M.; RIZZI, A.; URSO, R.; BRUSETTI, L.; BORIN, S.; MORA, D.; SCUPPA, P.; PASQUALINI, L.; CLEMENTI, E.; GENCHI, M.; CORONA, S.; NEGRI, I.; GRANDI, G.; ALMA, A.; KRAMER, L.; ESPOSITO, F.; BANDI, C.; SACCHI, L.; DAFFONCHIO, D. **Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America (USA)*, v. 104, p. 9047-9051, 2007.

GENDRIN M, CHRISTOPHIDES GK. The anopheles mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. In: Manguin S, editor. ***Anopheles Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors***, cap. 3, p. 525-548, 2013.

GONZALEZ-CERON, L.; SANTILLAN, F.; RODRIGUEZ, M.; MENDEZ, D.; HERNANDEZ-AVILA, J. E. **Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development.** Journal of Medical Entomology, v. 40 (3), p. 371-374, 2003.

GUÉGAN, M.; ZOUACHE, K.; DÉMICHEL, C.; MINARD, G.; TRAN, V. V.; POTIER, P.; MAVINGUI, P.; VALIENTE, M. C. **The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions.** Microbiome, v. 6 (49), p. 1-17, 2018.

GUPTA, A. K.; NAYDUCH, D.; VERMA, P.; SHAH, B.; GTE, H. V.; PATOLE, M. S.; et al. **Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.).** FEMS Microbiology Ecology, v. 79 (3), p. 581-593, 2012.

HOSOKAWA T, KIKUCHI Y, NIKOH N, SHIMADA M, FUKATSU T. **Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria.** PLoS Biology, v. 4 (10), p. 1841-1851, 2006.

KIKUCHI Y, HOSOKAWA T, FUKATSU T. **Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation.** Applied and environmental microbiology, v. 73(13), p. 4308-4316, 2007.

KOOSHA, M.; VATANDOOST, H.; KARIMIAN, F.; CHOUBDAR, N.; ABAI, M. R.; OSHAGHI, M. A. **Effect of *Serratia* AS1 (Enterobacteriaceae: Enterobacteriales) on the Fitness of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) for Paratransgenic and RNAi Approaches.** Journal of Medical Entomology, p. 1–7, 2018.

LINDH, J.M; TERENIUS, O; FAYE, I. **16S rRNA Gene-Based Identification of Midgut Bacteria from Field-Caught *Anopheles gambiae* SensuLato and *A. funestu* sMosquitoes Reveals New Species Related to Known Insect Symbionts.** Applied and Environmental Microbiology, v. 71 (11), p.7217–7223, 2005.

MARANHÃO, A. Q. Transformação bacteriana. In: DE-SOUZA, M. T; BRIGIDO, M. M. (Org.); MARANHÃO, A. Q (Org.). **Técnicas Básicas em Biologia Molecular.** 2. ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, v. 1, cap. 10, p. 216-228, 2016.

MINARD, G.; MAVINGUI, P.; MORO, C. V. **Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont.** Parasites & Vectors, 6:146, 2013.

MORAN, N. A. **Symbiosis.** Current Biology, v. 16 (20), 2006.

MWADONDO, E. M.; GHILAMICHAEL, A.; ALAKONYA, A. E.; KASILI, R. W. **Midgut bacterial diversity analysis of laboratory reared and wild *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Kenya.** African Journal of Microbiology Research, v. 11(29), p. 1171-1183, 2017.

NILSSON, L. K. J; OLIVEIRA, M. R.; MARINOTTI; ROCHA, E. M.; HÅKANSSON, S. TADEI, W. P.; SOUZA, A. Q. L; TERENIUS, O. **Characterization of bacterial communities in breeding waters of *Anopheles darlingi* in Manaus in the Amazon Basin malaria-endemic area.** Microbial Ecology, p. 1-11, 2019.

OLIVEIRA; M. R. **Avaliação da biodiversidade de bactérias não cultiváveis associadas a anofelinos e seu habitat.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em

Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). 76f, 2015.

PUMPUNI, C. B.; BEIER, M. S.; NATARO, J. P.; GUERS, L. D.; DAVIS, J. R. ***Plasmodium falciparum***: inhibition of sporogonic development in *Anopheles stephensi* by gram-negative bacteria. *Experimental Parasitology*, v. 77 (2), p. 195-199, 1993.

RANI, S.; SHARMA, A.; RAJAGOPAL, R.; ADAK, T.; BHATNAGAR, R. K. **Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi* - an Asian malarial vector**. *BMC Microbiology*, v. 9 (96), p. 1-22, 2009.

REJMANKOVA, E.; HARBIN-IRELAND, A.; LEGE, M. **Bacterial abundance in larval habitats of four species of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Belize, Central America**. *Journal of Vector Ecology*, v. 25 (2), p. 229–239, 2000.

RIEHLE, M. A.; JACOBS-LORENA, M. **Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies**. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35 (7), p. 699-707, 2005.

RIEHLE, M.A; MOREIRA, C.K; LAMPE, D; LAUZON, C; JACOBS-LORENA, M. **Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut**. *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 595-603, 2007.

ROCHA, E. M. **Estudo comparativo da microbiota bacteriana cultivável associada à *Anopheles darlingi* Root, 1926, e seu hábitat**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). 76f, 2015.

SAMPAIO, V. S.; SIQUEIRA, A. M.; ALECRIM, M. G. C.; MOURÃO, M. P. G.; MARCHESINI, P. B.; ALBUQUERQUE, B. C.; NASCIMENTO, J.; FIGUEIRA, E. A. G.; ALECRIM, W. D.; MONTEIRO, W. M.; LACERDA, M. V. G. **Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48 (Suppl D), p. 4-11, 2015.

SEGATA, N.; BALDINI, F.; POMPON, J.; GARRETT, W. S.; TRUONG, D. T.; DABIRÉ, R. K. **The reproductive tracts of two malaria vectors are populated by a core microbiome and by gender and swarm-enriched microbial biomarkers**. *Scientific reports*, v. 6 (24207), p. 1-10, 2016.

SHARMA, P; SHARMA, S.; MAURYA, R. K.; DE, T. D.; THOMAS, T.; LATA, S.; SINGH, N.; PANDEY, K. C.; VALECHA, N.; DIXIT, R. **Salivary glands harbor more diverse microbial communities than gut in *Anopheles culicifacies***. *Parasites & Vectors*, v. 7 (235), p. 1-7, 2014.

TADEI, W. P.; RODRIGUES, I. B; RAFAEL, M. S.; SAMPAIO; R. T. M.; MESQUITA, H. G.; PINHEIRO, V. C. S.; et al. **Adaptative processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region**. *Hydrobiologia*, 789 (1), p. 1-18, 2017.

TADEI, W.P.; THATCHER, B.D.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I.B.; RAFAEL, M.S. **Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the**

Brazilian Amazon. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 59, p. 325-335, 1998.

TCHIOFFO, M. T.; BOISSIÈRE, A.; ABATE, L.; NSANGO, S. E.; BAYIBÉKI, A. N.; AWONO-AMBÉNÉ, P. H.; CHRISTEN, R.; GIMONNEAU, G.; MORLAIS, I. **Dynamics of bacterial community composition in the malaria mosquito's epithelia.** Frontiers in Microbiology, v. 6 (500), p. 1-9, 2015.

TCHIOFFO, M. T.; BOISSIÈRE, A.; CHURCHER, T. S.; ABATE, L.; GIMONNEAU, G.; NSANGO, S. E. **Modulation of malaria infection in *Anopheles gambiae* mosquitoes exposed to natural midgut bacteria.** PLoS ONE, v. 8 (12), e81663, 2013.

TERENIUS, O; OLIVEIRA, C.D; PINHEIRO, W.D; TADEI, W.P; JAMES, A.A; MARINOTTI, O. **16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes.** Journal of Medical Entomology, v. 45 (1), p. 172–175, 2008.

VISCA, P.; SEIFERT, H.; TOWNER, K. J. ***Acinetobacter* infection** - an emerging threat to human health. IUBMB Life: Critical Review, v. 63 (12), p. 1048-1054, 2011.

WANG, S.; GHOSH, A. K.; BONGIO, N.; STEBBINGS, K. A.; LAMPEB, D. J.; JACOBS-LORENA, M. **Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 109 (31), p. 12734-12739, 2012.

WANG, S; DOS-SANTOS, A; HUANG, W; LIU, K.C; OSHAGHI, M.A; WEI, G; AGRE, P; JACOBS-LORENA, M. **Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria.** Science, v. 357 (6358), p. 1399-1402, 2017.

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

WANG, Y.; GILBREATH, T. M.; KUKUTLA, P.; YAN, G.; XU, J. **Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya.** PLoS ONE, v. 6 (9), e24767, p. 1-9, 2011.

WHO - World Health Organization World. **World Malaria Report 2018:** Global malaria programme. Geneva, 2018.

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

YADAV, K.K; DATTA, S; NAGLOT, A; BORA, A; HMUAKA, V; BHAGYAWANT, S.; GOGOI, H.; VEER, V.; RAJU, P. S. **Diversity of cultivable midgut microbiota at different stages of the asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India.** PLoS ONE, v. 11 (12), p. 1-16, 2016.

YIN, Y.L; WAI-FONG, Y; KOK-GAN, C. ***Enterobacter asburiae* Strain L1: Complete Genome and Whole Genome Optical Mapping Analysis of a Quorum Sensing Bacterium.** Sensors, v. 14 (8), p. 13913-13924, 2016.

YOSHIDA, S; IOKA, D; MATSUOKA, H; ENDO, H; ISHII, A. **Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 113, p. 89-96, 2001.

MATERIAL COMPLEMENTAR

Metodologia detalhada

Área de estudo

A área de estudo está situada no Município de Manaus-Am, mais precisamente no bairro Puraquequara, cuja coordenada geográfica é -3.036439, -59.871486 W - Google Maps (Figura 13A - 13B). O local fica nas proximidades de uma mata, com barragem permanente, habitação humana e uma área com criação de galinhas, sendo selecionado em função da alta densidade populacional de mosquitos *A. darlingi* presentes nessa região e por ser um local de coleta habitual da equipe técnica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.



Figura 13. Local de coleta de mosquitos adultos. (A) Manaus-AM; (B) Raifran. Fonte: Google Maps.

Coleta de mosquitos adultos e identificação taxonômica

A capturar de fêmeas adultas pertencentes à espécie *A. darlingi* ocorreu nas primeiras horas noturnas de hematofagia (18:00 as 20:00) pelo método de atração humana protegida, no qual é utilizado aspirador manual denominado capturador de Castro (Figura 14A).

Depois de capturadas, as fêmeas foram alimentadas com sangue de hamster anestesiado - Comissão de ética no uso de animais - CEUA 026/2016, e transferidas para copos parafinados, dispostos em caixas térmicas cobertos de papel umedecido com água para manter

a temperatura e umidade adequadas durante o transporte para o Insetário de *A. darlingi* do Laboratório de Malária e Dengue no INPA (Figura 14B).

No insetário, as fêmeas foram transferidas individualmente para copos parafinados de 100 mL vedados na superfície com filó e forrados internamente com papel de filtro contendo algodão umedecido (Figura 14C). Os copos foram colocados em caixas térmicas e após três dias as caixas foram abertas para verificação da postura de ovos.

As fêmeas adultas, ovos, larvas e pupas de *A. darlingi* utilizadas neste trabalho foram identificadas individualmente em microscópio estereoscópico, utilizando as chaves de identificação de Consoli e Oliveira (1994) (Figura 14D).



Figura 14. (A) Captura noturna de mosquitos adultos; (B) Repasto sanguíneo em hamster; (C) Fêmeas transferidas individualmente para copos parafinados; (D) Identificação. Fonte: Acervo pessoal.

Manutenção de *A. darlingi* em condições de laboratório

Após a confirmação da espécie, ocorreu a dissecação de ovários apenas das fêmeas que realizaram a oviposição. Os ovos depositados por cada fêmea foram postos em novos copos parafinados previamente identificados, para eclosão das larvas. Após isso, foi adicionado em cada copo contendo larvas recém-eclodidas aproximadamente 50 mL de água destilada e diariamente foram feitas manutenções nos mesmos (Figura 15A - 15B). A manutenção consistiu em:

Todos os dias, as bacias eram limpas com pedaços de papel filtro e as larvas, de acordo com seus estádios, eram alimentadas com ração triturada e esterelizada, mantendo sempre uma quantidade de água adequada nos copos. Os mesmos cuidados foram utilizados com as pupas,

exceto a alimentação, pois nesse estágio elas não se alimentam. Após a emergência do adulto, apenas as fêmeas foram utilizadas para uma nova dissecação de ovários.

As atividades de manutenção realizadas no insetário seguiram as recomendações descritas no POP - Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Malária e Dengue do INPA (LMD-INPA), amparado pelo POP-LMD-CL – 01 do ano de 2017.



Figura 15. (A) Manutenções diárias; (B) Copo contendo larvas. Fonte: Acervo pessoal.

Dissecação dos ovários de *A. darlingi*

Três dias após a alimentação sanguínea os ovários foram dissecados com auxílio de lupa, pinças, estiletos e solução salina de NaCl₂ a 0,9%, como descrito por Consoli e Oliveira (1994). As fêmeas foram postas em um freezer com temperatura de $\pm 18^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e depois de imobilizadas foram colocadas sobre uma lâmina microscópica esterelizada, com o ventre voltado para cima e uma gota de solução salina sobre os segmentos abdominais. Na lupa, a ponta do estilete na mão direita foi colocada firmemente sobre o 8^o segmento, enquanto a pinça na mão esquerda exercia uma pequena força sobre o tórax do mosquito, puxando-o para visualizar o trato genital e depois obter os ovários que, posteriormente foram separados das demais estruturas e retirados com o auxílio de uma micropipeta.

Plaqueamento e isolamento bacteriano das amostras de ovário, ovo, larva e pupa de *A. darlingi*

Após a dissecação, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Malária e Dengue. Em seguida, os ovários das fêmeas capturadas em campo e emergidas em laboratório foram lavados individualmente por três vezes com água destilada esterelizada, colocados em microtubos de 2 mL, macerados e em seguida centrifugados por 3 min a 8.000 rpm (16A). Depois de centrifugada, cada amostra foi ressuspensa em 200 μL de água destilada

esterilizada, agitada vigorosamente em aparelho vórtex e novamente centrifugada por 3 min a 8.000 rpm.

Em fluxo laminar estéril, 50 μ L do sobrenadante foram espalhados em placas de Petri, com o auxílio de uma alça de Drigalsky embebida em álcool 70% e flambada em bico de Bunsen para o plaqueamento do sobrenadante (16B). As placas continham meio de cultivo sólido Nutriente Ágar (NA) com fluconazol, este favorece apenas o crescimento bacteriano.

Dez amostras de ovos de cada fêmea de *A. darlingi*, utilizadas neste trabalho, foram lavadas por imersão em água estéril e etanol 70%, em seguida foram maceradas e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente e 50 μ L do sobrenadante foram plaqueados.

As amostras de larvas recém-eclodidas e pupas também foram lavadas por imersão em água estéril e etanol 70%, maceradas, centrifugadas e plaqueadas conforme os métodos descritos. Apenas três amostras de larvas e uma de pupa de cada prole foram utilizadas neste processo de plaqueamento.

Após a realização das etapas descritas, as placas contendo bactérias foram vedadas com filme de PVC, identificadas de acordo com a origem, data e armazenadas em uma estufa incubadora B.O.D a 29 °C e mantidas por um período de 24 a 48 horas para o crescimento das bactérias (16C).

A etapa seguinte, realizada no fluxo laminar, consistiu no isolamento bacteriano, no qual as colônias crescidas foram selecionadas e postas em placas de Petri contendo meio de cultivo NA sem fluconazol. Depois foi realizada a técnica de esgotamento por estrias cruzadas a partir de uma única colônia com o auxílio de alça de platina (16D-E). Novamente as placas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

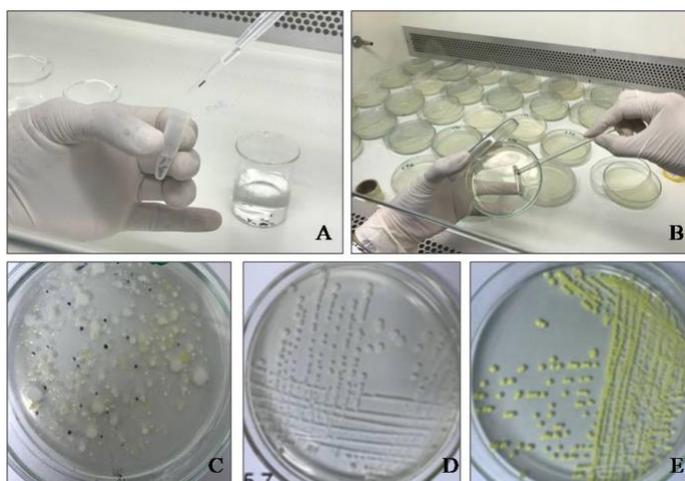


Figura 16. Esterelização das amostras; (B) Plaqueamento ; (C) Placa com colônias bacterianas; (D-E) Técnica de esgotamento por estrias cruzadas para isolamento e purificação bacteriana. Fonte: Acervo pessoal.

Foram selecionadas, nestas etapas, apenas colônias bacterianas semelhantes presentes em placas de isolados de ovários, ovos e larvas, para verificar os indícios de transmissão vertical de bactérias.

Purificação, caracterização morfológica e preservação dos isolados bacterianos

Depois de isoladas, as bactérias crescidas em placas de Petri foram purificadas, utilizando novamente a técnica de esgotamento por estrias, com auxílio de uma alça de platina embebida em álcool 70% e flambada em chama no bico de Bunsen. O mesmo meio de cultivo foi utilizado e após realização da técnica, as placas foram colocadas em uma estufa B.O.D por até 72 horas para o crescimento bacteriano.

As colônias crescidas foram caracterizadas de acordo com a cor, textura, consistência e formato. Para caracterizar a forma celular, os isolados foram submetidos ao método de colocação de Gram, no qual foi adicionado em lâminas de vidro estéreis 10 µL de água destilada e com uma alça de platina embebida em álcool 70% e flambada, uma pequena amostra bacteriana foi adicionada e friccionada na lâmina para sua fixação em temperatura ambiente. Os reagentes utilizados foram violeta genciana, lugol fraco, descolorante de solução álcool-acetona, fuccina e a metodologia seguiu as recomendações do fabricante do produto Kit Coloração de Gram - Laborclin. A visualização da lâmina corada foi feita em microscópio óptico na lente objetiva (100X) utilizando óleo de imersão para microscopia da Laborclin.

Os isolados bacterianos foram preservados em microtubos de 2 mL, com adição de 800 µL de meio de cultivo NA líquido, colônias bacterianas puras e 20% de glicerol (v/v). Posteriormente as amostras foram estocadas em freezer - 20°C.

Todos os procedimentos descritos foram realizados com a máxima esterelização possível e dentro de um fluxo laminar.

Identificação molecular bacteriana

Para a identificação molecular bacteriana, ocorreram as seguintes etapas: extração de DNA genômico dos isolados bacterianos, amplificação por PCR da região 16S do rRNA, eletroforese em gel de agarose, purificação de DNA, sequenciamento e comparação das sequências obtidas com banco de dados de nucleotídeos públicos.

As bactérias foram reunidas em grupos de acordo as características morfológicas das colônias e a forma celular, observada pela coloração de Gram. Foram selecionadas bactérias que aparentavam morfologia semelhante em ovários, ovos e larvas de *A.darlingi*.

Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA das bactérias foi utilizado o produto Matriz InstaGene da empresa Bio-Rad e o protocolo seguiu as recomendações do fabricante, no qual:

Uma pequena quantidade ($\pm 0,001$ g) de massa bacteriana foi adicionada em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo 1 mL de água nanopura autoclavada. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente (29 °C) durante 25 minutos. Depois de decorrido o tempo, foi centrifugada a 12.000 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. Logo após, 200 μ l de Matriz InstaGene, previamente misturada em um agitador magnético, foram adicionados ao pellet, homogeneizado em vórtex por 10 segundos e incubados a 56 °C em banho maria por 25 minutos. Em seguida o tubo foi submetido ao vórtex durante 10 segundos e incubado novamente em banho maria, na temperatura de 100 °C durante 8 minutos. O tubo foi novamente agitado em vórtex durante 10 segundos e depois centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos. Por fim, o sobrenadante foi quantificado num espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) e ajustado para 150ng de DNA, depois transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C para a utilização na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA foram submetidas ao protocolo de PCR para ampliação de um fragmento de aproximadamente 1100 pb do rRNA bacteriano 16S, afim de realizar a identificação molecular. Para esta etapa foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1):

Tabela 1. Iniciadores 16S rRNA utilizados.

| Iniciadores | Sequências |
|--------------------|--------------------------------|
| Primer 27F | 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (f) |
| Primer 1100R | 5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3' (r) |

As reações de amplificação do gene 16S rRNA consistiram em um volume final de 25 μL utilizando o Kit TaqPol - Master Mix 2X (Cellco Biotec) e o protocolo seguiu as recomendações do fabricante. Foram utilizados para cada reação 12,5 μL de mix: 1 μL DNA (150 ng/ μL); 10,5 μL de H₂O Milli-Q e 0,5 μL (10 pmol) de cada primer (27F e 1100R).

As reações ocorreram em um aparelho termociclador Thermal Cycler[®] da Bio-Rad e o perfil térmico da PCR consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos como segue: desnaturação das fitas-molde a 95°C por 1 min, pareamento dos primers a 54°C por 40seg e extensão a 72°C por 1 min e 30 seg. Ao final um ciclo de extensão a 72°C por 5 min.

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram verificados quanto a sua qualidade com a realização de eletroforese em gel de agarose (0,8%, p/v) corado com solução brometo de etídio (0,005%, p/v), em tampão TAE 1X. Para a visualização das bandas de DNA utilizou-se 1 μL do marcador Long Range DNA Ladder - Cellco e a corrida eletroforética foi efetuada em 90 volts, corrente 70 durante 60 min. A visualização e registro das imagens foram feitas em um fotodocumentador (EagleEye II, Stratagene).

Purificação das amostras

Os fragmentos de 16S rRNA amplificados na reação de PCR foram purificados utilizando o PCR Purification Kit (Cellco Biotec) e as recomendações seguiram o protocolo do fabricante, descrito a seguir.

Primeiramente ocorreu a preparação das amostras, onde foram adicionados e misturados, em cada microtubo de DNA amplificado, 125 μL do reagente Binding Buffer (5 volumes para 1 volume de DNA). Para a ativação da coluna, 100 μL de Activation Buffer foram adicionados em spin column colocadas sobre tubos coletores estéreis de 2 mL e em seguida foram levados para centrifugação a 10.000 g por 30 s.

As amostras resultantes da homezeneização com DNA foram adicionadas nas spin column ativadas sobre os tubos coletores respectivos e novamente foram centrifugadas a 10.000 g por 30 s. O produto que passou pela coluna foi descartado.

A etapa de lavagem consistiu na adição de 700 μL de Washing Buffer na coluna, centrifugação a 10.000 g por 30 s e descarte do que passou pela coluna durante três vezes, com exceção da terceira lavagem, em que a centrifugação ocorreu durante 2 min para remoção de qualquer resíduo de produto. Na etapa final, as colunas foram colocadas em microtubos novos de 1,5 mL e 30 μL de Elution Buffer foram adicionados no centro da spin column, incubado

por 1 min à temperatura ambiente e centrifugado por 1 min para eluição do DNA. Uma alíquota de 50ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento.

Sequenciamento do gene 16S rRNA e análise das sequências consenso

As amostras de DNA purificadas foram previamente quantificadas em Fluorômetro Qubit 2.0 (Invitogen). Para o sequenciamento utilizou-se um alíquota de 50ng de DNA purificado como matriz, kit BigDye Terminator V 3.1. (Life Technologies) e 10pMol dos mesmos oligonucleotídeos utilizados para a reação de PCR. O mix consistiu no volume final de 10 µL com: 0,6 µL de BigDye, 0,4 µL de iniciadores, 2 µL de Tampão 5X, 3 µL de Água Milli-Q e 7 µL de DNA purificado.

As reações de sequenciamento foram submetidas ao termociclador (uma reação para cada iniciador) e o perfil térmico foi programado de acordo com as especificações descritas nas seguintes condições: Desnaturação inicial 95 °C 3 min, Desnaturação das fitas moldes 95 °C 30s, Pareamento do iniciador 58 °C 30s, Extensão 60 °C 30s, Extensão final 60 °C 4 min e Hold 4 °C[∞] em um total de 40 ciclos.

Logo após, as amostras foram precipitadas com etanol e inseridas no Analisador Genético ABI 3500 XL (Applied Biosystems) para a determinação das sequências. A qualidade dos eletroferogramas gerados após a corrida eletroforética no sequenciador foi analisada na plataforma Electropherogram Quality Analysis – EMBRAPA (disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Esta plataforma online é constituída de um conjunto de programas que analisa as sequencias geradas e atribui valores de qualidade às bases usando PHRED e ao final do processamento apresenta uma tabela contendo o número total e a estatística de sequências processadas e de boa qualidade.

A partir da tabela de qualidade foi possível analisar individualmente as sequências das amostras de cada primer e montar os consensos dos isolados bacterianos, usando o alinhamento do conjunto CAP3 que permite o acesso aos contigs, também visualizados nesta plataforma. As fitas consenso foram novamente analisadas quanto a sua qualidade e depois comparadas com as sequências bacterianas depositadas na base de dados do GenBank - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Preparação de células eletrocompetentes e transformação genética bacteriana pelo método de eletroporação

As espécies selecionadas para transformação bacteriana *Serratia marcescens*, *Enterobacter asburiae*, *Pantoea agglomerans* e *Pantoea dispersa* foram transformadas geneticamente com o plasmídeo pKS1-GFP, cedido pelo Laboratório de Tecnologias do DNA do Centro de Apoio Multi-disciplinar (CAM-UFAM).

O plasmídeo em questão trata-se de um vetor de expressão que contém 3734 pb, marcador de seleção que confere resistência a ampicilina e sequência codificadora da proteína Green Fluorescent Protein – GFP (Figura 17).

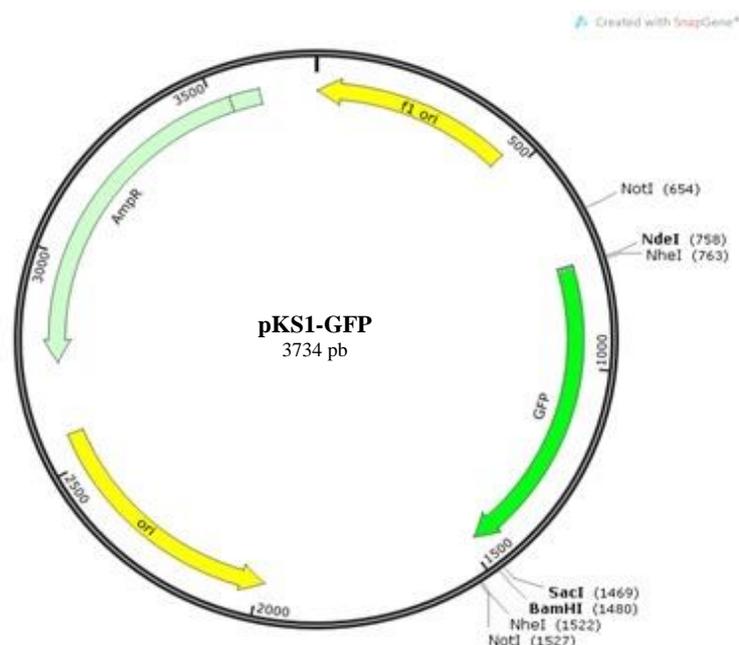


Figura 17. Plasmídeo Pks1-GFP. Fonte: Laboratório de Tecnologia do DNA – UFAM.

Preparação de células eletrocompetentes

Primeiramente foram preparados os pré-inóculos das bactérias em tubos de ensaio, compostos de 20 μ L de bactéria preservada e 5 mL de meio líquido Luria Bertani (LB). Estes foram mantidos a 37°C por 16h sob agitação de 250 rpm.

Após o crescimento bacteriano, 100 μ L do pré-inóculo foram adicionados em 50 mL de meio de cultivo líquido e incubados a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 2 a 4 horas para atingir a densidade óptica (D.O) entre 0,7 e 0,9, com comprimento de onda de 600 nm em aparelho espectrofotômetro.

Depois de atingir a densidade óptica adequada, as células bacterianas foram transferidas para tubos falcon de 50 mL e centrifugadas a 3.000 \times g por 30 min a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas foram ressuspensas em 10 mL de glicerol

10% (v/v) gelado a 4° C, com o auxílio de pipetas pré-resfriadas e novamente foram centrifugadas a 3.000 \times g por 30 min a 4° C. Este procedimento de lavagem com glicerol 10% foi repetido por 4x.

Após a última centrifugação, as células bacterianas competentes foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10%, distribuídas em microtubos estéreis (200 μ L) devidamente etiquetados e foram estocadas em geladeira a -80 °C.

Método de eletroporação

Em microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 100 μ L de células eletrocompetentes e 2 μ L de plasmídeo pKS1-GFP. Também foram preparadas amostras controle com adição de água Milli-Q no lugar do plasmídeo. Após a homogeneização das amostras, estas foram adicionadas a cubetas de 1 mm pré-resfriadas e inseridas no equipamento Electroporator 2510 (Eppendorf®), expostas a uma voltagem de 1900 volts. Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação de 250 rpm.

A etapa seguinte consistiu no plaqueamento de 50 μ L de bactérias transformadas com plasmídeo e bactérias controle em meio de cultivo LB sólido (Figura 17). Estas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 horas e após o crescimento, as colônias foram visualizadas em luz ultravioleta e apenas bactérias que expressaram fluorescência verde foram preservadas com glicerol em geladeira -80 °C para análises futuras.

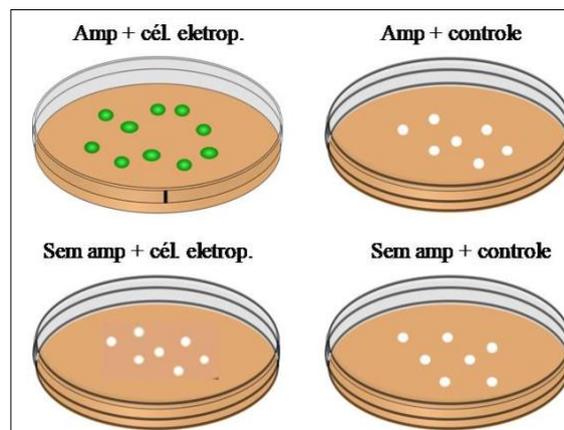


Figura 18. Ilustração do plaqueamento de células eletroporadas.
Fonte: <https://pixabay.com/pt/vectors/placa-de-petri-inocula/>
(com adaptações).

Atlas morfológico de 62 colônias bacterianas identificadas pelo sequenciamento do gene rRNA 16S

| Cód. | Colônia | Gram | Cód. | Colônia | Gram | Cód. | Colônia | Gram |
|------|---------|------|------|---------|------|------|---------|------|
| 76 | | C - | 84 | | B - | 115 | | B - |
| 77 | | B - | 85 | | C - | 116 | | B - |
| 78 | | CB - | 86 | | C - | 117 | | B - |
| 79 | | B - | 87 | | C - | 119 | | C - |
| 80 | | C - | 88 | | C - | 120 | | B - |
| 81 | | B - | 89 | | C - | 136 | | C - |
| 82 | | C - | 107 | | B - | 139 | | B - |
| 83 | | C - | 114 | | C - | 146 | | C - |

Figura 19. Morfologia das bactérias isoladas de ovários de mosquitos selvagens.

| Cód. | Colônia | Gram | Cód. | Colônia | Gram | Cód. | Colônia | Gram |
|------|---------|------|------|---------|------|------|---------|------|
| 90 | | B - | 95 | | B - | 129 | | B - |
| 91 | | B - | 97 | | B - | 140 | | B - |
| 92 | | C - | 98 | | B - | 148 | | B - |
| 93 | | C - | 122 | | B - | | | |

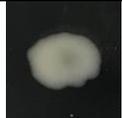
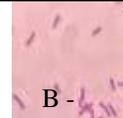
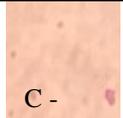
| | | | | | | | | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| 94 |  |  | 123 |  |  | | | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|

Figura 20. Morfologia das bactérias isoladas de ovos de *A. darlingi*.

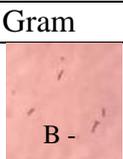
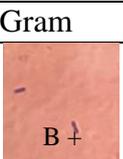
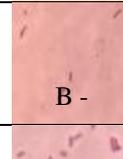
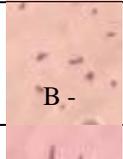
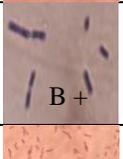
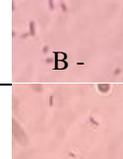
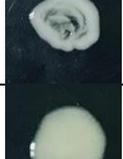
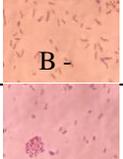
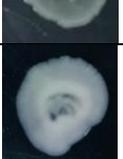
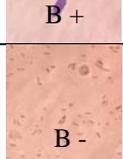
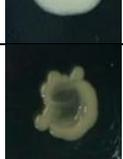
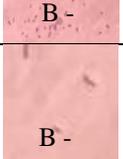
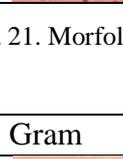
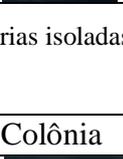
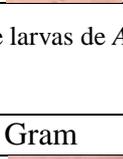
| Cód. | Colônia | Gram | Cód. | Colônia | Gram | Cód. | Colônia | Gram |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 99 |  |  | 105 |  |  | 133 |  |  |
| 100 |  |  | 106 |  |  | 134 |  |  |
| 101 |  |  | 125 |  |  | 137 |  |  |
| 102 |  |  | 131 |  |  | 138 |  |  |
| 103 |  |  | 132 |  |  | 145 |  |  |

Figura 21. Morfologia das bactérias isoladas de larvas de *A. darlingi*.

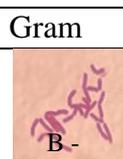
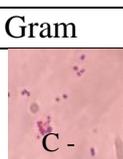
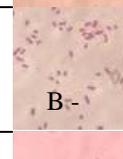
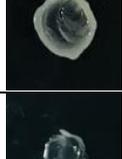
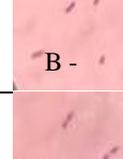
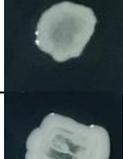
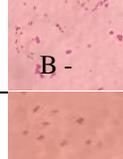
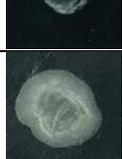
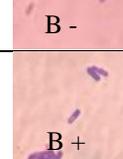
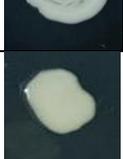
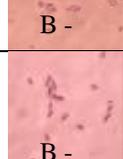
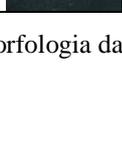
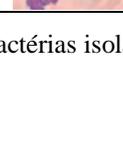
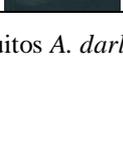
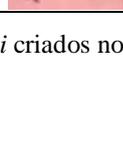
| Cód. | Colônia | Gram | Cód. | Colônia | Gram |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 50 |  |  | 112 |  |  |
| 72 |  |  | 142 |  |  |
| 108 |  |  | 143 |  |  |
| 109 |  |  | 147 |  |  |
| 111 |  |  | 149 |  |  |

Figura 22. Morfologia das bactérias isoladas de mosquitos *A. darlingi* criados no laboratório.

Tabelas das espécies bacterianas identificadas e porcentagem de similaridade

Tabela 2. Espécies bacterianas identificadas dos ovários de mosquitos selvagens.

| ilo | Cód | Espécie | Score | Id. | Cód. acesso do táxon mais relacionado |
|----------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------|-------------|---------------------------------------|
| Proteobacteria | 76 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1836 | 99,6% | NR_117931.1 |
| | 80 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1842 | 99,7% | NR_117931.1 |
| | 82 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1851 | 99,8% | NR_117931.1 |
| | 83 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1849 | 99,8% | NR_117931.1 |
| | 85 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1844 | 99,7% | NR_117931.1 |
| | 86 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1844 | 99,6% | NR_117931.1 |
| | 87 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1845 | 99,8% | NR_117931.1 |
| | 88 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1849 | 99,7% | NR_117931.1 |
| | 89 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1844 | 99,8% | NR_117931.1 |
| | 119 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1842 | 99,6% | NR_117931.1 |
| | 136 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1844 | 99,6% | NR_117931.1 |
| | 146 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1836 | 99,6% | NR_117931.1 |
| | 78 | <i>Acinetobacter seifertii</i> | 1858 | 100% | NR_134684.1 |
| | 81 | <i>Acinetobacter lactucae</i> | 1531 | 99,7% | NR_152004.1 |
| | 114 | <i>Acinetobacter bereziniae</i> | 1869 | 99,9% | NR_117625.1 |
| | 79 | <i>Enterobacter asburiae</i> | 1857 | 99,8% | NR_024640.1 |
| | 77 | <i>Enterobacter asburiae</i> | 1860 | 99,8% | NR_024640.1 |
| | 115 | <i>Stenotrophomonas pavanii</i> | 1840 | 99,3% | NR_118008.1 |
| | 117 | <i>Stenotrophomonas pavanii</i> | 1849 | 99,4% | NR_118008.1 |
| | 116 | <i>Pantoea dispersa</i> | 1825 | 99,2% | NR_116797.1 |
| 120 | <i>Pantoea dispersa</i> | 1847 | 99,3% | NR_116797.1 | |
| 84 | <i>Serratia marcescens</i> | 1838 | 99,5% | NR_114043.1 | |
| 107 | <i>Pseudomonas paralactis</i> | 1851 | 99,7% | NR_156987.1 | |
| 139 | <i>Cupriavidus metallidurans</i> | 1855 | 99,9% | NR_074704.1 | |
| Total | | 24 espécies | | | |

Tabela 3. Bactérias identificadas nas amostras de ovários de *A. darlingi* criados no laboratório.

| Filo | Cód | Espécie | Score | Id. | Cód. acesso do táxon mais relacionado |
|----------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|-------|---------------------------------------|
| Proteobacteria | 50 | <i>Enterobacter ludwigii</i> | 1803 | 99,8% | NR_042349.1 |
| | 143 | <i>Enterobacter asburiae</i> | 1857 | 100% | NR_024640.1 |
| | 108 | <i>Pantoea agglomerans</i> | 1820 | 99,1% | NR_111998.1 |
| | 112 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1842 | 99,7% | NR_117931.1 |
| | 109 | <i>Cupriavidus metallidurans</i> | 1862 | 100% | NR_074704.1 |
| | 149 | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> | 1838 | 99,6% | NR_114226.1 |
| | Bacteroidetes | 72 | <i>Nubsella zeaxanthinifaciens</i> | 745 | 97,2% |
| 142 | | <i>Chryseobacterium arachidis</i> | 1755 | 98,1% | NR_133723.1 |
| 147 | | <i>Elizabethkingia miricola</i> | 1783 | 98,7% | NR_036862.1 |
| Actinobacteria | 111 | <i>Leucobacter iarius</i> | 1742 | 98,2% | NR_042414.1 |
| Total | | 10 espécies | | | |

Tabela 4. Bactérias identificadas em ovos de *A. darlingi*.

| Filo | Cód | Espécie | Score | Id. | Cód. acesso do táxon mais relacionado |
|----------------|-----|------------------------------------------------------|-------|-------|---------------------------------------|
| Proteobacteria | 92 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1847 | 99,8% | NR_117931.1 |
| | 93 | <i>Acinetobacter nosocomialis</i> | 1849 | 99,7% | NR_117931.1 |
| | 98 | <i>Acinetobacter septicus</i> | 1855 | 99,8% | NR_116070.1 |
| | 123 | <i>Acinetobacter bereziniae</i> | 1860 | 99,8% | NR_117625.1 |
| | 90 | <i>Enterobacter tabaci</i> | 1847 | 99,5% | NR_146667.2 |
| | 129 | <i>Enterobacter tabaci</i> | 1847 | 99,5% | NR_146667.2 |
| | 140 | <i>Enterobacter asburiae</i> | 1832 | 99,2% | NR_024640.1 |
| | 148 | <i>Enterobacter hormaechei</i> | 1842 | 99,3% | NR_042154.1 |
| | 91 | <i>Stenotrophomonas pavanii</i> | 1858 | 99,5% | NR_118008.1 |
| | 94 | <i>Stenotrophomonas pavanii</i> | 1849 | 99,4% | NR_118008.1 |
| | 95 | <i>Rhizobium pusense</i> | 1749 | 99,6% | NR_116874.1 |
| | 97 | <i>Serratia marcescens</i> | 1836 | 99,2% | NR_114043.1 |
| | 122 | <i>Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis</i> | 1862 | 99,9% | NR_037084.1 |
| Total | | 13 espécies | | | |

Tabela 5. Bactérias presentes em amostras de larvas de *A. darlingi*.

| Filo | Cód | Espécie | Score | Id. | Cód. acesso do táxon mais relacionado |
|----------------|-----|------------------------------------|-------|-------|---------------------------------------|
| Proteobacteria | 99 | <i>Acinetobacter bereziniae</i> | 1868 | 99,9% | NR_117625.1 |
| | 103 | <i>Acinetobacter modestus</i> | 1860 | 99,9% | NR_148845.1 |
| | 100 | <i>Serratia marcescens</i> | 1829 | 99,4% | NR_114043.1 |
| | 125 | <i>Serratia marcescens</i> | 1847 | 99,5% | NR_114043.1 |
| | 101 | <i>Enterobacter asburiae</i> | 1853 | 99,6% | NR_024640.1 |
| | 105 | <i>Enterobacter tabaci</i> | 1844 | 99,5% | NR_146667.2 |
| Bacteroidetes | 106 | <i>Cedecea lapagei</i> | 737 | 97,2% | NR_126318.1 |
| | 132 | <i>Elizabethkingia miricola</i> | 1766 | 99,5% | NR_036862.1 |
| | 137 | <i>Elizabethkingia miricola</i> | 1801 | 99,2% | NR_036862.1 |
| | 138 | <i>Elizabethkingia miricola</i> | 1814 | 99,3% | NR_036862.1 |
| Actinobacteria | 102 | <i>Chryseobacterium lactis</i> | 1744 | 98,2% | NR_126256.1 |
| | 145 | <i>Sphingobacterium multivorum</i> | 1864 | 99,9% | NR_040953.1 |
| | 131 | <i>Leucobacter iarius</i> | 1746 | 98,3% | NR_042414.1 |
| Firmicutes | 134 | <i>Arthrobacter woluwensis</i> | 1295 | 99,8% | NR_044894.1 |
| | 133 | <i>Bacillus cereus</i> | 1875 | 99,7% | NR_074540.1 |
| Total | | 15 espécies | | | |