

UEA

UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS

**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

LAURA VIANA CORREA

**ESTUDO DO POTENCIAL PARATRANSGÊNICO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS
ASSOCIADAS AO *Anopheles darlingi* ROOT, 1926,
PARA CONTROLE DA MALÁRIA**

MANAUS

2019

LAURA VIANA CORREA

**ESTUDO DO POTENCIAL PARATRANSGÊNICO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS
ASSOCIADAS AO *Anopheles darlingi* ROOT, 1926,
PARA CONTROLE DA MALÁRIA**

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

Orientador: Wanderli Pedro Tadei

MANAUS

2019

LAURA VIANA CORREA

**ESTUDO DO POTENCIAL PARATRANSGÊNICO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS
ASSOCIADAS AO *Anopheles darlingi* ROOT, 1926,
PARA CONTROLE DA MALÁRIA**

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

Data da aprovação: 30/08/2019.

Banca Examinadora:

Dr. Wanderli Pedro Tadei

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Dr. Edson Júnior do Carmo

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dra. Rosemary Aparecida Roque

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

C824e

Correa, Laura Viana

Estudo do potencial paratransgênico de bactérias cultiváveis associadas ao *Anopheles darlingi* Root, 1926, para controle da malária / Laura Viana Correa. Manaus : [s.n], 2019.

1 f.: il.; 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. Malária. 2. Paratransgênese. 3. Bactérias simbiotes. I. Wanderli Pedro Tadei (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Estudo do potencial paratransgênico de bactérias cultiváveis associadas ao *Anopheles darlingi* Root, 1926, para controle da malária

Dedico

À memória de minha mãe e meu pai.

À minha filha Laís Pietra,

meu maior amor.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por estar comigo em todos os momentos, por ouvir minhas preces e me dar forças para seguir em frente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia e Universidade do Estado do Amazonas, pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança depositada em mim.

Aos meus irmãos Romerson, Rodrigo, Ricardo, Valdomira e Ariscila, por sempre me apoiarem e acreditarem no meu potencial e pela ajuda que sempre recebi quando precisei. Sou eternamente grata.

Ao meu esposo Alessandro Gomes Coelho por estar sempre ao meu lado e me compreender mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao meu sogro Pedro Alves e minhas cunhadas Márcia e Mércia pela ajuda, principalmente com a minha filha.

Aos meus tios e primos que sempre me apoiaram, sei que mesmo longe todos torcem muito por mim.

Aos meus amigos Vera, Katak, Juan e Neila, pelo companheirismo, especialmente à Deidre e Elerson pois nós formamos uma equipe muito unida e sempre trabalhamos juntos.

Aos companheiros do Laboratório de Malária e Dengue do INPA, William, Thamiles, Eunice, Augusto, Adriano e Marta, pelo convívio e bons momentos de descontração.

À Rejane por todo auxílio nas coletas, manutenções dos mosquitos e principalmente nas dissecações, juntamente com o apoio dos técnicos do laboratório.

Aos meus colegas de trabalho no Hospital e Pronto Socorro da Criança, especialmente ao seu Eduardo, pela paciência e companheirismo.

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 Doutor Marcos Pessoa pelo apoio financeiro com materias e reagentes, sem esse apoio seria muito difícil concluir o trabalho.

E finalmente a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A malária é uma doença parasitária grave que atinge milhões de pessoas em todo planeta. É causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida aos seres humanos pela picada da fêmea infectada dos mosquitos do gênero *Anopheles*. Embora as estratégias convencionais de controle dos vetores tenham reduzido a carga da doença, por algum tempo, nos últimos anos a malária voltou a crescer, necessitando de métodos mais efetivos para seu controle. Uma alternativa promissora para o controle da malária é a paratransgênese, que utiliza bactérias simbiotes, geneticamente modificadas, para expressar proteínas anti-plasmódio e reinseri-las nos mosquitos para inibir ou matar o *Plasmódio* dentro do vetor. No entanto, para o sucesso dessa alternativa é importante que o candidato adequado possua algumas características indispensáveis, como ser simbiote do vetor, ser cultivável e passível de manipulação genética, permanecer estável após a transformação e ser transferido em todas as fases de desenvolvimento do mosquito. A transmissão transestadial, onde ocorre a transferência do estágio larval para o mosquito adulto, é um critério muito importante para a paratransgênese. Pois é nos estádios imaturos que os mosquitos adquirem a maior parte da sua microbiota bacteriana e o simbiote sobreviver a metamorfose e colonizar o intestino do mosquito médio, onde ocorre os estágio mais vulneráveis de desenvolvimento do *Plasmodium*, seria um forte candidato para uso nesta abordagem. Com isso este trabalho objetivou selecionar bactérias cultiváveis, que apresentam características de transmissão transestadial em *Anopheles darlingi*, principal vetor da malária na região Amazônica, para utilização em futuras abordagens paratransgênicas. Por meio de isolamento bacteriano, caracterização morfológica, identificação molecular pelo gene 16S rRNA de espécies bacterianas associadas a larvas, pupas e adultos de *A. darlingi* e teste de transformação genética para bactérias semelhantes presentes nestes estágios de desenvolvimento. Foram obtidos os seguintes resultados: 166 bactérias foram isoladas e caracterizadas morfológicamente, dentre elas, 72 foram identificadas como pertencentes aos filos Proteobacteria, Firmicutes Actinobacteria e Bacteroidetes. Também foram identificados 20 gêneros, cujos predominantes foram *Bacillus* e *Klebsiella*, destes foram identificadas 38 espécies diferentes, sendo que três espécies se mostram fortes candidatas à paratransgênese, são elas: *Pantoea agglomerans*, *Pantoea dispersa* e *Enterobacter asburiae*. Então foram selecionadas para teste de transformação bacteriana com o plasmídeo pKS1-GFP, sendo a espécie *Pantoea agglomerans* a única passível de transformação genética, então foi monitorada nos estágios de desenvolvimento de *A. darlingi*, apresentando capacidade de transmissão transestadial.

Palavras-Chave: Malária, Bactéria simbiotes, transmissão transestadial e Paratransgese.

ABSTRACT

Malaria is a serious parasitic disease that affects millions of people across the planet. It is caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and transmitted to humans by the bite of the infected female *Anopheles* mosquitoes. Although conventional vector control strategies have reduced the burden of disease, for some time malaria has grown in recent years, requiring more effective methods to control it. A promising alternative for malaria control is paratransgenesis, which uses genetically engineered symbiont bacteria to express anti-plasmodium proteins and reinserted into mosquitoes to inhibit or kill *Plasmodium* within the vector. However, for the success of this alternative it is important that the right candidate has some indispensable characteristics, such as being a symbiote of the vector, being cultivable and susceptible to genetic manipulation, remaining stable after transformation and being transferred at all stages of mosquito development. Transestadial transmission, where the larval stage is transferred to the adult mosquito, is a very important criterion for paratransgenesis. For it is in the immature stages that mosquitoes acquire most of their bacterial microbiota and the symbiote survives metamorphosis and colonizes the midgut, where the most vulnerable stages of *Plasmodium* development occur, would be a strong candidate for use in this approach. Thus, this work aimed to select cultivable bacteria, which present characteristics of trans-state transmission in *Anopheles darlingi*, the main vector of malaria in the Amazon region, for use in future paratransgenic approaches. By bacterial isolation, morphological characterization, molecular identification by the 16S rRNA gene of bacterial species associated with larvae, pupae and adults of *A. darlingi* and genetic transformation test for similar bacteria present in these stages of development. The following results were obtained: 166 bacteria were isolated and characterized morphologically, among them, 72 were identified and belonging to the Phyllobacteria, Firmicutes Actinobacteria and Bacteroidetes. Twenty genera were also identified, predominantly *Bacillus* and *Klebsiella*, from which 38 different species were identified, and three species are strong candidates for paratransgenesis: *Pantoea agglomerans*, *Pantoea dispersa* and *Enterobacter asburiae*. Then they were selected for bacterial transformation test, with plasmid pKS1-GFP, *Pantoea agglomerans* was susceptible of genetic transformation, then it was monitored in the developmental stages of *A. darlingi*, presenting transestadial transmission capacity.

Keywords: Malaria, Symbiont Bacteria, Transstadial Transmission and Paratransgenesis.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO

Tabela 1. Bactérias identificadas em amostras de larvas de mosquitos de laboratório.	58
Tabela 2. Bactérias identificadas em amostras de pupas de mosquitos de laboratório.	59
Tabela 3. Bactérias identificadas em amostras de adultos de mosquitos de laboratório.	60
Tabela 4. Bactérias identificadas em amostras de larvas de mosquitos de campo...	60
Tabela 5. Bactérias identificadas em amostras de pupas de mosquitos de campo. .	61
Tabela 6. Bactérias identificadas em amostras de mosquitos adultos de campo.....	62
Tabela 7. Testes de transformação bacteriana com as três cepas selecionadas.	69
Tabela 8. Prevalência de bactérias <i>P. agglomerans</i> -GFP nos estágios de desenvolvimento de <i>A.darlingi</i>	70

MATERIAL COMPLEMENTAR

Tabela 9. Primers utilizados no estudo	85
Tabela 10. Morfologia das colônias isoladas de larvas	91
Tabela 11. Morfologia das colônias isoladas de Pupas.....	92
Tabela 12. Morfologia das colônias isoladas de Estômagos de adultos	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Status de países com casos de malária em 2017.....	17
Figura 2 Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp.	19
Figura 3. Estágios de desenvolvimento do mosquito <i>Anopheles</i> . A) Ovo; B) Larva; C) Pupa; D) Adulto	21
Figura 4.Regões variáveis e conservadas do gene 16S rRNA, com iniciadores (27F e 1100R)	27
Figura 5. Esquema representativo da paratransgênese.1 Clonagem do plasmídeo com o gene antiparasitário, 2 transformação dos simbiossitos, 3 Inserção das bactérias transformadas no intestino do vetor e 4 Bactérias se multiplicando após uma refeição de sangue e agindo no patógeno.	29
Figura 6. Quantidade de isolados bacterianos de mosquitos oriundos de campo e laboratório.	51
Figura 7. Percentual da morfologia bacteriana de mosquitos provenientes do campo e laboratório.	52
Figura 8. Percentual por Filo identificado em todas as amostras.....	54
Figura 9. Quantidade de gêneros identificados em todas as amostras.....	56
Figura 10. Espécies bacterianas detectadas nas amostras de mosquitos oriundos de laboratório.	64
Figura 11. Espécies bacterianas detectadas nas amostras de mosquitos selvagens.	66
Figura 12. Placa de Petri com colônias de <i>Pseudomonas</i> transformadas, expressando a proteína verde fluorescente e algumas colônias não expressando.....	71
Figura 13. Local de coleta das larvas.....	80
Figura 14. Coletas de larvas e pupas.....	81
Figura 15. Manutenção em condições de laboratório.....	81
Figura 16 A: Plaqueamento das amostras e Figura 16 B: Método de esgotamento por estrias cruzadas	82
Figura 17. Dissecção dos estômagos de <i>A. darlingi</i>	83
Figura 18 A: Purificação das amostras por Estrias Cruzadas e Figura 18 B: Caracterização das colônias isoladas	84
Figura 19. Plasmídeo Pks1-GFP.....	88
Figura 20. Manutenção dos mosquitos no teste de monitoramento	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Epidemiologias da Malária	16
2.2 Agente etiológico e ciclo biológico.....	18
2.3 <i>Anopheles darlingi</i>	20
2.4 Ciclo de vida.....	21
2.5 O Controle da Malária	23
2.6 Associação bacteriana em mosquitos <i>Anopheles</i> spp.	24
2.7 A Identificação molecular de espécies bacterianas	27
2.8 A Paratransgênese.....	28
2.9 Paratransgênese no controle da Malária.....	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO	43
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS	47
Área de estudo e coleta das amostras	47
Triagem, identificação e manutenção das larvas	48
Isolamento bacteriano e caracterização morfológica	48
Extração de DNA genômico, PCR e sequenciamento do gene 16S rDNA	49
Transformação genética bacteriana	49
Teste de monitoramento transestadial de bactérias transformadas	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
Isolamento e caracterização morfológica de espécies bacterianas presentes em larvas, pupas e adultos de <i>A. darlingi</i>	51
Número de cepas bacterianas e filos detectados em todas as amostras.....	53
Gêneros bacterianos detectados em todas as amostras	55
Espécies bacterianas identificadas pelo gene rRNA 16s em todas as amostras e comparadas com o banco de dados NCBI.....	58
Espécies bacterianas com indícios de transmissão transestadial em <i>A. darlingi</i> criados em laboratório.	63
Espécies bacterianas com indícios de transmissão transestadial em <i>A. darlingi</i> criados no campo.....	66
Teste de transformação genética em isolados bacterianos	68
Testes de monitoramento transestadial de <i>P. agglomerans</i> cepa (EP4.4), transformada com o plasmídeo pKS1-GFP em <i>A. darlingi</i>	70
CONCLUSÕES	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS	73
Material complementar	80

1 INTRODUÇÃO

Mosquitos transmissores de doenças como Dengue, Zika, Chikungunya e Malária afetam significativamente grande parte da população mundial. Conhecida também como maleita, paludismo ou impaludismo, a malária, responsável por milhares de mortes, é causada por protozoários do gênero *plasmodium* Machiafava e Celli, 1885, transmitidos ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818, que tem ocorrência global, com preferência nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (FORRANTI, 2002; WHO, 2018).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a malária é endêmica nos estados da Região Amazônica, onde cerca de 99% dos casos são registrados (BRASIL, 2018). O principal transmissor da malária na região é a fêmea infectada do mosquito *Anopheles darlingi*, considerada vetor nessa condição e sua proliferação ocorre devido às condições tropicais da região, a precipitação e os ciclos hidrológicos que propiciam a formação de vários criadouros naturais, em meio à floresta (TADEI et al., 1998, 2010, 2017; WOLFARTH et al., 2013, 2019).

Os sintomas da malária geralmente são: febre, dor de cabeça e calafrios, estes aparecem entre 10 e 15 dias após a picada do mosquito. Em alguns casos os sintomas podem se apresentar de forma mais leve, causando dificuldade na sua identificação, tornando as pessoas infectadas alvos para a contaminação de novos mosquitos, que se tornarão vetores e, conseqüentemente, disseminarão a doença. Em outros casos os sintomas são bastante graves e, quando não tratados podem até levar a óbito (TADEI et al; 2010, 2017; WHO, 2018).

O controle do mosquito vetor da malária tem sido o foco principal nas estratégias de combate à doença, principalmente na utilizando inseticidas químicos. No entanto, esta estratégia possui muitos efeitos colaterais negativos, em particular à saúde dos seres humanos e ao meio ambiente. Além disso, o uso contínuo desses inseticidas, ao longo dos anos, vem aumentando a população de mosquitos anofelinos resistentes a esses compostos (KABULA et al., 2013; DABROWSKI e BALDERACCHI, 2013; WHO, 2018).

A partir dos anos 2000, grandes investimentos foram feitos na tentativa de combater à malária, objetivando o controle e a redução dos números de casos. Até em meados de 2015, essas medidas contribuíram para uma significativa redução da doença, porém, nos anos seguintes a malária voltou a crescer causando grandes

impactos na qualidade de vida das pessoas, em todo o planeta. Tendo em vista os impactos que a malária continua a causar, tornam-se necessário o desenvolvimento de novas ferramentas mais eficientes para o controle da doença (RAMIREZ et.al, 2009; WHO, 2018).

Uma abordagem que vem se mostrando promissora para o controle da malária é a Paratransgênese, onde bactérias simbiotes são geneticamente modificadas para produzir um fator antiparasitário e serem reintroduzidas no intestino de mosquitos selvagens, para bloquear o ciclo dos patógenos dentro do vetor, ou reduzir sua capacidade vetorial (BEARD et al., 2002; FAVIA et al., 2007; COUTINHO-ABREU et al., 2010; WANG e JACOBS-LORENA, 2013).

A utilização de bactérias simbiotes para o controle de doenças transmitidas por insetos vetores vem ganhando destaque pelo fato de a microbiota ser facilmente manipulável em laboratório (WIRTH et al., 1989; DURVASULA et al., 1997; BEARD et al., 2002). Além disso, o uso desses microrganismos recombinantes, voltados para combater a malária, têm mostrado resultados eficientes, como relatado no estudo de Wang et al, (2012), onde comprovaram que a bactéria *Pantoea agglomerans*, isoladas de *A. stephensi* e *A. gambiae*, inibiu o desenvolvimento do parasito *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei*, em até 98%.

Algumas características são importantes para o sucesso da paratransgênese, dentre as quais se destacam que as bactérias devem ser simbiotes do mosquito, apresentar transferência vertical e horizontal, infectar uma parte do corpo do vetor que tenha contato próximo com o patógeno, ser adaptadas às condições imunológicas e fisiológicas do corpo do vetor, além de serem passíveis de manipulação genética (BEARD et al., 2002; FAVIA et al., 2007; LINDH et al,2008).

Outra característica importante para esta nova abordagem é a transmissão transtadial, onde bactérias simbiotes são passadas dos estágios larvais para o mosquito adulto. As larvas de mosquitos absorvem do ambiente aquático grande quantidade de bactérias, no entanto, acredita-se que grande parte dessas bactérias são perdidas no estágio de pupa (MOLL et al., 2001), porém alguns estudos relatam a presença de espécies bacterianas semelhantes em larvas e mosquitos adultos, sugerindo uma possível transmissão transtadial (LINDH et al., 2005; FAVIA et al., 2007; TERENIUS et al., 2008; WANG et al., 2012).

Em um estudo realizado por Chavshin et al., (2015), uma bactéria do gênero *Pseudomonas* foi transformada geneticamente com um plasmídeo endógeno GFP,

em seguida *Pseudomonas*-GFP foi adicionada à água do criadouro das larvas em laboratório. Nesse estudo foi possível observar a presença da bactéria transformada em larvas, pupas e adultos do mosquito *Anopheles stephensi*, demonstrando assim o potencial de transferência transestadial da cepa bacteriana.

A microbiota normal do intestino médio do mosquito *Anopheles darlingi*, principal vetor da malária no Brasil, ainda é pouco conhecida, além disso, poucos estudos foram realizados para verificar a transferência transestadial de bactérias em mosquitos da Região Amazônica. Neste sentido, esse estudo objetivou identificar bactérias cultiváveis que apresentem característica de transferência transestadial entre larvas, pupas e adultos dos mosquitos *Anopheles darlingi* para serem utilizadas no controle da malária por paratransgênese.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologias da Malária

A malária é a doença parasitária mais prevalente no mundo, quase metade da população correm risco de serem infectadas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Figura1). Segundo o último boletim epidemiológico da Organização Mundial da Saúde, 87 países registraram casos da doença, com um total de 219 milhões de casos notificados e cerca de 445.000 óbitos, especialmente no continente africano, que é responsável pela maioria dos casos, correspondendo a 92% dos casos registrados e 93% dos óbitos por malária (WHO, 2018).

Aproximadamente 80% de toda a carga global da malária está concentrada em apenas 15 países do continente africano e na Índia, cinco deles representam quase metade de todos os casos registrados no mundo. O Protozoário *P. falciparum* é o parasita da malária mais prevalente no continente africano, representando 99,7% dos casos notificados de malária em 2017. Os outros continentes também apresentam altos índices de malária causada por *P. falciparum*, exceto o continente americano, onde o parasita predominante é o *P. vivax*, com mais de 74% dos casos de malária (WHO, 2018).

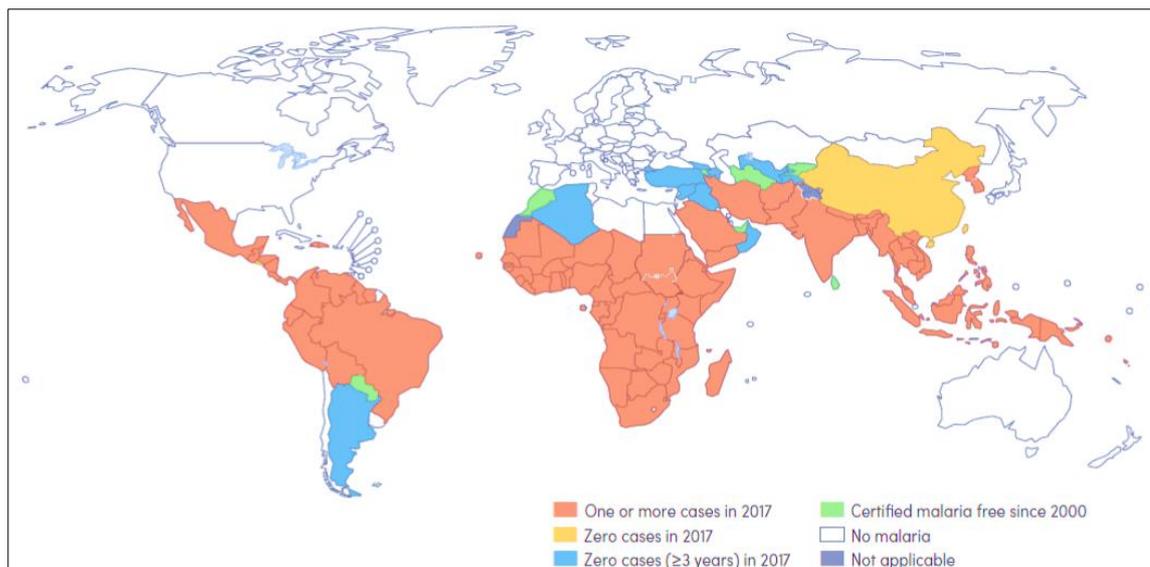


Figura 1. Status de países com casos de malária em 2017.

Fonte: Who, 2018.

No Brasil a malária é endêmica na Região Norte e estima-se que no país houve 218 mil casos de malária em 2017, um aumento significativo de 84% em relação ao ano de 2016. No país, mais de 42 milhões de pessoas estão correndo risco de serem infectadas, devido à facilidade de proliferação de mosquitos anofelinos (TADEI et al., 1998, 2010, 2017; BRASIL, 2018). Desde 2010 a incidência de malária vinha diminuindo, porém nos últimos anos os casos voltaram a crescer consideravelmente no país e de todos os casos registrados 99%, estão concentrados nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, apesar disso, outros estados também já tiveram casos confirmados da doença (BRASIL, 2018).

Na Região Amazônica foram notificados mais de 193 mil casos em 2018, quantidade muito semelhante aos do ano anterior e houve um aumento de 51 % em relação ao ano de 2016. O Amazonas é o Estado com maior notificação de casos de malária, no mesmo ano foram notificados 81.294 casos da doença, o que representa 42% do total de casos notificados na Região (BRASIL, 2018).

Alguns fatores dificultam o controle da malária na região como: a grande urbanização, o fluxo migratório de pessoas e fatores ambientais, além disso a expansão de parasitos resistentes aos medicamentos antimaláricos e o crescimento de certas populações de mosquitos resistentes também constituem grandes desafios para o controle da doença no país (TADEI et al., 2010; KABULA et al., 2013; FERREIRA e CASTRO, 2016).

Especialmente na Amazônia, a malária tem grande importância epidemiológica, devido a sua elevada incidência e potencial gravidade clínica. Pode causar consideráveis perdas sociais e econômicas na população em risco, principalmente, aquelas que vivem em condições mais precárias de habitação e saneamento básico (BRASIL, 2018).

2.2 Agente etiológico e ciclo biológico

A malária é causada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Em humanos, cinco espécies são capazes de causar a doença são elas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. Knowlesi*. As espécies que mais ocorrem no mundo são *P. falciparum* e *P. vivax* e no Brasil três espécies de *Plasmodium* são prevalentes, sendo *P. vivax* a espécie mais predominante com 83,81% dos casos, sendo esta espécie responsável por complicações clínicas graves e óbito (ALEXANDRE et al., 2010; COSTA et al., 2012; LACERDA et al., 2012; WHO, 2018).

O ciclo de vida dos plasmódios ocorre em duas etapas distintas, uma sexuada que ocorre na fêmea do mosquito *Anopheles*, a outra assexuada que ocorre em um hospedeiro vertebrado, podendo ser os seres humanos (Figura 2). O ciclo assexuado do plasmódio, denominado esquizogônico, inicia-se após a picada do mosquito anofelino, com a inoculação de cerca de 100 esporozoítos infectantes na pele. Em seguida os esporozoítos circulam na corrente sanguínea durante alguns minutos e, imediatamente, penetra nos hepatócitos e dão início ao ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual. No interior dos hepatócitos ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo, e os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos. Em seguida, após sucessivas divisões celulares chamadas esquizogonia, ocorre a formação dos esquizontes (REY, 2008; FERREIRA et al., 2003; HOLZ et al., 2016).

Os esquizontes maduros liberam os merozoítos diretamente na corrente sanguínea por meio de brotamento de vesículas, denominadas merossomos (STURM et al., 2006). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* uma parte desses parasitos podem permanecer em estado de latência no fígado, que é responsável pelos casos de recaídas (KROTOSKI, 1985; MUELLER et al., 2009). Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos por meio de interações específicas

entre as proteínas dos parasitos e receptores presentes na superfície dos eritrócitos, enquanto os merozoítos de *P. falciparum* são capazes de invadir os eritrócitos por diversas vias de invasão (PETTER e DUFFY, 2015).

Concluído o processo de invasão, o parasito se replica dentro dos eritrócitos e ocasiona a ruptura dessas células liberando milhares de novos merozoítos na corrente sanguínea que irão infectar novos eritrócitos. Nessa fase do ciclo, as moléculas geradas pelo parasito e a lise das hemácias ocasionam os sintomas clínicos observados na infecção malárica, como febre, dor de cabeça, calafrios, náusea e fraqueza. (MILLER et al., 1976; ADAMS et al., 1992).

Ainda na fase eritrocítica, após sucessivas replicações nas hemácias, ocorre o desenvolvimento de formas sexuadas, os gametócitos femininos e masculinos, ao quais são as formas infectantes para o mosquito vetor (SINDEN, 1983). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito vetor ingere os gametócitos femininos e masculinos que amadurecem no intestino médio, fecundam-se formando um zigoto diplóide. Posteriormente, há o desenvolvimento em oocinetos móveis e oocistos, que amadurecem e liberam esporozoítos infecciosos, que migram para as glândulas salivares, maturam-se na forma de esporozoítos infectantes e, estão prontos para serem transmitidos para o hospedeiro vertebrado, completando assim o ciclo de vida dos plasmódios (CROMPTON et al., 2014; MEIBALAN e MARTI, 2016).

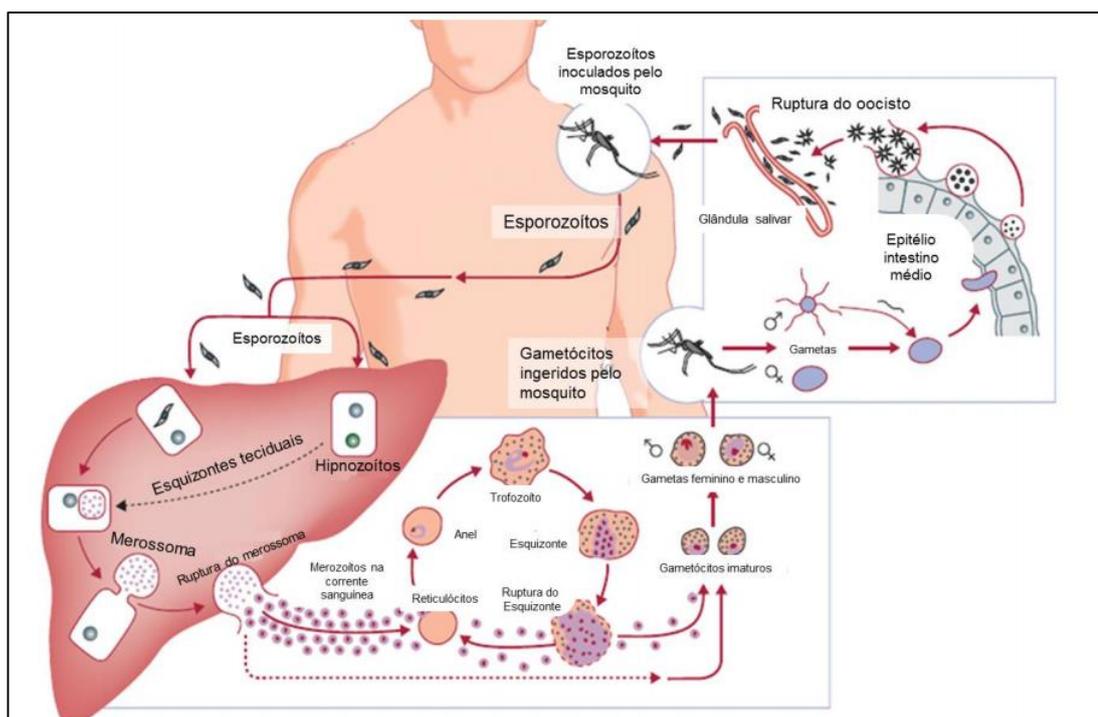


Figura 2 Ciclo de vida do *Plasmodium* spp.

Fonte: MUELLER et al., 2009, com adaptações

2.3 *Anopheles darlingi*

Existem mais de 450 espécies diferentes de mosquitos anofelinos no mundo, 54 delas são encontradas no Brasil e 30 dessas espécies são importantes vetores da malária (DEANE, 1986; TADEI e THATCHER, 2000). Todas as espécies com maior importância picam ao anoitecer e ao amanhecer e a intensidade da transmissão depende de fatores relacionados ao parasito, ao vetor, e ao hospedeiro humano, além do ambiente (DEANE, 1986; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

O mosquito *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 é um importante vetor de malária humana nas Américas do Sul e Central, sendo que no Brasil, ele é responsável por praticamente toda a transmissão da doença na região Norte do país (DEANE, 1986; RUBIO-PALIS e ZIMMERMAN, 1997; TADEI et al., 1998).

Esta espécie está classificada na ordem Díptera, família Culicidae, gênero *Anopheles*, Subgênero *Nyssorhynchus*. É altamente susceptível aos plasmódios e capaz de transmitir malária dentro e fora das residências, mesmo quando sua densidade está baixa. (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; DEANE, 1986). Apenas poucos mosquitos *A. darlingi* são necessários para manter a malária circulando em uma população, pois este vetor é muito eficiente na transmissão de *P. vivax* e *P. falciparum* (TADEI e THATCHER, 2000).

É considerada a espécie mais antropofílica e endofágica em relação aos outros anofelinos das Américas (ARRUDA et al., 1986; TADEI et al., 1988; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 1989; FORATTINI, 2002). Vários autores destacaram a variabilidade de seu comportamento, possivelmente resultante da sua ampla distribuição geográfica (CHARLWOOD E HAYES, 1978; TADEI et al., 1988, 1993).

Quanto à distribuição geográfica, *A. darlingi* está presente em quase todo o território nacional, possui ampla distribuição territorial, estendendo-se desde o sul do México até o norte da Argentina, e das vertentes orientais da Cordilheira dos Andes até as margens do Oceano Atlântico (FORATTINI, 2002). O mosquito é encontrado em áreas de baixas altitudes, quase sempre associado aos grandes cursos d'água e florestas do interior, mas também ocorrem no litoral (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994) É um mosquito que se adapta facilmente e se beneficia das modificações antrópicas dos ambientes silvestres (TADEI et al., 2002, 2010, 2017).

Na Amazônia, a densidade populacional de *A. darlingi* está relacionada ao ciclo hidrológico da região (GIROD et al., 2011; HIWAT e BRETAS, 2011;

WOLFARTH et al., 2013; MUSSET et al., 2014). Este fenômeno anual influencia a sazonalidade das espécies, o que leva a um aumento nos locais de reprodução e intensifica o contato entre humano e o mosquito vetor e, portanto, maior ocorrência de casos de malária. Assim, a densidade de anofelinos é baixa no início da estação chuvosa em novembro e aumenta em abril e junho, em simultâneo com o aumento gradual da precipitação e dos níveis dos rios (TADEI et al., 2002, 2010, 2017).

2.4 Ciclo de vida

Os Anofelinos são insetos holometábolos, passam por quatro estágios de desenvolvimento sendo eles: ovo, larva, pupa e adultos (Figura 3). As fases de ovo, larva e pupa, o desenvolvimento ocorre em ambiente aquático podendo ser em criadouros naturais e artificiais, permanentes ou temporários de variadas qualidades, volumes e tamanhos, após a fase de pupa os anofelinos emergem em adultos (TADEI, 1993; CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; TADEI et al., 1998; ARCOS et al., 2018).

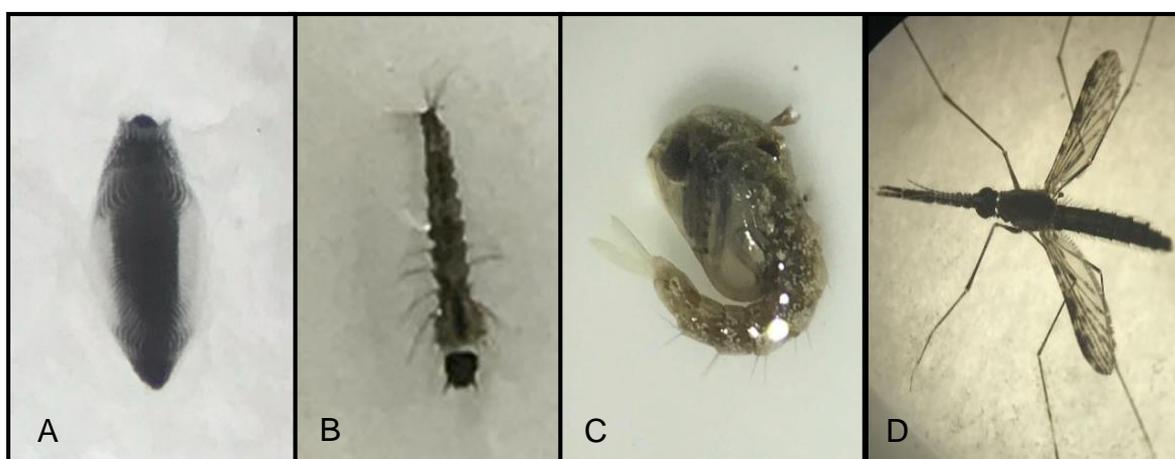


Figura 3. Estágios de desenvolvimento do mosquito *Anopheles*. A) Ovo; B) Larva; C) Pupa; D) Adulto

Fonte: Acervo do autor

Os ovos dos anofelinos são postos pelas fêmeas na superfície da água, tem um aspecto alongado, simetria bilateral e apresentam flutuadores laterais, o que permite sua flutuação. O ovo passa para o estágio larval dentro de 2 a 3 dias podendo se estender a semanas se o clima não for favorável não sobrevive em baixas temperaturas e ambientes com pouca umidade (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

As larvas possuem o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômem, apresentando abdômem com a forma semicilíndrica com oito segmentos na sua parte dorsal do corpo, onde está localizada a placa respiratória, esta estrutura faz com que as larvas fiquem aderidas no espelho d'água e podem auxiliar na sua identificação. As larvas passam por quatro instares de desenvolvimento e são necessários de sete a dez dias para o seu desenvolvimento, podendo variar de acordo com fatores ambientais (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

Diferente de outros culicídeos, as larvas de mosquitos *Anopheles* não possuem sifão respiratório e na região dorsal elas apresentam um aparelho espiracular, responsável pela respiração, nas fases imaturas desse mosquito. Desta forma quando estão em repouso permanecem de forma paralela à superfície da água. Elas se alimentam de microrganismos presentes em seus criadouros que podem ser algas, bactérias, protozoários, esporos de fungos ou quaisquer partículas de matéria orgânica, sendo as bactérias a principal forma de alimentação (FORATTINI, 1996, 2002).

A fase de pupa é caracterizada quando as larvas de quarto instar adquirem o formato de vírgula, ficam constantemente na superfície da água para respirarem por meio das trombetas respiratórias e passam a não se alimentar por um período de um a três dias, quando emergem em adultos. Os mosquitos machos emergem primeiro que as fêmeas e o tamanho entre fêmea e macho é perceptível, sendo que as pupas machos são menores que as fêmeas (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1973, 2002).

Nos adultos o corpo é dividido em cabeça, tórax e abdômem. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como olhos compostos, antenas, palpos e o aparelho bucal tipo picador. No tórax estão as pernas, duas anteriores, duas médias e duas posteriores, além de duas asas. O abdômem abriga a maior parte dos órgãos internos, como o aparelho reprodutor, digestivo e excretor (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Os mosquitos machos como as fêmeas alimentam-se de néctares e frutos danificados para obter energia. Entretanto, apenas as fêmeas são hematófagas. Após o acasalamento, elas procuram uma refeição de sangue animal para fornecer proteínas que auxiliam na maturação dos ovários e desenvolvimento dos ovos (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

2.5 O Controle da Malária

Desde a descoberta que os mosquitos são os vetores da malária, várias estratégias foram implementadas para tentar reduzir a capacidade vetorial desses mosquitos, entre elas a gestão ambiental, onde o controle consistia na manipulação das habitações e mudanças no comportamento humano, além de drenagem de alguns locais de reprodução desses mosquitos. Entretanto esta estratégia se tornou inviável em algumas situações, pois podia afetar significativamente a biodiversidade e os esforços de conservação ambiental (WALKER e LYNCH, 2007).

Algumas alternativas também foram bastante utilizadas para tentar combater vetores da malária, como por exemplo, controle biológico de larvas com uso de peixes larvívoros da espécie *Gambusia affinis*, porém esta espécie causou grande impacto na fauna local e prejuízos ambientais, sendo necessário posteriormente substituir a espécie por peixes nativos e com isso obtiveram um sucesso relativo no controle dos estágios larvais do mosquito (DAS e AMALRAJ, 1997).

O uso de metabólitos microbianos produzidos por *Bacillus thuringiensis israelensis* e *B. sphaericus* são outras alternativas ambientalmente amigáveis, pois as toxinas produzidas por eles não são tóxicas para outras espécies e também não persistem por um longo período de tempo no ambiente. Em alguns países o uso desses produtos teve bastante eficácia no combate às larvas, tornando-se um método viável, porém, esses resultados variavam muito de acordo com a região (FILLINGER et al., 2003; WALKER e LYNCH, 2007).

Outro tipo de abordagem microbiana geralmente usada contra pragas agrícolas, e também sendo testado contra mosquitos adultos, é o uso de fungos entomopatogênicos. Essa estratégia envolve pulverizar os locais de repouso dos mosquitos com uma suspensão de esporos fúngicos. Estudos laboratoriais e de campo identificaram duas espécies de fungos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, eficazes contra o mosquito *A. gambiae* (SCHOLTE et al., 2004).

Embora os dados atuais demonstrem que essa abordagem fúngica tenha potencial para reduzir a transmissão de parasitas, existem várias barreiras que precisam ser avaliadas antes de sua ampla aplicação. Esses obstáculos incluem a viabilidade dos esporos fúngicos, a especificidade dos fungos e o aumento de populações resistentes de mosquitos (SCHOLTE et al., 2004).

Com a descoberta do DDT (diclorodifeniltricloroetano) em meados de 1940, o foco das estratégias de controle se tornou às populações adultas dos mosquitos. Os excelentes resultados obtidos no controle de outras doenças transmitidas por vetores e, em particular a redução de vetores de mosquitos nos EUA, no sul da Europa, na antiga União Soviética e em partes da África do Sul, criaram uma falsa impressão de que a malária poderia ser erradicada do planeta. O mesmo demonstrou ser eficaz no controle de inúmeros insetos, incluindo os mosquitos vetores de doenças (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994).

No entanto, o uso indiscriminado 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 ao meio ambiente (WILKE e MARRELLI, 2012). Além disso, a constante exposição a estes compostos foi gradativamente selecionando e aumentando a população de certas espécies de mosquitos que já eram naturalmente resistentes. Na continuidade das aplicações, com o passar das décadas, foi constatada a diminuição considerável da eficiência desse produto (ABDUL-GHANI et al., 2012).

Estratégias baseadas na manipulação de microrganismos estão ganhando força como um meio alternativo para controlar doenças transmitidas por vetores, pois os microrganismos possuem várias propriedades desejáveis para a aplicação de estratégias de controle, particularmente, a capacidade de disseminação através de populações vetoriais, a capacidade de transformação genética, dentre outras que são favoráveis para o uso no controle de doenças vetoriais (SALDAÑA et al., 2017).

A paratransgênese vem se mostrando como uma alternativa viável para o controle da malária. Nesta abordagem, microrganismos simbiotes são geneticamente modificados para expressar produtos antiparasitários e serem reinseridas no intestino dos mosquitos vetores da malária para inibir ou matar os plasmódios nos estágios mais vulneráveis de seu desenvolvimento, (BEARD et al., 2002; FAVIA et al., 2009; COUTINHO - ABREU et al., 2010; WANG et al., 2012).

2.6 Associação bacteriana em mosquitos *Anopheles* spp.

As bactérias são microrganismos procariontes bastante simples quanto sua estrutura, porém complexos do ponto de vista bioquímico e metabólico. Habitam os

mais diferentes ambientes, sendo assim consideradas cosmopolitas, contribuindo para reciclagem de compostos orgânicos, são consideradas como parte chave na maioria dos ecossistemas naturais e são encontradas na natureza em formas de cocos, bacilos, espirilos, vibriões entre outros (CARVALHO, 2008).

Estudos relatam que insetos abrigam um grande número de microrganismos bacterianos simbiotes, vivendo no trato intestinal de larvas e de adultos, onde apresentam impactos significativos em sua fisiologia. Alguns exibem uma ampla gama de graus de dependência de bactérias intestinais para funções básicas (ENGEL e MORAN, 2013).

Uma grande quantidade de microrganismos pode ser encontrada nas superfícies e dentro do corpo de mosquitos, no entanto a composição da microbiota bacteriana de um hospedeiro pode ser influenciada pela fase de desenvolvimento, aptidão, sexo, propriedades físico-químicas, hábitos alimentares, hábitat, competição bacteriana, dentre outros (DOUGLAS, 2011; GENDRIN e CHRISTOPHIDES, 2013; MINARD et al., 2013).

O intestino de mosquitos apresenta-se como um ambiente propício para a colonização microbiana que podem fornecer muitos benefícios ao hospedeiro, como nutrição, proteção contra parasitas e patógenos, modulação das respostas imunológicas (LINDH et al., 2005; ITURBE-ORMAETXE et al., 2011; CONTI et al., 2012; CHAVSHIN et al., 2012).

Entre os organismos, ocorrem inúmeras interações 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 descrita como uma relação interespecífica, harmônica e estável, em geral de longa duração, frequentemente encontrada nas comunidades terrestres e aquáticas. Exercendo um papel fundamental no surgimento das principais formas de vida na Terra e na geração de uma ampla diversidade biológica (MORAN, 2006).

Bactérias encontradas em mosquitos de campo mostram que os fatores ambientais devem ser considerados como fatores importantes que afetam a carga e composição da microbiota bacteriana em mosquitos (MINARD et al., 2013). Apesar de se conhecer a existência de elevado número de bactérias associadas a mosquitos, a relação de transferências horizontal, vertical e transestadial em mosquitos, sobre tudo em *A. darlingi* ainda são pouco claras (GENDRIN e CHRISTOPHIDES, 2013).

Em um estudo realizado por Damiani et al., (2008), onde examinaram intestinos e de glândulas salivares de *A. stephensi*, detectaram uma bactéria do gênero *Asaia*, que em seguida foi marcada com plasmídeo GFP e após serem monitoradas em experimentos de laboratório, nos diferentes estágios de desenvolvimento, foi sugerido que a cepa é transferida transestadialmente no mosquito.

Estudos também revelam a influência da microbiota intestinal do vetor no desenvolvimento do ciclo de vida dos parasitos. Em mosquitos, as pesquisas vêm relatando que infecções por bactérias do intestino podem retardar ou inibir o desenvolvimento esporogônico dos parasitas da malária (PUMPUNI et al., 1993; 1996; GONZALEZ-CERON et al., 2003; DONG et al., 2009; CIRIMOTICH et al., 2011).

Outro estudo realizado por Cirimotich et al., (2011), sugeriram que a presença de espécies do gênero *Enterobacter*, no intestino do *A. arabiensis*, originados de uma população de Zâmbia agem diretamente no *P. falciparum*, bloqueando o desenvolvimento do parasito, tornando essa população de mosquitos refratários à infecção. Essa refratariedade foi associada à geração de espécies reativas de oxigênio que interferem com o desenvolvimento do parasito e o mata antes da sua invasão no epitélio intestinal.

Outros estudos sugerem que bactérias no lúmen do intestino modificam o ambiente intestinal e inibem o desenvolvimento de parasitas pela ação do sistema imune por meio da expressão de genes de imunidade ajudando no aumento da taxa de produção de peptídeos antimicrobianos (PUMPUNI et al., 1996; MICHEL e KAFATOS, 2005). Esses peptídeos provavelmente possuem um papel chave não somente no controle de bactérias patogênicas ou simbiotes, mas também no desenvolvimento de infecções por parasitos (BEARD et al., 2001; BOULANGER et al., 2004).

É possível que o sistema imune dos mosquitos aja contra a proliferação de bactérias e também elimina um grande número de parasitos, modulando a intensidade da infecção no mosquito quando infectados por plasmódios, tais características que bactérias simbiotes de insetos vetores apresenta, estão despertando o interesse para novas medidas de controle biológico molecular para doenças vetoriais, entre elas a malária (MEISTER et al., 2009; GONZALES-CERON et al., 2003; CIRIMOTICH et al., 2011).

2.7 A Identificação molecular de espécies bacterianas

Com o advento da biologia molecular, a identificação de espécies bacterianas tornou-se facilitada e mesmo com inúmeras tecnologias avançadas no processo a análise de amplificação do gene de rRNA 16S é a mais comum para a investigação da diversidade de bactérias cultiváveis e não cultiváveis (WANG e QIAN, 2009; YANG et al., 2016).

Os primeiros relatos do uso do gene rRNA 16S para analisar a filogenia de espécies bacterianas foi em 1985 (LANE et al., 1985), como este gene contém regiões altamente conservadas para o projeção de primers e regiões hipervariáveis para identificar características filogenéticas de microrganismos, a sequência do gene 16S rDNA se tornou o gene marcador mais amplamente utilizado para o perfil de comunidades bacterianas (TRINGE e HUGENHOLTZ, 2008).

O seguimento gênico rRNA 16S para identificação de bactérias é extremamente confiável pois possui fundamentos científicos comprovados. Este seguimento é constituído de 1.500 pb e são divididas em 9 regiões (V1 – V9), (Figura 4) tendo como modelo universal o 16S rRNA da bactéria *Escherichia coli* (COENYE et al., 2005; KLINDWORTH et al., 2013; YANG et al., 2016).

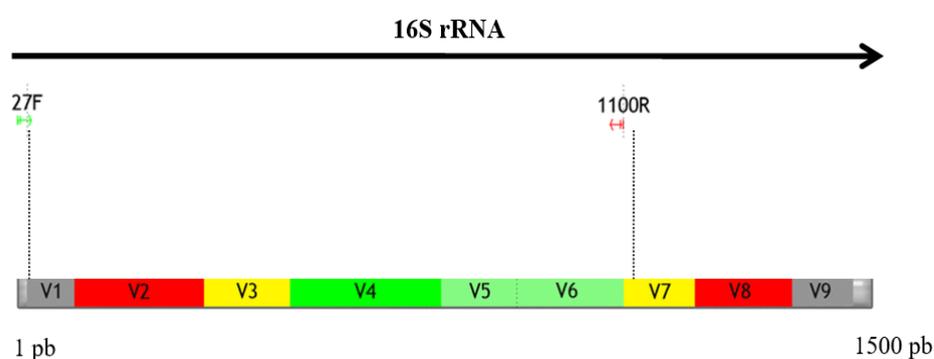


Figura 4. Regiões variáveis e conservadas do gene 16S rRNA, com iniciadores (27F e 1100R)

Fonte: YANG et al., (2016), com modificações.

Estas nove regiões do gene servem de alvo para o anelamento dos Primers (oligonucleotídeos), estes guiam a enzima DNA polimerase no processo de amplificação gênica denominado PCR, sigla inglesa para o termo Polymerase Chain Reaction. O tamanho de 1500 pares de bases do gene facilitam as análises por bioinformática. Desde a descoberta do gene rRNA 16s, inúmeras sequências de

bactérias já foram identificadas e encontram-se depositadas em bancos de dados como o Center for Biotechnology Information, NCBI (PATEL, 2001; JANDA-ABBOTT, 2007; YANG et al., 2016).

As análises das sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA constituem-se de um processamento analítico, cuja função envolve a exclusão de fragmentos ou bases nitrogenadas duvidosas detectadas nos eletroferogramas, obtidos das plataformas de sequenciamento de DNA e alinhamentos das duas fitas, oriundas dos Primers F e R, utilizados na PCR, para que gerem uma fita consenso. É esta fita que deverá ser comparada aos bancos de dados bacterianos disponíveis, como o GeneBank, utilizando a ferramenta BLAST do NCBI (KLINDWORTH et al., 2013).

A identificação molecular bacteriana abriu o caminho para utilização de microrganismos com diferentes finalidades, como por exemplo o controle biológico de mosquitos vetores de doenças pela ação dos microrganismos geneticamente modificados.

2.8 A Paratransgênese

A paratransgênese é uma alternativa de controle biológico por métodos moleculares, que está sendo direcionada para controle de doenças vetoriais e vem ganhando destaque, pois seus estudos mostraram resultados bastante promissores (DURVASULA et al., 1997; BEARD et al., 2002; REN et al., 2008; COUTINHO-ABREU et al., 2010). Esta técnica se baseia na utilização de microrganismos simbiotes desses vetores de doenças, onde, por meio da engenharia genética esses simbiotes são transformados com gene efetor anti parasitário e reintroduzidos dentro do vetor para bloquear ou inibir o desenvolvimento dos patógenos (Figura 5) (DURVASULA et al., 1997; BEARD et al., 2002, FAVIA et al., 2007).

Os primeiros relatos desta técnica voltados para controle de doenças causadas por vetores foi com o vetor da doença de Chagas *Rhodnius prolixus*, no qual utilizaram uma bactéria simbiote desse vetor *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. Ainda neste estudo, foi desenvolvido um método para dispersão dessa bactéria modificada, em populações naturais do inseto, por meio da contaminação das fezes, devido ao comportamento alimentar da espécie (DURVASULA et al., 1997).

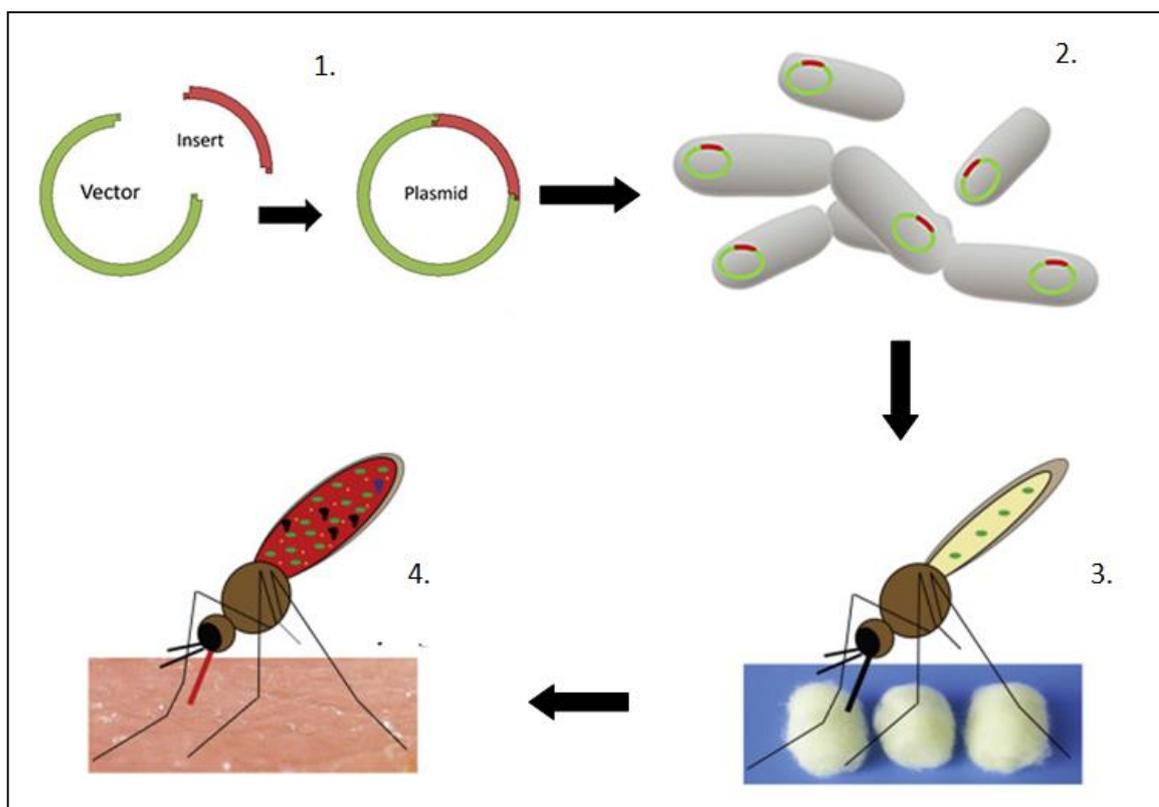


Figura 5. Esquema representativo da paratransgênese. 1 Clonagem do plasmídeo com o gene antiparasitário, 2 transformação dos simbiosomas, 3 Inoculação das bactérias transformadas no intestino do vetor e 4 Bactérias se multiplicando após uma refeição de sangue e agindo no patógeno.

Fonte: WANG et al., 2017, com adaptações.

Devido ao avanço de estudos relacionados à paratransgênese, diferentes microrganismos vêm sendo estudados nessa abordagem (DURVASULA et al., 1997; REN et al., 2008; FANG et al., 2011). As bactérias são os microrganismos que mais amplamente têm se destacado, acredita-se que pelo fato de serem facilmente cultiváveis e manipuláveis em laboratório. Algumas bactérias já foram transformadas com genes anti-*plasmodium* e o resultado se mostrou eficiente em tornar os mosquitos anofelinos refratários à transmissão da malária (WIRTH et al., 1989; BEARD et al., 2002; CAPONE et al., 2013).

O sucesso da paratransgênese requer que essas bactérias possuam algumas características fundamentais, Beard et al., (2002) citam algumas características indispensáveis como:

1. Possuir uma relação simbiótica entre esses microrganismos e o vetor transmissor da doença;
2. Os simbioss bacterianos devem ser cultiváveis e passíveis de manipulação genética e após a transformação permanecerem estáveis no corpo do vetor;
3. As funções simbióticas devem permanecer inalteradas.
4. Os produtos produzidos por essas bactérias devem interagir efetivamente com o patógeno alvo, também são características essenciais.

Além disso, essas bactérias também devem possuir outras características como a transmissão horizontal, vertical e transtadial.

Um desafio que pesquisadores vêm encontrando é como dispersar esses microrganismos para infectarem os vetores de doenças. Em laboratório alguns mecanismos de dispersão obtiveram sucesso, como no estudo de Wang et al., (2012), onde, por meio de solução açucarada entregaram as bactérias recombinantes nos intestinos dos mosquitos *Anopheles gambiae* e *Anopheles stephensi*, no entanto é necessário verificar a dispersão desses microrganismos geneticamente modificados em ambientes selvagens.

2.9 Paratransgênese no controle da Malária

A utilização da paratransgênese para o controle do vetor da malária tem como principal objetivo, modificar geneticamente bactérias simbioss de mosquitos *Anopheles* vetores da malária em humanos, reintroduzi-las nos intestinos dos vetores para que possam inibir o desenvolvimento ou matar os plasmódios (BEARD et al., 2002; AKSOY et al., 2008; COUTINHO - ABREU et al., 2010).

O primeiro estudo com bactérias simbioss, objetivando o controle da malária, utilizando a técnica de paratransgênese foi realizado por Yoshida et al., (2001), onde utilizaram uma bactéria recombinante de laboratório *Escherichia coli*, que expressava uma imunotoxina de cadeia única (scFv) e que inibiu em pelo menos 93% o desenvolvimento de *P. berghei*, no intestino médio dos mosquitos (YOSHIDA et al., 2001). Em outro estudo com *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).

Os resultados expressivos destes trabalhos tiveram um fator limitante para o sucesso da paratransgênese no controle da malária. Embora as cepas de *E. coli* serem facilmente manipuladas em laboratório, não são caracterizadas como simbioses de mosquitos anofelinos e portanto não suportam as mudanças que ocorrem durante o ciclo de vida e conseqüentemente não conseguem perpetuar os genes anti-*Plasmodium*, nas gerações dos mosquitos na natureza. (YOSHIDA et al., 2001; RIEHLE et al., 2007).

A bactéria *Pantoea agglomerans*, caracterizada como simbiote de mosquitos do gênero *Anopheles*, mostrou-se eficiente em secretar moléculas Anti-*Plasmodium* (BISI e LAMPE, 2011). Em um estudo realizado por Wang et al., (2012), *P. agglomerans* modificada com genes anti-*Plasmodium* e reintroduzida no intestino médio do mosquito *A. gambiae*, principal vetor da malária na África, reduziu em até 98% o número de oocistos de *P. falciparum* na parede do estômago do mosquito. Além disso, essa bactéria permaneceu nas gerações seguintes dos mosquitos, bem como se mostrou eficiente em secretar as proteínas de interesse, tornando-se uma forte candidata à paratransgênese.

Em outro trabalho, também realizado por Wang e et al., (2017), foi construído um sistema de secreção em *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, além disso essa cepa colonizou estavelmente o intestino médio, ovários e glândulas acessórias masculinas de *A. stephensi*.

Na tentativa de encontrar potenciais candidatos à paratransgênese para o controle da malária, vários autores isolaram bactérias de diferentes partes de mosquitos *Anopheles* spp. (BRIONES et al., 2008; DAMIANI et al., 2008, 2010; DJADID et al., 2011; CHAVSHIN et al., 2012, 2015; GIMONNEAU et al., 2014). Algumas dessas bactérias se mostram fortes candidatas, apresentando características importantes para a paratransgênese, uma delas a transmissão transestadial, onde bactérias são passadas dos estágios larvais aquático, para o mosquito adulto com asas (CHAVSHIN et al., 2012).

Em trabalhos científicos utilizando larvas e adultos de *A. stephensi* foi detectado com predominância bactérias do gênero *Pseudomonas* a qual foi sugerido uma possível transmissão transestadial nos mosquitos. Absorvidas da água pelas larvas, as bactérias simbiontes podem sobreviver por toda metamorfose dos mosquitos, assim oferecendo capacidades essenciais à paratransgênese (CHAVSHIN et al., 2012; MANCINI et al., 2016; WANG et al., 2017).

O progresso da paratransgênese no controle da malária já é uma realidade, porém esforços estão direcionados principalmente aos parasitas e vetores ocorrentes no continente africano, o que deixa outras regiões do mundo de fora dessa ação, sobretudo Amazônia Brasileira. Considerando essa região do Brasil, no contexto de biodiversidade microbiana, é de se esperar que exista muitas bactérias simbiontes de *A. darlingi* e que ainda são desconhecidas pela comunidade científica e que podem ser utilizadas no controle de *Plasmodium vivax*, por meio da paratransgênese.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar bactérias cultiváveis que apresentem características de transmissão transestadial em larvas, pupas e adultos de *Anopheles darlingi*, para o controle da malária por paratransgênese.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar bactérias cultiváveis de larvas, pupas e estômagos de mosquitos adultos 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 transestadial em *A. darlingi* e transforma-las com o plasmídeo pKS1-GFP para testes de monitoramento;
- Realizar testes de monitoramento das cepas transformadas com o plasmídeo pKS1-GFP durante os estágios de desenvolvimento de *A. darlingi*.

4 REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, R.; AL-MEKHLAFIB, A.M.; ALABSID, M. S. **Microbial control of malaria: Biological warfare against the parasite and its vector.** ActaTropica. v. 121, p. 71-84, 2012.
- ADAMS, J. H.; SIM, B. K.; DOLAN, S. A.; FANG, X.; KASLOW, D.C.; MILLER, L. H. **A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 89(15), p. 7085-7089, 1992.
- ALEXANDRE, M. A.; FERREIRA, C. O.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L.; MOURÃO, M. P.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. **Severe plasmodium vivax malaria, brazilian amazon,** Emerg Infect Dis, v.16, p.1611-1614, 2010.
- ARCOS, A. N.; SILVA, F. A.; FERREIRA, CUNHA, H. B.; TADEI, W. P. **Characterization of artificial larval habitats of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in the Brazilian Central Amazon.** Revista Brasileira de Entomologia, v. 62, p. 267-274, 2018.
- ARRUDA, M.; CARVALHO, M. B.; NUSSCENZWEIG, R. S.; MARACIC, M.; FERREIRA, A. W.; COCHRANE, A. H. **Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay.** Am. J. Prop. Med. Hyg, v. 35, p. 873-881, 1986.
- 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.
- BEARD, C.B.; DOTSONA, E. M.; PENNINGTONA, P. M.; EICHLERA, S.; CORDON-ROSALES, C.; DURVASULA, R.V. **Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease.** International Journal for Parasitology v. 31, p. 621-627,(2001)
- 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.
- BOULANGER, N.; LOWENBERGER, C.; VOLF, P.; SIGUTOVA, L.; SABATIER, L.; BEVERLEY, S. M.; SPATH, G.; BRUN, R.; PESSON, B.; BULET, P. **Characterization of a Defensin from the Sand Fly *Phlebotomus duboscqi* Induced by Challenge with Bacteria or the Protozoan Parasite *Leishmania major*.** Infection and Immunity, v. 12, p. 7140-7146, 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde **Situação epidemiológica da malária,** 2018

BRIONES, A. M.; SHILILU, J.; GITHURE, J.; NOVAK, R.; RASKIN, L. ***Thorsellia anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *Anopheles gambiae* mosquitões**. International Society for Microbial Ecology, v.2, p. 74-82, 2008.

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, v. 6 (182), p. 1-13, 2013.

CARVALHO, M. P.; ABRAHAM, W. R.; MACEDO, A. J. **Microrganismos em favor da saúde humana**. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 9 (11), p. 77-81, 2008.

CHARLWOOD, J. D.; HAYES, J. **Geographical variations in the cycle of *Anopheles darlingi* Root bites in Brazil**. Acta Amazônica, v. 8, p. 601-603, 1978.

CHAVSHIN, A. R.; OSHAGHI, M. A.; VATANDOOST, H.; POURMAND, M. R.; RAEISI, A.; ENAYATI, A. A.; MARDANI, N.; GHOORCHIAN, S. **Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates**. Acta Tropical, v. 121(2), p.129–134, 2012.

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 and Vectors, v. 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.

COSTA, F. T.; LOPES, S. C.; ALBRECHT, L.; ATAÍDE R.; SIQUEIRA, A. M.; SOUZA, R. M.; RUSSELL, B.; RENÂNIA, L.; MARINHO, C. R.; LACERDA, M.V. **On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the brazilian field**, Int J Parasitol, v. 42, p. 1099–1105, 2012.

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, São Paulo, 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.

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 e Vectors, v. 6 (182), p. 1-13, 2013.

COENYE, T.; GEVERS, D.; VANS DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. **Towards a prokaryotic genomic taxonomy**. FEMS Microbiology Reviews, v. 29 (2), p. 147-167, 2005.

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>.

COSTA, F.T.; LOPES, S. C.; ALBRECHT, L.; ATAIDE, R.; SIQUEIRA, A. M.; SOUZA R. M.; RUSSELL, B.; RENIA, L.; MARINHO, C. R.; LACERDA, M. V. **On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field**. International Journal for Parasitology, v. 42 (12), p.1099-1105. 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. 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.

CROMPTON, P. D.; MOEBIUS, J.; PORTUGAL, S.; WAISBERG, M.; HART, G.; GARVER, L. S.; MILLER, L. H.; BARILLAS, C.; PIERCE, S. K. **Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease**. Annual Review of Immunology, v. 32, p. 157-187, 2014.

DABROWSKI, J. M.; BALDERACCHI, M. **Development and field validation of an indicator to assess the relative mobility and risk of pesticides in the Lourens River catchment, SouthAfrica**. Chemosphere, v. 93, p. 2433–2443, 2013.

DAMIANI, C.; RICCI, I.; CROTTI, E.; ROSSI, P.; RIZZI, A.; SCUPPA, P.; CAPONE, A.; ULISSI, U.; EPIS, S.; GENCHI, M.; SAGNON, N.; FAYE, I.; KANG, A.; CHOUAIA, B.; WHITEHORN, C.; MOUSSA, G. W.; MANDRIOLI, M.; ESPOSITO, F.; SACCHI, L.; BANDI, C.; DAFFONCHIO, D.; FAVIA, G. **Mosquito-Bacteria Symbiosis: The Case of *Anopheles gambiae* and *Asaia***. Microbial Ecology, v. 60, p. 644–654, 2010.

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.

Das, P. K.; AMALRAJ D. D. **Biological control of malaria vectors**. Indian J. Med. Res, v. 106, p. 174–197, 1997.

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.

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 (USA), v. 94 (7), p.3274-3278, 1997.

ENGEL, P.; MORAN, N. A. **The gut microbiota of insects – diversity in structure and function**. FEMS Microbiol Rev, v. 37, p. 699–735, 2013.

FANG, W.; VEGA-RODRÍGUEZ J.; GHOSH, ANIL. K., JACOBS-LORENA, M.; KANG, A.; LEGER, R. J. S. **Development of Transgenic Fungi That Kill Human Malaria Parasites in Mosquitoes**. Science, v.331, p.1-11,2011.

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.

FERREIRA, M. U.; FORRONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S. **Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana**. Editora Manole. Barueri – SP, 2003.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. **Challenges for malaria elimination in Brazil**. Malar J, v.15 (284), p. 1-18, 2016.

FILLINGER, U.; KNOLS, B. G. J.; BECKER, N. **Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya**. Tropical Medicine and International Health, v. 8(1), p. 37 – 47, 2003.

FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I.; MASSAD, E.; MARUCCI, DANIEL. **Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 11 - Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles* (Kerteszia) in South-Eastern Brazil**. Rev. Saúde Pública, v. 30 (2), p. 107-114, 1996

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.

GENDRIN, M.; CHRISTOPHIDES, G. K. **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.

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.

GIROD, R.; ROUX, E.; BERGER, F.; STEFANI, A.; GABORIT, P.; CARINCI, R.; ISSALY, J.; CARME, B.; DUSFOUR, I. **Unravelling the relationships between *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) densities, environmental factors and malaria incidence: understanding the variable patterns of malarial transmission in French Guiana (South America)**. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 105, p. 107-122, 2011.

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.

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

HOLZ, L. E.; FERNANDEZ-RUIZ, D.; HEATH, W. R. **Protective immunity to liver-stage malaria**. *Clinical & Translational Immunology*, v. 5 (105), p.1-101, 2016;

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

JANDA, J. M; ABBOTT, S. L. **16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls**. *Journal Clinical Microbiology*, v. 45(9), p. 2761-2764, 2007.

KABULA, B., TUNGU, P.; MALIMA, R.; ROWLAND, M.; MINJA, J.; WILILO, R.; RAMSAN, M.; MCELROY, P. D.; KAFUKO, J.; KULKARNI, M.; PROTOPOPOFF, N.; MAGESA, S.; MOSHA, F.; KISINZA, W. **Distribution and spread of pyrethroid and DDT resistance among the *Anopheles gambiae* complex in Tanzania**. *Medical and Veterinary Entomology*. v. 28 (3), p. 244–252, 2013.

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.

KROTOSKI, W. A. **Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse**. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79 (1), p. 1-11, 1985.

LACERDA, M.V.; MOURÃO, M. P.; ALEXANDRE, M. A.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B. M.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, F. E.; FILHO, F. S.; BRASIL, P.; VENTURA, A. M; TADA, M. S. **Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature**. *Malar J*, v. 11(12), p.12-12, 2012

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M, L.; PACE N. R. **Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.** Proceedings in the National Academy Sciences of the (EUA)A, v. 82 (20), p. 6955-6959, 1985

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

LINDH, J. M.; BORG-KARLSON A. K.; FAYEA, I. **Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water.** Acta Tropica, v.107, p. 242–250, 2008.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; GUIMARÃES, A. E.; ARLÉ, M.; SILVA, T. F.; CASTRO, M. G.; MOTTA, M. A.; DEANE, L. M. **Anopheline species, some of their habitats and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 84, p. 501-514, 1989.

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.

MEIBALAN, E.; MARTI, M. **Biology of Malaria Transmission.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 7(3), p.1-15, 2016.

MEISTER, S.; AGIANIAN, B.; TURLURE, F.; RELÓGIO, A.; MORLAIS, I.; KAFATOS, F. C.; CHRISTOPHIDES, G. K. ***Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites.** PLoS pathogens, v. 5(8), p.1-13, 2009.

MICHEL, K.; KAFATOS, F. C. **Mosquito immunity against *Plasmodium*.** Insect Biochemistry Molecular Biology, v. 35 (7), p. 677–689, 2005.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; CLYDE, D. F.; MCGINNISS, M. H. **The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy.** New England Journal of Medicine, v. 295 (6), p. 302-304, 1976.

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.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; PORTILLO, H. A. **Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite.** Lancet infectious diseases, v.9 (9), p. 555-566, 2009.

MUSSET, L.; PELLEAU, S.; GIRORD, R.; ARDILLON, V. L.; CARVALHO, DUSFOUR, I.; GOMES, M. S. M; DJOSSOU, F.; EGRANDE, L. **Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 109 (5), p.525-533, 2014.

PATEL, J. B. **16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory**. Molecular Diagnosis, v. 6, p. 313-321,2001.

PETTER, M.; DUFFY, M. F. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. Results and Problems in Cell Differentiation v. 57, p. 47-90, 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.

RAMIREZ, J. L.; GARVER, L. S.; DIMOPOULOS, G. **Challenges and approaches for mosquito targeted malaria control**. Current Molecular Medicine, v. 9(2), p.116-130 2009.

REN, X.; HOICZYK, E.; RASGON, J. L. **Viral Paratransgenesis in the Malaria Vector *Anopheles gambiae***. PLoS Pathogens, v. 4(8), p. 1-8, 2008.

REY, L. **Parasitologia**. 4º edição, Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, RJ. p. 335-347, 2008.

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.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG I. **Symbiosis and development: the hologenome concept**. Birth Defects Res C Embryo Today, v. 93, p.56-66, 2011.

RUBIO-PALIS, Y.; ZIMMERMAN, R. H. **Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics**. Journal of Medicine and Entomology, v. 34, p. 499-510, 1997.

SALDAÑA, M. A.; HEGDE, S.; HUGHES, G. L. **Microbial control of arthropod-borne disease**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 112, p. 1–13, 2017.

SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B. G. J.; SAMSON, R. A.; TAKKEN, W. **Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review**. Journal of Insect Science, v. 4 (19), p. 1-24,2004.

SINDEN, R. E. **Sexual development of malarial parasites**. Advances in Parasitology, v. 22, p. 153-216, 1983.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J. M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. **Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids**. Science, v. 313 (5791), p. 1287-1290, 2006.

TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M.; COSTA, W. L. S.; SCARPASSA, V. M. **Biology of Amazonian Anophelines. XVII. Occurrence of *Anopheles* species, dynamics of transmission and malaria control in urban area of Ariquemes (Rondônia).** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 30, p. 221-251, 1988.

TADEI, W. P.; SANTOS, J. M. M.; SCARPASSA, V. M.; RODRIGUES, I. B. **Incidence, distribution and ecological aspects of *Anopheles* species (Diptera: Culicidae) in natural and environmental impact áreas of Brazilian Amazon,** p. 167-196. In: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A. (Eds.). **Scientific Bases for Development and Preservation Strategies of the Amazon.** Vol. 2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 1993.

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. **Malária e Dengue na Amazônia: vetores e estratégias de controle.** Pesquisa Científica e Tecnologia em Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília. Cap. MCT-INPA. p.112-125, 2010.

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. **Adaptative processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region.** Hydrobiologia, v. 789 (1), p. 1-18, 2017.

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

TRINGE, S. G.; HUGENHOLTZ, Philip. **A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene.** Current Opinion in Microbiology, v. 11 (5), p. 442-446 2008

WALKER, K .; LYNCH, M. **Contributions of *anopheles* larval control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential.** Medical and Veterinary Entomology, v.21, p. 2-21, 2007.

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, 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), p. 1- 9, 2009.

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

WIRTH, R.; FRIESENEGGER, A.; FIEDLER, S. **Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation.** Molecular and General Genetics, v. 216 (1), p. 175–177, 1989.

WILKE, A. B. B.; MARRELLI, M. T. **Genetic control of mosquitoes: population suppression strategies.** Rev. Inst. Med. Trop, São Paulo, v. 54(5), p. 287-292, 2012

WOLFARTH. B. R.; FILIZOLA, N.; TADEI, W. P.; DURIEUX, L. **Epidemiological analysis of malaria and its relations with environmental variables in four municipalities of the State of Amazonas – Brazil.** Hydrological Sciences *Journal*, v. 58, p. 1495-1504, 2013.

WOLFARTH-COUTO, B.; SILVA, R. A. D.; FILIZOLA, N. **Variabilidade dos casos de malária e sua relação com a precipitação e nível d'água dos rios no Estado do Amazonas, Brasil.** Cadernos de Saúde Pública, v.35 (2), p.1-15, 2019.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P. Y. **Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis.** BMC Bioinformatic. 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.

CAPÍTULO

**INDÍCIOS DE TRANSMISSÃO TRANSESTADIAL DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS
ASSOCIADAS AO *Anopheles darlingi*, ROOT, 1926**

Indícios de transmissão transestadial de bactérias cultiváveis associadas ao

Anopheles darlingi, Root, 1926

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

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

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

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

Resumo

Mosquitos vetores de doenças abrigam uma grande diversidade de microrganismos em seu trato intestinal, dentre eles as bactérias, que são conhecidas por desempenhar papéis importantes na vida de seus hospedeiros. Em mosquitos do gênero *Anopheles*, vetores da malária, algumas dessas bactérias desempenham a função de modular a infecção por *Plasmodium*. Essa característica tem despertado o interesse para uma técnica promissora conhecida como paratransgenese, onde bactérias simbiotes são modificadas geneticamente para expressar fatores antiparasitários, sendo reinseridas em populações de mosquitos selvagens, a fim de inibir o desenvolvimento dos parasitas dentro do vetor. O primeiro passo para o sucesso dessa abordagem é selecionar bactérias cultiváveis, transmitidas em todas as fases do mosquito, manipuláveis geneticamente e não patogênicas aos seres humanos. Com os constantes casos de malária registrados na Região Amazônica é necessário métodos alternativos para seu controle. Tendo em vista esta necessidade, neste trabalho objetivou selecionar bactérias cultiváveis, que apresentam características de transmissão transestadial em *A. darlingi*, principal vetor da malária na região, para utilização em futuras abordagens paratransgênicas. Por meio de isolamento bacteriano, caracterização morfológica, identificação molecular pelo gene 16S rRNA de espécies bacterianas associadas às larvas, pupas e adultos de *A. darlingi* e teste de transformação genética para bactérias semelhantes, presentes nestes estágios de desenvolvimento. Neste estudo foram obtidos os seguintes resultados: 166 bactérias foram isoladas e caracterizadas morfológicamente, dentre elas, 72 foram identificadas e pertencem aos filos Proteobacteria, Firmicutes Actinobacteria e Bacteroidetes, também foram identificados 20 gêneros, cujos predominantes foram *Bacillus* e *Klebsiella*, destes foram identificadas 38 espécies diferentes, sendo que três delas mostraram-se fortes candidatas a paratransgênese são elas: *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter asburiae* e *P. dispersa*. Estas foram selecionadas para teste de transformação bacteriana, com o plasmídeo pKS1-GFP e *Pantoea agglomerans* foi a única passível de transformação genética, sendo monitorada nos estágios de desenvolvimento de *A. darlingi*, apresentando capacidade de transmissão transestadial.

Palavras-chave: Malária, Paratransgênese, Transmissão transestadial.

ABSTRACT

Disease vector mosquitoes harbor a large diversity of microorganisms in their intestinal tract, including bacteria, which are known to play important roles in the life of their hosts. In *Anopheles* mosquitoes, vectors of malaria, some of these bacteria perform the function of modulating *Plasmodium* infection. This feature has sparked interest for a promising technique known as paratransgenesis, where symbiont bacteria are genetically engineered to express antiparasitic factors and reinserted into wild mosquito populations to inhibit parasite development within the vector. The first step to the success of this approach is to select cultivable bacteria, transmitted at all stages of the mosquito, genetically manipulable and non-pathogenic to humans. With the constant cases of malaria registered in the Amazon Region, alternative methods for its control are needed. In view of this need, this study aimed to select cultivable bacteria, which have characteristics of transstate transmission in *A. darlingi*, the main vector of malaria in the region, for use in future paratransgenic approaches. By bacterial isolation, morphological characterization, molecular identification by the 16S rRNA gene of bacterial species associated with larvae, pupae and adults of *A. darlingi* and genetic transformation test for similar bacteria present in these developmental stages. The following results were possible: 166 bacteria were isolated and morphologically characterized, among them, 72 were identified and belong to the phylum Proteobacteria, Firmicutes Actinobacteria and Bacteroidetes, 20 genera were also identified, predominantly *Bacillus* and *Klebsiella*, from which 38 different species were identified. Three of them were strong candidates for paratransgenesis: *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter asburiae* and *P. dispersa*. These were selected for bacterial transformation testing, with plasmid pKS1-GFP and *Pantoea agglomerans* being the only one capable of genetic transformation, so it was monitored at *A. darlingi*'s developmental stages, presenting trans-state transmission capacity.

Keywords: Malaria, Paratransgenesis, Transstate Transmission.

INTRODUÇÃO

A malária é a doença parasitária transmitida por mosquitos vetores mais importante para órgãos de saúde pública do mundo, causa milhares de mortes de pessoas anualmente, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do planeta. É transmitida aos seres humanos pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, 1818, infectadas com protozoários do gênero *Plasmodium* Machiavava e Celli, 1885 (FORRANTI, 2002; WHO, 2018).

No Brasil, a malária é endêmica na Região Amazônica, onde 99% dos casos são registrados. Nesta região o principal transmissor é o mosquito *Anopheles darlingi*, cujo comportamento antropofílico e a alta suscetibilidade à infecção por *Plasmodium* spp. o tornam um importante vetor desta doença (DEANE, 1986; CONSOLI e

OLIVEIRA, 1994). As condições tropicais e os ciclos hidrológicos que formam criadouros naturais, em meio à floresta tornam a região propícia à proliferação destes mosquitos e, conseqüentemente, ao aumento de casos de malária (TADEI et al., 1998, 2010, 2017).

Grandes esforços para combater ou reduzir o número de casos de malária, estão sendo empregados, sendo o controle do vetor o alvo das principais estratégias, principalmente com o uso de inseticidas químicos. No entanto o uso indiscriminado destes produtos causa sérios prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana, além de aumentar populações de mosquitos naturalmente resistentes. Por isso, estratégias alternativas e eficientes são urgentemente necessárias (KABULA et al., 2013; WANG e JACOBS-LORENA, 2013; WHO, 2018).

Mosquitos vetores de doenças podem abrigar uma grande diversidade de microrganismos, entre eles as bactérias. Acredita-se que essas bactérias podem ser benéficas para o mosquito, fornecendo suplementos nutricionais, tolerância a perturbações ambientais e regulação da homeostase do hospedeiro (MORAN, 2006; WEISS e AKSOY, 2011). Em vetores da malária, bactérias presentes nos intestinos e glândulas salivares do mosquito podem dificultar o desenvolvimento dos plasmódios e regular a entrada dos parasitas, na corrente sanguínea dos humanos (CIRIMOTICH et al., 2011).

O potencial que bactérias associadas aos mosquitos *Anopheles* têm em modular a infecção por plasmódios, atraiu o interesse de pesquisadores para a utilização dessas bactérias em técnicas moleculares (PUMPUNI et al., 1996; WEISS e AKSOY, 2011), entre essas técnicas, se destaca a paratransgênese, onde bactérias simbiotes de mosquitos são geneticamente modificadas para expressar fatores antiparasitários e serem reintroduzidas em populações de mosquitos selvagens para inibir ou bloquear a transmissão dos *Plasmodium* ssp. (DURVASULA et al., 1997; BEARD et al., 2002; COUTINHO-ABREU et al., 2010).

O sucesso desta abordagem necessita que essas bactérias apresentem algumas características indispensáveis, como por exemplo, ser simbiote do vetor, ser cultivável e passível de transformação genética, após a transformação permanecer com as funções fisiológicas inalteradas, estar presente no intestino médio dos mosquitos onde ocorre o gargalo do desenvolvimento dos plasmódios (BEARD et al., 2002; WANG et al., 2012).

Outras características também são necessárias para que uma bactéria seja candidata à paratransmissão no controle da malária. É importante que possam passar por todos os estágios de desenvolvimento do mosquito. Alguns autores relatam que grande parte dessas bactérias não sobrevive à metamorfose do mosquito (MOLL et al., 2001). No entanto algumas espécies bacterianas foram monitoradas em laboratório conseguiram ser transmitidas de forma horizontal, transestadial e vertical, em mosquitos anofelinos (LINDH et al., 2008).

A transmissão transestadial, onde bactérias são transferidas do estágio de larva para o mosquito adulto, é uma característica muito interessante para um futuro candidato à essa abordagem. É nas fases imaturas que os mosquitos adquirem a maior partes da sua microbiota bacteriana e se algumas dessa bactérias for capaz de sobreviver à metamorfose dos mosquitos e permanecer estável no intestino médio, onde ocorre os estágios mais vulneráveis do desenvolvimento dos plasmódios, seria uma forte candidata para uso na paratransmissão (FAVIA et al., 2007; LINDH et al., 2008; WANG et al., 2012).

Os estudos sobre a microbiota do mosquito *A. darlingi* ainda são escassos, sobre esse tipo de transmissão bacteriana, não há relatos na Região Amazônica. Tendo em vista a necessidade de se encontrar uma bactéria ideal e a transmissão transestadial uma característica fundamental, este estudo objetivou identificar bactérias cultiváveis com característica de transmissão transestadial em larvas, pupas e adultos de *A. darlingi*, para controle da malária por paratransmissão.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta das amostras

As coletas foram realizadas no sitio Dona Chagas, bairro Puraquequara no município de Manaus, onde possui barragens permanentes sendo um local apropriado para reprodução de mosquitos anofelinos e apresentam importante focos de malária, segundo a Fundação de Vigilância em Saúde (FVS).

Larvas foram coletadas no início da manhã, utilizando conchas entomológicas padrão segundo Consoli e Oliveira, (1994). Em seguida transferidas, juntamente com a água do criadouro, para tubos falcon de 50 mL devidamente esterilizados e logo

após armazenadas em caixa de isopor contendo gelo para serem transportadas para o laboratório de Malária e Dengue do INPA.

Triagem, identificação e manutenção das larvas

As etapas seguintes foram realizadas no laboratório de Malária e Dengue do INPA. Larvas de 3° e 4° instar foram separadas e identificadas individualmente em microscópio estereoscópico, utilizando-se as chaves de identificação de Consoli e Oliveira (1994). Em seguida foram colocadas em bandejas esmaltadas com água do criadouro e foram mantidas até se transformarem em pupas e mosquitos adultos. 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.

Isolamento bacteriano e caracterização morfológica

As amostras de larvas e pupas foram lavadas por imersão em água estéril e etanol 70%, em seguida maceradas, centrifugadas e plaqueadas em placas de petri contendo meio de cultura nutriente Ágar e fluconazol. Os estômagos dos mosquitos adultos foram primeiramente dissecados, macerados e ressuspensos em 200 µL de água deionizada e 50 µL do sobrenadante foram plaqueados em placas de Petri com meio de cultivo Ágar e fluconazol. 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 quanto à forma, consistência e cor da colônia e pelo método de coloração de Gram.

Com o intuito de identificar o maior número de espécies semelhantes em todas as amostras, o que pode ser um indício de um simbiote, as amostras foram reunidas em grupos de acordo com as características morfológicas e apenas os isolados bacterianos semelhantes em larvas, pupas e estômagos de mosquitos adultos foram utilizados nas etapas de identificação molecular.

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

A extração de DNA foi realizada utilizando o produto Matriz InstaGene™ da empresa Bio-Rad e o protocolo seguiu as recomendações do fabricante. A amostra final foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific), ajustada para 150 ng de DNA e armazenada 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) seguindo o protocolo do fabricante e foram realizadas em aparelho termociclador Thermal Cycler® da 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 primers a 54 °C por 40 seg 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 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 (CellcoBiotec).

No sequenciamento utilizou-se um alíquota de 50 ng de DNA purificado como matriz e o kit BigDyeTerminator V 3.1. (Life Technologies). As reações foram precipitadas com etanol e inseridas no equipamento ABI 3500 XL (AppliedBiosystems) para a determinação das sequências.

As sequências geradas foram analisadas na plataforma Electropherogram Quality Analysis-EMBRAPA, disponível em:

[http:// asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/](http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/)) e comparadas com as sequências bacterianas depositadas na base de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Transformação genética bacteriana

Espécies bacterianas foram previamente selecionadas para etapa de transformação genética utilizando plasmídeo pKS1-GFP que expressa a proteína verde fluorescente (GFP) quando exposta à luz ultra violeta e possui marcador de

seleção para ampicilina, cedido pelo Laboratório de Tecnologia do DNA do Centro de Apoio Multi-disciplinar – UFAM.

Foram realizadas pesquisas em artigos científicos e dados de órgãos de Saúde afim de verificar os níveis de patogenicidade para os seres humanos das bactérias selecionadas para os procedimentos de transformação genética. Dessa forma, apenas as espécies consideradas não patogênicas foram utilizadas neste estudo.

Na transformação genética, utilizou-se 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 em uma voltagem de 1900 em aparelho Electroporator 2510 (Eppendorf®), para desestabilização da membrana e formação de poros que possibilitaram a entrada do plasmídeo no interior da célula (LIMA, 2008).

Após a eletroporação foi adicionado 1 mL de meio LB líquido, as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação de 250 rpm e dispostas em placas de Petri contendo meio de cultivo LB sólido com ampicilina e LB sem ampicilina, em estufa a 37° C. Também foram eletroporadas células controle contendo água e plaqueadas nas mesmas condições. Após o crescimento as colônias bacterianas foram visualizadas em luz negra e as que expressaram a fluorescência verde foram preservadas com glicerol para estudos posteriores.

Teste de monitoramento transestadial de bactérias transformadas

Na etapa de monitoramento, foram utilizadas larvas recém eclodidas em laboratório, as mesmas foram colocadas em bandejas contendo água destilada e ampicilina. Em cada bandeja, contendo 200 mL de água destilada esterilizada foram adicionadas larvas oriundas dos ovos eclodidos de uma única fêmea. Em seguida, nesta água das larvas, foram adicionados 200 µL na concentração de 2×10^8 UFC/mL de *P. Agglomerans*-GFP. Após 24 horas, as larvas foram retiradas e lavadas, uma a uma, com água destilada estéril, para retirar as bactérias da superfície de seus corpos e colocadas novamente em bandejas contendo também 200 mL de água destilada com ampicilina na concentração de 100 mg/mL. As larvas foram mantidas sob essas condições durante todo o experimento até a fase adulta.

Para verificar a presença de *P. agglomerans*-GFP nos estágios de desenvolvimento de *A. darlingi*, larvas de primeiro instar foram maceradas e plaqueadas em meio LB sólido, o mesmo ocorreu para larvas de terceiro e quarto instar, pupas e adultos. Após 24 horas as placas foram expostas à luz UV. O controle negativo foi realizado com a mesma cepa de *P. agglomerans* sem o plasmídeo pKS1-GFP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e caracterização morfológica de espécies bacterianas presentes em larvas, pupas e adultos de *A. darlingi*

Neste estudo foram isoladas colônias bacterianas provenientes de larvas, pupas e de mosquitos adultos selvagens coletados em uma área periurbana da cidade de Manaus-AM, além de bactérias das amostras dos mosquitos de laboratório. O número total dos isolados bacterianos de todas as amostras consistiu em 166 colônias.

Em relação aos mosquitos selvagens, foram obtidas 28 colônias bacterianas de larvas, 28 de pupas e 29 de adultos, perfazendo um total de 85 colônias. Das amostras dos mosquitos de laboratório foram isoladas 41 colônias bacterianas de larvas, 24 de pupas e 16 de adultos, totalizando 81 colônias (Figura 6).

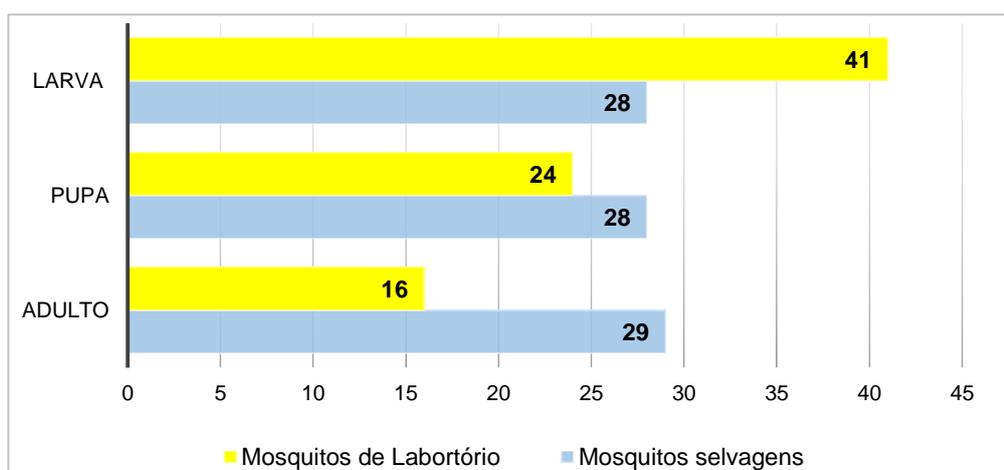


Figura 6. Quantidade de isolados bacterianos de mosquitos oriundos de campo e laboratório.

Quanto à caracterização morfológica, os isolados bacterianos foram submetidos ao método de coloração de Gram onde apresentaram suas células em formas de bacilos, cocos, cocobacilos e uma única colônia em forma de vibrião.

Em isolados provenientes de mosquitos de laboratório 82% foram de bactérias gram-negativas e 18% de gram-positivas, sendo bacilos gram-negativos os mais prevalentes com 55% do total. As amostras de mosquitos selvagens tiveram 66% de bactérias gram-negativas e 34% de gram-positivas, os bacilos gram-negativos também foram mais prevalentes com 44% (Figura 7).

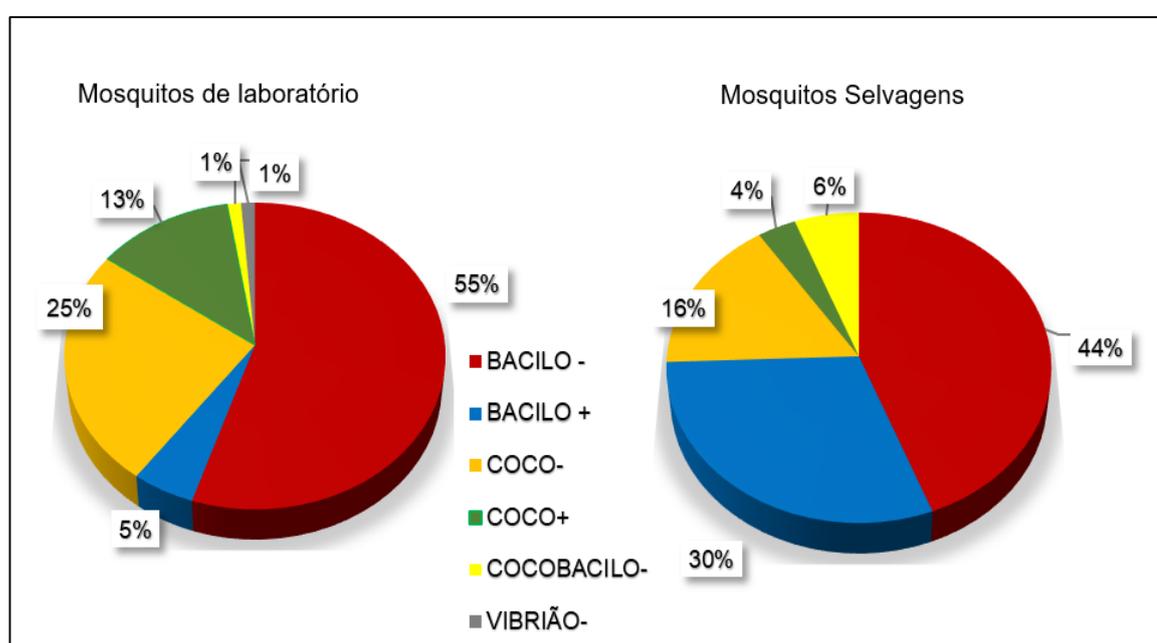


Figura 7. Percentual da morfologia bacteriana de mosquitos provenientes do campo e laboratório.

Bactérias gram-negativas são comumente descritas como sendo prevalentes em mosquitos anofelinos. Assim como os resultados mostrados neste trabalho, Rani et al., (2009), verificaram a diversidade de bactérias em larvas e intestino médio do mosquito *A. stephensis* na Ásia, criados em laboratório e coletados no campo, onde detectaram a prevalência de bactérias gram-negativas da classe Gammaproteobacteria, tanto nos isolados de mosquitos de campo como nos mosquitos de laboratório, resultados semelhantes também foi relatado por Djadid et al., (2011), com a prevalência de bactérias gram-negativas em duas espécies de mosquitos *Anopheles spp.* do Norte e Sudeste do Irã.

Outros resultados que demonstram a prevalência de bactérias gram-negativas foi descrito por Wang et al., (2011), onde realizaram a caracterização em comunidades

bacterianas isoladas de larvas, pupas e mosquitos adultos de *A. gambiae* criados em habitats seminaturais no Quênia e demonstraram que bactérias gram-negativas da classe yproteobacterias também foram mais prevalentes. Berhanu et al., (2019) também identificaram maior percentual de bactérias gram-negativas em glândulas salivares e intestino médio dos mosquitos em cinco espécies de *Anopheles spp.* de uma área endêmica na etiópia.

Comunidades de bactérias gram-negativas estão presentes em diferentes espécies de mosquitos anofelinos, e podem habitar diferentes partes do corpo desse inseto como o lúmen do intestino médio, glândulas salivares, túbulos de malpigh órgãos sexuais, entre outros, e desempenhar diferentes funções, entre elas modulação da infecção por plasmódios nos mosquitos da malária (GONZALES-CERON et al., 2003; CIRIMOTICH et al., 2011).

Em um estudo realizado por Pumpini et al., (1993), foi investigado o desenvolvimento do esporogônio de *P. falciparum* em *A. stephensi*, neste estudo foram utilizadas quatro cepas gram-negativas e duas cepas gram-positivas, todas as cepas bacterianas gram-negativas inibiram parcial ou completamente a formação de oocistos de plasmódios, enquanto que bactérias gram-positivas não tiveram quaisquer efeitos inibidores dos oocistos, resultado semelhante foi descrito por Boissière et al., (2012), porém com o mosquito *A. gambiae*.

Outros autores também descreveram que bactérias gram-negativas têm a capacidade de influenciar o desenvolvimento dos plasmódios, principalmente nos estágios mais vulneráveis de seu desenvolvimento, aliado ao fato de bactérias dessas bactérias serem facilmente transformáveis, fortalece a ideia de que tais bactérias possam ser usadas no controle biológico da malária, por paratransgênese (GONZALEZ-CERON et al., 2003; CIRIMOTICH et al., 2011; BANDO et al., 2013).

Número de cepas bacterianas e filios detectados em todas as amostras

De acordo com as semelhanças morfológicas dos isolados bacterianos como: cor da colônia, textura, forma e coloração de Gram, foi possível reuni-las em 13 grupos provenientes de mosquitos de laboratório e 8 grupos provenientes de mosquitos selvagens, perfazendo um total de 21 grupos morfológicamente distintos. Estas características foram úteis para uma primeira classificação, no entanto foram utilizados também métodos moleculares para resultados mais confiáveis, visto que

bactérias podem apresentar características morfológicas semelhantes, porém de espécies bem distintas.

Na etapa de identificação molecular foram selecionadas bactérias isoladas de larvas, pupas e adultos presente em cada grupo, após uma minuciosa seleção, 78 cepas bacterianas foram submetidas à etapa de identificação molecular pelo gene 16S rRNA, destas 72 sequências bacterianas foram analisadas devido a qualidade das sequências consenso.

Das 72 sequências analisadas foram identificados quatro filos, sendo Proteobacteria o mais prevalente com 75%, seguido do filo Firmicutes com 15%, Actinobacteria com 5% e Bacteroidetes com 5%, representados na Figura 8.

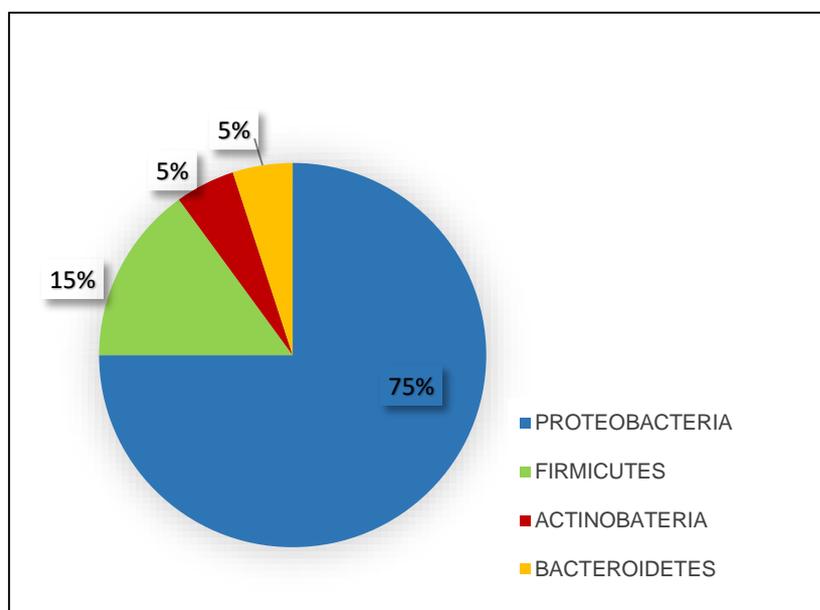


Figura 8. Percentual por Filo identificado em todas as amostras

O Filo Proteobacteria é constantemente descrito como sendo prevalente em investigações sobre a microbiota intestinal de mosquitos. Em um estudo realizado por Moro et al, (2013), onde investigou-se a diversidade da microbiota intestinal de machos e fêmeas de mosquitos do *Aedes albopictus*, identificou-se a predominância do Filo Proteobacteria em 51, 3% das amostras identificadas.

Em mosquitos *Anopheles* spp. vários autores também descrevem predominância do respectivo Filo, como por exemplo Lindh et al., (2005), em sua pesquisa que identificou a microbiota bacteriana de dois vetores da malária na África, *A. gambiae* e *A. funestus*. Resultados semelhantes também foram descritos por

Chavshin et al., (2014) na investigação de bactérias em *A. culicifacies*, assim como Rani et al., (2009) em *A. stephensi*.

O Filo Proteobacteria também foi predominante nos estudos de Mwadondo et al., (2017), em *A. gambiae* e *C. quinquefasciatus* criados em condições de laboratório e Sharma et al., (2014), na investigação metagenômica da comunidade bacteriana presente nas glândulas salivares de *A. culicifacies*.

Nos estudos de Oliveira, (2015); Rocha, (2015); Nilsson et al., (2019) e Serrão, (2019), a partir de análises metagenômicas e sequenciamento do gene 16S rRNA de larvas, pupas, ovos, ovários e amostras de criadouros de *A. darlingi*, a dominância do filo Proteobactéria correspondeu a 80%, 39%, 63% e 80%, respectivamente.

Em estudos de pirosequenciamento do gene 16S rRNA, Gimonneau et al., (2014) identificaram 16 filios em larvas e adultos de *A. coluzzii* e *A. gambiae* e também identificaram o filo Proteobacteria como o mais prevalente.

Thioffo et al., (2015), na identificação da composição de bactérias de ovários, intestinos e glândulas salivares de *A. coluzzi* e *A. gambiae* coletados em Camarões também se assemelham aos dados aqui descritos, com a abundância significativa dos filios Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes, que juntos, contribuíram com mais de 99% da microbiota total desses mosquitos.

Gêneros bacterianos detectados em todas as amostras

No presente estudo foram identificados os gêneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Cupriavidus*, *Lysinibacillus*, *Aquitalea*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Flectobacillus*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Ralstonia*, com um total de 20 gêneros identificados em todas as amostras.

O gêneros mais prevalentes foram: *Bacillus* com 19,4%, pertencente ao Filo Firmicutes; *Klebsiella* com 15,2%; *Chromobacterium* com 6,9%; *Pantoea* com 9,7%, ambos pertencentes ao Filo Proteobacteria e o gênero *Chryseobacterium* com 9,7% pertencente ao Filo Bacteroidetes (Figura 9).

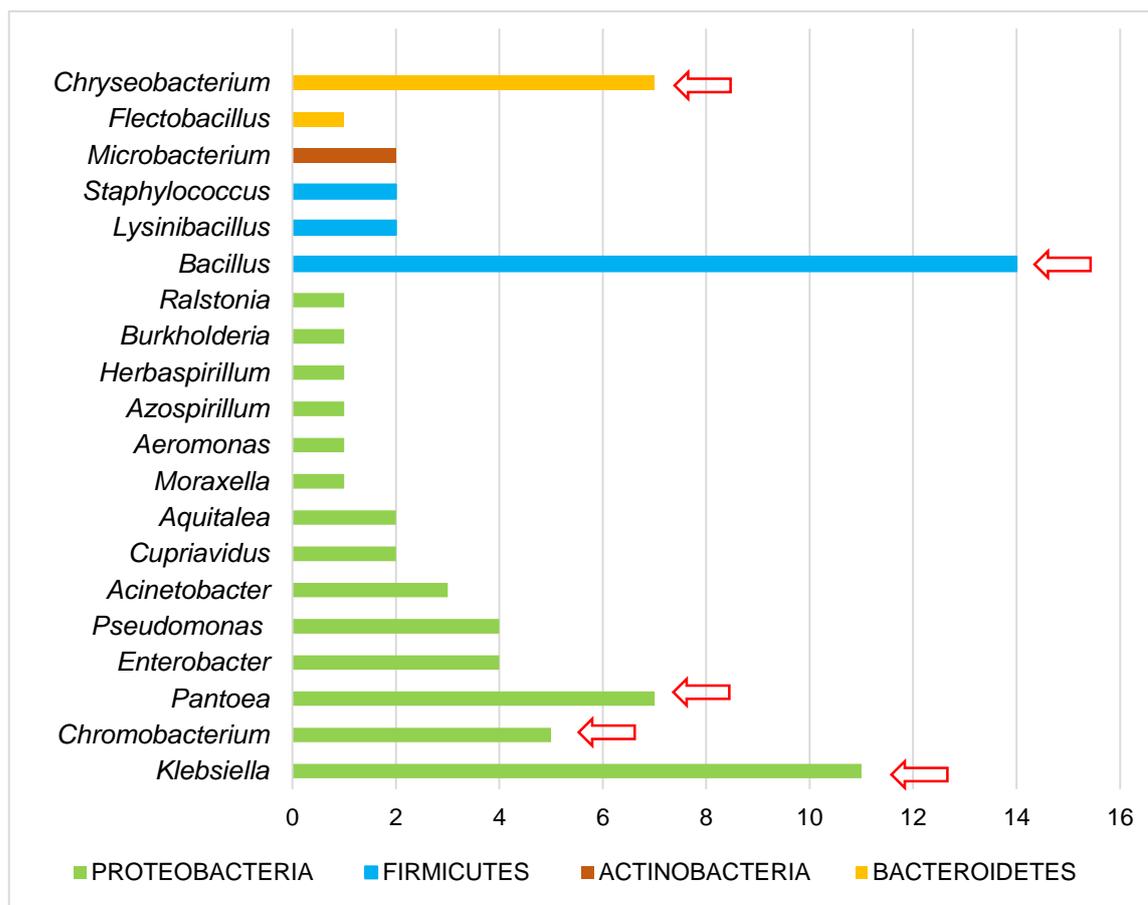


Figura 9. Quantidade de gêneros identificados em todas as amostras

Uma diversidade de gêneros bacterianos de diferentes mosquitos *Anopheles* spp., vêm sendo descrita. Rani et al., (2009), identificaram 68 gêneros em uma investigação sobre a microbiota de larvas e intestino médio de *A. stephensi* na África, destes, 53 são pertencentes a mosquitos coletados no campo e 15 pertencentes a mosquitos de mantidos em condições de laboratório.

Chavshin et al., (2014), na busca de potenciais candidatos à paratransgenese, identificaram 12 gêneros bacterianos isolados de larvas e intestino médio de fêmeas recém emergidas de *A. culicifacies* de várias regiões do Irã, dentre os gêneros identificados *Pseudomonas* se mostrou mais prevalente, isolada de todos os locais de amostragem.

Ngo et al., (2015) identificaram 30 gêneros bacterianos de diferentes espécies de mosquito *Anopheles* no Vietnã, onde foram relatados gêneros que possuem impacto no desenvolvimento de *Plasmodium* spp., além disso foram identificados quatro gêneros descrito pela primeira vez em mosquitos anofelinos, sendo eles *Coxiella*, *Yersinia*, *Xanthomonas*, e *Knoellia*.

Outro estudo que descreve uma diversidade de gêneros bacterianos presentes em mosquitos *Anopheles* spp. foi realizado por Ngo et al., (2016), onde os autores identificaram 105 gêneros bacterianos por gene rRNA 16s, isolados do abdome de 8 espécies de *Anopheles*, especialmente espécimes selvagens e infectados de uma província do Vietnã.

Os trabalhos aqui relatados demonstram que mosquitos anofelinos possuem uma grande diversidade de bactérias em sua microbiota, no entanto para o *A. darlingi*, principal vetor da malária na Amazônia existe poucos relatos sobre sua microbiota, e a quantidade de gêneros bacterianos encontrados nesse vetor ainda é pouco representativo quando comparados com vetores da malária de outras regiões do mundo.

Alguns trabalhos descrevem gêneros bacterianos em *A. darlingi* na Região Amazônica, como o estudo de Tenerius et al., (2008), que descreveu quatro deles: *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Pantoea* e *Pseudomonas*, identificados em fêmeas alimentadas com sangue, alguns desses gêneros estão estreitamente relacionados a outros vetores de doenças.

No estudo de Oliveira, (2015), o autor descreveu a presença de 11 gêneros, com destacando-se *Paenibacillus*, *Serratia*, *Methylobacterium* e *Burkholderia*. No trabalho de Rocha, (2015), foram identificados 23 gêneros bacterianos em *A. darlingi*, sendo *Bacillus* o predominante com 21,7% das amostras, seguido por *Acinetobacter* e *Pseudomonas* com cada um representando 8,7% do total. Também foram relatados gêneros semelhantes presentes nos dois locais estudados, Coari e Manaus, e estes incluem: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Tsukamurella*.

Arruda, (2017), relatou a presença de oito gêneros bacterianos identificados das fezes de mosquitos *A. darlingi*, estes incluem: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Cedecea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia* e *Staphylococcus*.

Serrão, (2019), identificou a presença de 18 gêneros bacterianos isolados de ovários, ovos e larvas de *A. darlingi*, onde os gêneros predominantes foram *Acinetobacter* e *Enterobacter*, também nesse estudo seis gêneros foram descritos pela primeira vez em associação com *A. darlingi*, são eles: *Elizabethkingia*, *Cupriavidus*, *Leucobacter*, *Pectobacterium*, *Rhizobium* e *Nubsella*.

Com os resultados do presente estudo em conjunto com os trabalhos de investigação da microbiota de *A. darlingi* já existentes, foram identificados 47 gêneros

bacterianos. No presente trabalho foram identificados sete gêneros ainda não descrito no principal vetor da malária na Região Amazônica, sendo os gêneros *Lysinibacillus*, *Aquitalea*, *Azospirillum*, *Flectobacillus*, *Herbaspirillum*, *Moraxella* e *Ralstonia*.

Alguns gêneros bacterianos identificados no presente estudo, são comumente descrito em associação com *A. darlingi* são eles: *Enterobacter*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*. O gênero *Serratia* identificado na maior parte dos trabalhos de investigação, não foi relatado no presente estudo.

Espécies bacterianas identificadas pelo gene rRNA 16s em todas as amostras e comparadas com o banco de dados NCBI

- **Espécies bacterianas identificadas nas amostras de larvas de *A. darlingi* provenientes do laboratório**

Foram identificadas 14 espécies bacterianas em amostras de larvas de mosquitos de laboratório. A bactéria *Klebsiella pneumoniae* foi a mais predominante com quatro representantes, seguida da bactéria *Chryseobacterium vietnamense* com dois representantes, as demais bactérias identificadas de larvas se mostram com apenas um representante (Tabela 1).

Tabela 1. Bactérias identificadas em amostras de larvas de mosquitos oriundos de laboratório.

ESTÁGIO	COD.	GÊNERO/ESPÉCIE	SCORE	IDENT. NCBI
LARVA	14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1853	99%
	16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1873	99%
	20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1483	100%
	22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1858	100%
	5	<i>Chryseobacterium vietnamense</i>	1760	98%
	13	<i>Chryseobacterium vietnamense</i>	1426	99%
	15	<i>Chryseobacterium oncorhynchi</i>	1471	99%
	19	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1463	99%
	33	<i>Pseudomonas mosselii</i>	1428	100%
	6	<i>Burkholderia contaminans</i>	1857	99%
	21	<i>Enterobacter asburiae</i>	1857	99%
	30	<i>Ralstonia pickettii</i>	1873	100%
	31	<i>Aquitalea pelogenes</i>	1845	100%
	32	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	1810	99%
TOTAL		14 espécies		

- **Espécies bacterianas identificadas nas amostras de pupas de *A. darlingi* provenientes do laboratório**

Em amostras de pupas de laboratório foram identificados 10 espécies bacterianas. A bactéria *Klebsiella variicola* foi a mais predominante com quatro representantes, seguido da bactéria *Chryseobacterium gambrini* com dois representantes, as outras bactérias identificadas de pupas de laboratório se mostram com apenas um representante (Tabela 2).

Tabela 2. Bactérias identificadas em amostras de pupas de mosquitos oriundos de laboratório.

ESTÁGIO	COD.	GÊNERO /ESPÉCIE	SCORE	IDENT. NCBI
PUPA	1	<i>Enterobacter asburiae</i>	1862	99%
	2	<i>Klebsiella variicola</i>	1862	100%
	23	<i>Klebsiella variicola</i>	1866	100%
	24	<i>Klebsiella variicola</i>	1181	99%
	25	<i>Klebsiella variicola</i>	1871	99%
	17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1853	99%
	7	<i>Chryseobacterium gambrini</i>	1742	99%
	8	<i>Chryseobacterium gambrini</i>	1714	98%
	10	<i>Chryseobacterium vietnamense</i>	1773	99%
	3	<i>Microbacterium proteolyticum</i>	1437	99%
TOTAL		10 espécies		

- **Espécies bacterianas identificadas nas amostras de adultos de *A. darlingi* provenientes do laboratório**

Em amostras de adultos de laboratório foram identificados 9 cepas bacterianas. A bactéria *Enterobacter asburiae* foi a mais predominante com dois representantes, as outras se mostraram com apenas um representante (Tabela 3).

Foram identificadas um total de 33 cepas bacterianas em todas amostras de mosquitos de laboratório, destas, 18 são espécies distintas, são elas: *Acinetobacter nosocomialis*, *Aquitalea pelogenes*, *Azospirillum melinis*, *Burkholderia contaminans*, *Chryseobacterium gambrini*, *Chryseobacterium oncorhynchi*, *Chryseobacterium vietnamense*, *Cupriavidus basilensis*, *Cupriavidus pampae*, *Enterobacter asburiae*, *Flectobacillus roseus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, *Microbacterium proteolyticum*, *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas nitroreducens* e *Ralstonia pickettii*.

Tabela 3. Bactérias identificadas em amostras de mosquitos adultos oriundos de laboratório.

ESTÁGIO	COD.	GÊNERO/ESPÉCIE	SCORE	IDENT. NCBI
ADULTO	11	<i>Azospirillum melinis</i>	1701	99%
	12	<i>Cupriavidus pampae</i>	1751	98%
	18	<i>Cupriavidus basilensis</i>	1472	98%
	26	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1831	99%
	28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1851	99%
	29	<i>Enterobacter asburiae</i>	1458	100%
	27	<i>Enterobacter asburiae</i>	1840	99%
	4	<i>Microbacterium proteolyticum</i>	1393	99%
	34	<i>Flectobacillus roseus</i>	1777	99%
TOTAL		9 espécies		

- **Espécies bacterianas identificadas nas amostras de larvas de *A. darlingi* provenientes do campo**

Em amostras de larvas de mosquitos selvagens foram identificadas 13 espécies bacterianas. *Chromobacterium rhizoryzae*, *Bacillus marisflavi* e *Bacillus proteolyticus* foram as mais prevalentes com dois representantes cada, as outras bactérias de larvas se mostraram com apenas um representante (Tabela 4).

Tabela 4. Bactérias identificadas em amostras de larvas de mosquitos oriundos do campo.

ESTÁGIO	COD.	GÊNERO/ESPÉCIE	SCORE	IDENT. NCBI
LARVA	53	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	1849	99%
	54	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	1844	99%
	70	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1182	100%
	37	<i>Pantoea agglomerans</i>	1825	99%
	35	<i>Bacillus marisflavi</i>	1871	99%
	36	<i>Bacillus marisflavi</i>	1871	99%
	39	<i>Bacillus aryabhatai</i>	1873	99%
	40	<i>Bacillus megaterium</i>	1890	100%
	44	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1871	99%
	45	<i>Bacillus proteolyticus</i>	1550	99%
	46	<i>Bacillus proteolyticus</i>	1893	100%
	52	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1858	99%
	73	<i>Bacillus cereus</i>	1882	99%
TOTAL		13 espécies		

- **Espécies bacterianas identificadas nas amostras de pupas de *A. darlingi* provenientes do campo**

Foram identificadas 14 espécies bacterianas de amostras de pupas de mosquitos selvagens. A espécie *Chromobacterium violaceum* foi a mais prevalente, com dois representantes, as demais com apenas um representante (Tabela 5).

Tabela 5. Bactérias identificadas em amostras de pupas de mosquitos oriundos do campo.

ESTÁGIO	COD.	GÊNERO/ESPÉCIE	SCORE	IDENT. NCBI
PUPA	56	<i>Chromobacterium amazonense</i>	1807	99%
	57	<i>Aquitalea magnusonii</i>	1855	99%
	59	<i>Aeromonas jandaei</i>	1482	99%
	60	<i>Chromobacterium violaceum</i>	1467	98%
	61	<i>Chromobacterium violaceum</i>	1426	98%
	66	<i>Chryseobacterium arachidis</i>	1485	99%
	71	<i>Acinetobacter modestus</i>	1853	99%
	41	<i>Pantoea agglomerans</i>	1796	99%
	42	<i>Pantoea dispersa</i>	1875	99%
	38	<i>Bacillus megaterium</i>	1838	99%
	47	<i>Bacillus cereus</i>	1862	99%
	48	<i>Bacillus kochii</i>	1831	99%
	49	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1888	99%
	76	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1881	99%
TOTAL		14 espécies		

- **Espécies bacterianas identificadas nas amostras de *A. darlingi* adultos provenientes do campo**

Foram identificadas 12 espécies bacterianas em amostras de mosquitos adultos selvagens. As bactérias *Pseudomonas nitroreducens*, *Pantoea agglomerans* e *Staphylococcus epidermidis* foram as mais prevalentes com dois representantes cada, as outras bactérias identificadas se mostram com apenas um representante (Tabela 6).

Foram identificadas um total de 39 espécies bacterianas em mosquitos de campo, destas, 23 são de espécies distintas, são elas: *Acinetobacter modestus*, *Acinetobacter nosocomialis*, *Aeromonas jandaei*, *Aquitalea magnusonii*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus cereus*, *Bacillus kochii*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus megaterium*,

Bacillus proteolyticus, *Bacillus thuringiensis*, *Chromobacterium amazonense*, *Chromobacterium rhizoryzae*, *Chromobacterium violaceum*, *Chryseobacterium arachidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Moraxella osloensis*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea dispersa*, *Pseudomonas chengduensis*, *Pseudomonas nitroreducens* e *Staphylococcus epidermidis*.

Tabela 6. Bactérias identificadas em amostras de mosquitos adultos oriundos do campo.

ESTÁGIO	COD.	GÊNERO/ESPÉCIE	SCORE	IDENT. NCBI
ADULTO	43	<i>Pantoea dispersa</i>	1797	98%
	63	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1463	99%
	65	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	1855	99%
	67	<i>Pantoea dispersa</i>	1844	99%
	68	<i>Moraxella osloensis</i>	1784	99%
	74	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1847	99%
	75	<i>Pantoea agglomerans</i>	1825	99%
	77	<i>Pantoea agglomerans</i>	1794	98%
	62	<i>Bacillus cereus</i>	1847	99%
	64	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1857	99%
	69	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1877	99%
	78	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1868	99%
TOTAL		12 espécies		

No presente estudo a composição de bactérias presentes em mosquitos de laboratório mostrou-se bem distinta em relação a mosquitos capturados no campo. Das bactérias identificadas em todas as amostras, apenas três estão presentes, tanto em mosquitos de laboratório como em mosquitos selvagens, estas espécies são: *Acinetobacter nosocomialis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas nitroreducens*. Além disso, foi observado que a composição de bactérias dos mosquitos de campo foi maior do que a dos mosquitos de laboratório.

Assim como em nossos achados, Duguma et al., (2015), relatam também essa variação de espécies bacterianas em mosquitos de ambientes diferentes. Neste estudo de análise do desenvolvimento e sucessão da microbiota de mosquitos do gênero *Culex*, as comunidades bacterianas encontradas em larvas criadas em laboratório foram significativamente menos diversificadas quando comparadas com aquelas encontradas em larvas coletadas em campo.

Alguns autores sugerem que grande parte da microbiota nativa de mosquitos pode ser perdida ao longo de gerações, quando criados em condições de laboratório (STUBBENDIECK et al., 2016; HEGDE et al., 2018). No entanto no estudo de Wang

et al., 2011, foi relatada a predominância de alguns grupos bacterianos em mosquitos adultos independentemente do habitat.

Akorli et al., (2018), em um estudo para verificar a composição e a diversidade da microbiota intestinal de *A. gambiae*, verificaram que ocorreu uma perda significativa da microbiota após dez gerações em laboratório e apenas dois gêneros *Microbacterium* e *Sphingomonas* foram identificados em mosquitos de campo e laboratório presentes ao longo das gerações.

Os seguintes resultados podem ocorrer devido o ambiente de laboratório ser mais controlado, apresentando menos efeitos de fatores externos naturais, outros fatores no laboratório também podem causar mudanças na água de criação das larvas durante a manutenção do mosquito, podendo alterar significativamente a composição da sua microbiota. No entanto a presença dos mesmos grupos bacterianos em mosquitos selvagens e criados em laboratório, sugere que existe uma seleção do microbioma dos mosquitos (STUBBENDIECK et al., 2016; HEGDE et al., 2018; AKORLI et al., 2018).

Espécies bacterianas com indícios de transmissão transestadial em *A. darlingi* criados em laboratório

A transmissão transestadial é uma característica imprescindível para abordagens paratransgênicas, pois é importante que uma bactéria adquirida do habitat aquático, nos estágios imaturos, consiga sobreviver até a fase adulta e colonizar o intestino médio dos mosquitos, onde ocorre o gargalo do ciclo de vida do *Plasmodium* spp (PUMPINI et al., 1996; BRIONES et al., 2008; CONN et al., 2014).

Nesse estudo, consideramos como indícios de transmissão transestadial bactérias presentes em pelo menos dois estágios do mosquito *A. darlingi*. Do total de espécies identificadas em mosquitos de laboratório quatro espécies apresentaram indícios da transmissão são elas: *Chryseobacterium vietnamense*, *Enterobacter asburiae*, *klebsiella pneumoniae* e *Microbacterium proteolyticum*.

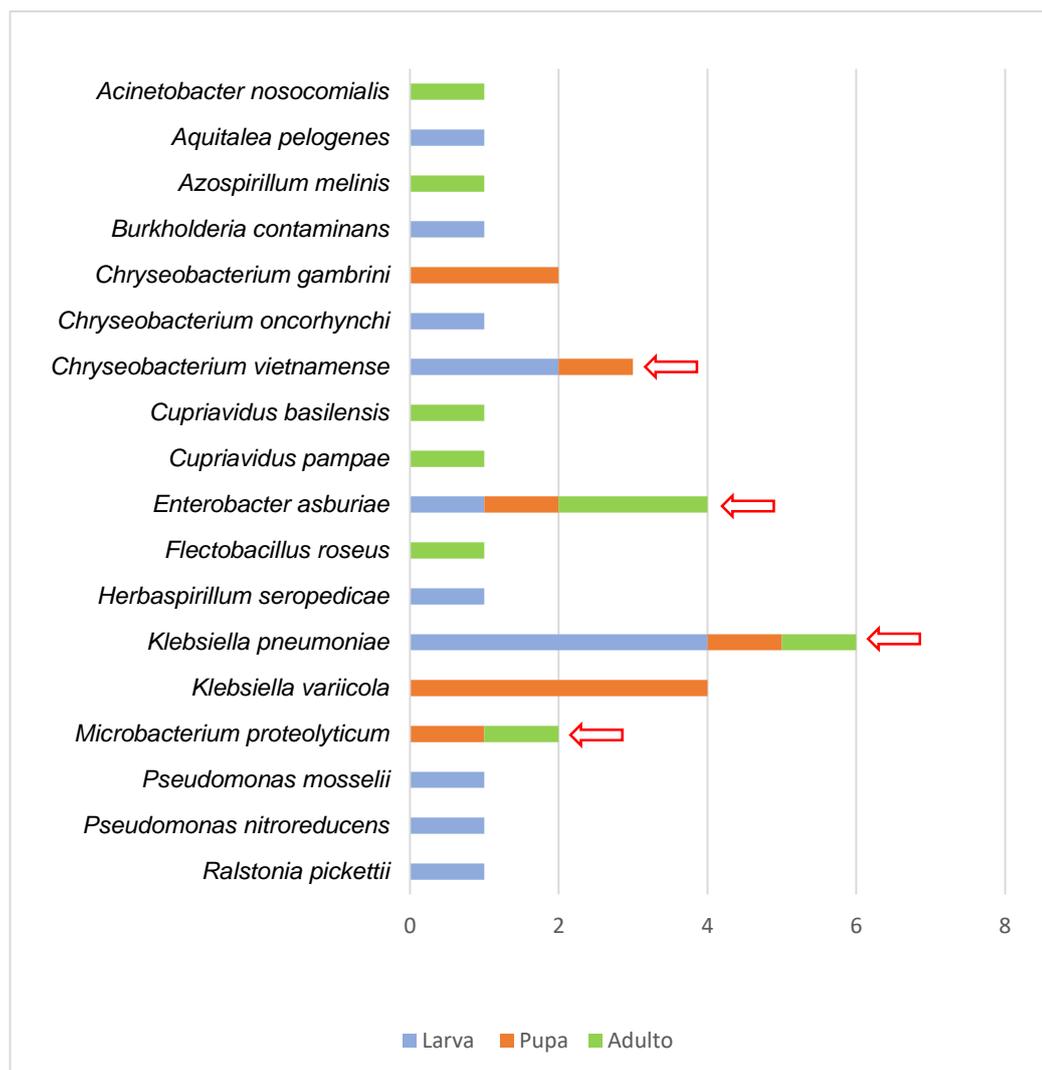


Figura 10. Espécies bacterianas detectadas nas amostras de mosquitos oriundos de laboratório.

A bactéria *C. vietnamense* identificada neste estudo, em larvas e pupas, apresentando indícios de transmissão transestadial, é uma bactéria gram-negativa, comumente isolada de solo e água, ainda não há relatos desta espécie em associações com mosquitos *Anopheles* spp. No entanto o gênero *Chryseobacterium*, já foi identificado em associação com *A. darlingi* (ROCHA, 2015; SERRAO, 2019). Esta espécie pertence a um gênero bacteriano que está relacionado com processos infecciosos em seres humanos, não sendo útil para abordagens paratransgênicas (OZCAN et al., 2013).

Outra bactéria que apresentou indícios desse tipo de transmissão é *E. asburiae*, presente em larvas, pupas e adultos de *A. darlingi*, apresentando um forte indício de transmissão transestadial. É uma espécie gram-negativa comumente descrita em

associação com mosquitos vetores de doenças. Chandel et al., (2013), detectaram *E. asburiae* no trato intestinal de *Culex quinquefasciatus*. Nos estudos de Yadav et al., (2016), a espécie foi a segunda mais prevalente em *Aedes albopictus*, alimentados com solução açucarada. Em mosquitos *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 esta bactérias (DONG et al., 2009). Esta espécie é considerada oportunista, entretanto, pode ser utilizada em testes paratransgênicos (YIN et al., 2016).

A espécie *k. pneumoniae* identificada em larvas, pupas e adultos em nosso estudo é uma bactéria gram-negativa comumente encontrada em ambientes naturais, também pode ser encontrada no trato intestinal de seres humanos e diferentes animais (BRISSE et al., 2006). Esta espécie já foi descrita em associações a espécies de mosquitos. Straif et al., (1998), identificaram a bactéria *k. pneumoniae* em mosquitos *Anopheles spp.* no Quênia e Mali. Outros autores também identificaram essa espécies em seus estudos em mosquitos vetores de doenças (ALVES et al., 2010; NGO et al., 2015; BERHANU et al., 2019,). Em *A. darlingi*, Serrão, (2019), identificou *k. pneumoniae* em ovos do mosquito, na investigação da microbiota desse vetor. É uma bactéria que possui diferentes fatores de virulência por isso é extremamente patogênica e apresenta resistência a uma diversidade de antimicrobianos, não sendo útil para uso em abordagens paratransgênicas (OLIVEIRA et al., 2011).

A bactéria *M. proteolyticum*, uma espécie gram-positiva conhecida como uma bactéria endofítica é comum sua associação com diferentes espécies de plantas (LIU et al.,2016). No presente estudo, *M. proteolyticum* foi identificada em pupas e adultos, mas ainda não há relatos desta espécies em mosquitos *Anopheles*. No entanto este gênero bacteriano já foi descrito em associação com *A. darlingi* em um estudo realizado por Rocha, (2015). Por se tratar de uma espécie gram-positiva, apresenta maior dificuldade nos processos de transformação genética, não se apresentando como uma boa candidata para o uso em abordagens paratransgênicas.

As outras espécies bacterianas identificadas nas amostras de mosquitos de laboratório mostraram-se presentes em apenas um dos estágios de desenvolvimento do mosquito, não apresentando, portanto, indícios de transmissão transtadial nos estágios de desenvolvimento de *A. darlingi*. No entanto, não é

possível descartar essa possibilidade, pois não foi possível identificar todas as amostras bacterianas presentes em mosquitos de laboratório.

Espécies bacterianas com indícios de transmissão transestadial em *A. dalingi* criados no campo

Na identificação de espécies bacterianas em amostras de mosquitos selvagens, cinco espécies se mostraram com indícios de transmissão transestadial são elas: *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Pantoea agglomerans* e *Pantoea dispersa*.

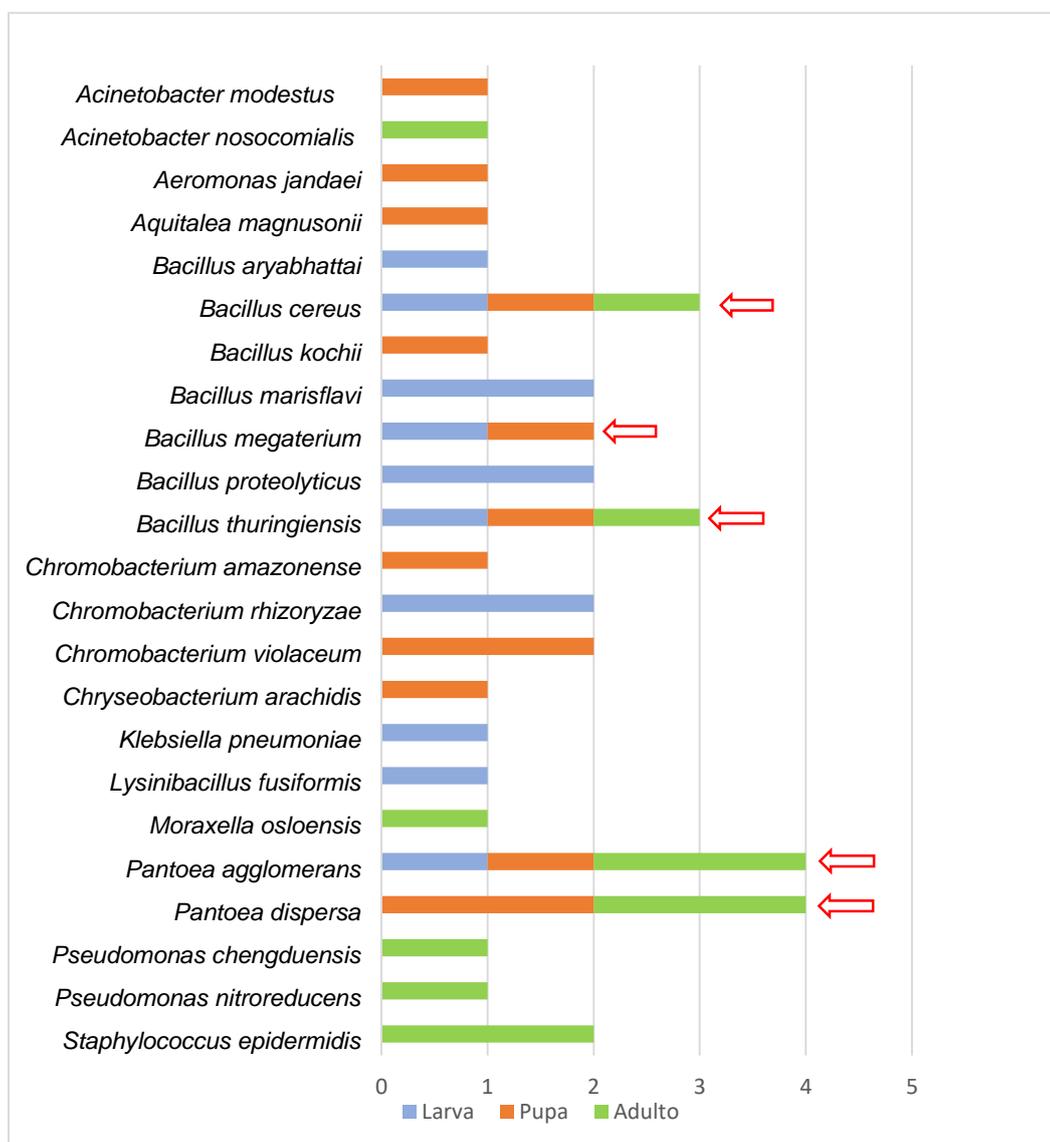


Figura 11. Espécies bacterianas detectadas nas amostras de mosquitos selvagens.

A espécie *B. cereus* foi identificada em nossos estudos em larvas, pupas e adultos, apresentando, portanto, indícios de transmissão transestadial. É uma bactéria gram-positiva comumente isolada do solo e amplamente distribuída na natureza. Esta bactéria já foi identificada em diferentes espécies de mosquitos (STRAIF et al., 1998; RANI et al., 2009). Nos estudos de Alves et al., (2010), para verificar a composição da microbiota de diferentes culicídeos do Estado do Pará-Brasil, esta bactéria foi identificada em larvas de *Cúlex* spp. e *A. triannulatus*. Em associação com *A. darlingi*, esta espécie está sendo realçada pela primeira vez.

Cepa de *B. cereus* produzem diferentes tipos de toxinas que são comumente relacionada com intoxicações alimentar. São bactérias que foram endosporos e conseguem resistir a altas temperaturas, não se apresentando como boas candidatas para o uso na paratransgênese (KOTIRANTA et al., 2000).

A bactéria *B. megaterium* foi identificada no presente estudo em larvas e pupas, também apresentando indícios de transmissão transestadial. É uma bactéria gram-positiva formadora de endosporo, pode ser encontrada em diversos habitats, principalmente no solo. Esta espécie já foi indentificas em associação com diferentes mosquitos (STRAIF et al., 1998; ROCHA, 2015; LOPES-ORDONEZ et al., 2018). A mesma é utilizada na indústria, devido ao potencial de produzir enzimas anti-fúngicas e antivirais (VARY et al., 2007). É uma bactéria que tem potencial biotecnológico, no entanto por se tratar de uma bactéria gram-positiva os mecanismos para transformação genéticas são mais difíceis quando comparados com bactérias gram-negativas (SHARK et al., 1991), não sendo viáveis para aplicações na paratransgênese.

Outra bactéria que apresentou indícios de transmissão transestadial foi *B. thuringiensis*, estando presente em larvas, pupas e adultos do mosquito. Esta espécie é gram-positiva, comumente isolada do solo, plantas e insetos, incluindo o mosquito *A. darlingi* (STRAIF et al., 1998; PIDIYAR et al., 2004; CHAVSHIN et al., 2014; ROCHA, 2015).

Uma característica típica da espécie é a produção de cristais protéicos, conhecidas como proteínas *Cry*, que em geral, ocorre durante a esporulação. Estes cristais apresentam atividade entomopatogênica para várias espécies de insetos, *B. thuringiensis* se apresenta uma uma importante ferramenta para o controle biológico de doenças vetórias, devido a sua capacidade bioinseticida (SCHNEPF et

al., 1998; AZEVEDO et al., 2000; BRAR et al., 2006). No entanto para abordagens paratransgênicas não se apresenta como uma potencial candidata.

A espécie *P. agglomerans* foi identificadas em nossos estudos em larvas e pupas e adultos, apresentando indícios de transmissão transestadial, é uma bactéria gram-negativa, considerada um simbiote de mosquitos anofelinos, por isso tem despertado bastante interesse na paratransgênese. Esta bactéria já foi transformada para expressar proteínas anti-*Plasmodium* e obteve sucesso no bloqueio do desenvolvimento do patógeno dentro do mosquito (BISI e LAMPE, 2011; WANG et al., 2012). Devido a essas características é considerada uma forte candidata para uso na paratransgênese.

A espécie *P. dispersa* foi identificada em nosso estudo em pupas e adultos, é uma bactéria gram-negativa, também já foi relatada sua associação com mosquito do gênero *Anopheles*, *Cúlex* e *Aedes* (WANG et al., 2012; CHANDEL et al., 2013; YADAV et al., 2016). Em *A. darlingi* foi identificada em amostra de estômago e ovários (ARRUDA, 2017; SERRÃO, 2019). É uma bactéria que apresenta potencial para uso na paratransgênese.

Das bactérias que apresentaram indícios de transmissão transestadial, apenas três se mostraram com grande potencial para uso nessa nova abordagem são elas: *E. asburiae*, *P. agglomerans* e *P. dispersa*, e foram testadas quanto capacidade de transformação genética.

Teste de transformação genética em isolados bacterianos

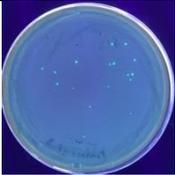
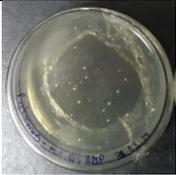
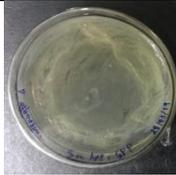
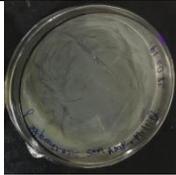
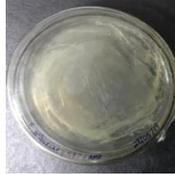
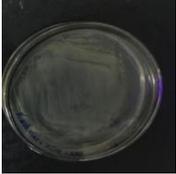
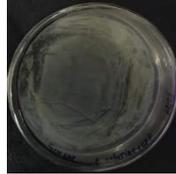
Bactérias gram-negativas apresentam características importantes na inibição de *Plasmodium* spp. , como relatado por inúmeros estudos (PUMPUNI et al., 1993; GONZALEZ-CERON et al., 2003; BOISSIÈRE et al., 2012). Desta forma, três cepas bacterianas gram-negativas identificadas neste estudo foram selecionadas 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.

As três espécies selecionadas, *E. asburiae* e *P. agglomerans* e *P. dispersa* apresentaram indícios de transmissão transestadial em *A. darlingi*. A bactéria *P. agglomerans* é considerada um simbiote promissor na paratransgenia e *P. dispersa* já foi 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).

Dentre as bactérias utilizadas para transformação genética, *P. agglomerans* (cepa EP4.4) foi a única espécie que incorporou o plasmídeo contendo o gene da proteínas GFP, como mostrado na (Tabela 7).

Tabela 7. Testes de transformação bacteriana com as três cepas selecionadas.

	Ampicilina + Bactéria com GPF	Ampicilina + Bactéria sem GFP	Sem ampicilina + Bactéria com GFP	Sem ampicilina + Bactéria sem GFP
<i>P. agglomerans</i>				
<i>P. dispersa</i>				
<i>E. asburiae</i>				

No trabalho de Wang et al., (2012), esta espécie em questão foi utilizada em testes de paratransgenia. Seus resultados demonstraram que *P. Agglomerans*, contendo plasmídeo com o gene da proteína GFP, colonizou com sucesso o corpo de *A. gambiae* e *A. stephensi* durante todas as suas fases de desenvolvimento, espalhando-se rapidamente entre as populações de mosquitos.

No entanto, nos testes de transformação genética realizados, neste trabalho, 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.

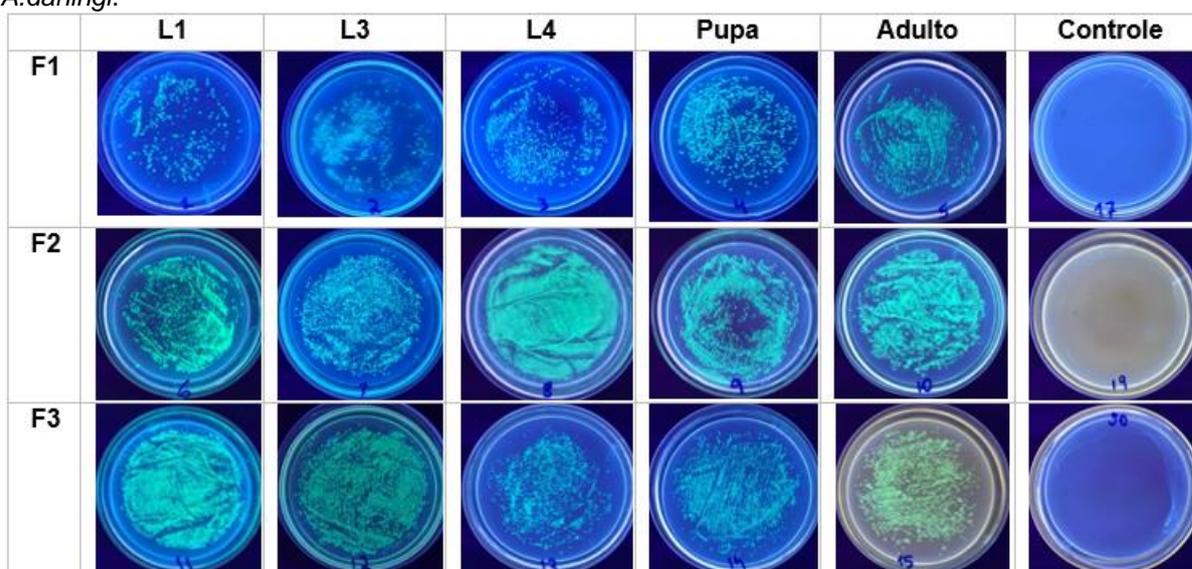
Testes de monitoramento transestadial de *P. agglomerans* cepa (EP4.4), transformada com o plasmídeo pKS1-GFP em *A. darlingi*

A cepa (EP4.4), identificada como *P. agglomerans*, transformada geneticamente com o plasmídeo pKS1-GFP, foi monitorada durante os estágios de desenvolvimento de *A. darlingi*, a partir de larvas eclodidas em laboratório, compreendendo as larvas de primeiro a quarto instar, pupas e adultos.

No presente estudo foi possível observar a presença de *P. agglomerans*-GFP nos diferentes estágios de desenvolvimento de *A. darlingi*, mesmo após as ecdises, as bactérias conseguiram ser transferidas transestadialmente de larvas para pupas e depois para os adultos.

Os resultados do monitoramento apresentaram-se expressivos quanto a prevalência de *P. agglomerans*-GFP na presença do indutor ampicilina nas bandejas de criação (Tabela 8).

Tabela 8. Prevalência de bactérias *P. agglomerans*-GFP nos estágios de desenvolvimento de *A. darlingi*.



*L1, L3 e L4 compreendem larvas de primeiro a quarto instar.

*F1, F2 e F3 compreendem as fêmeas utilizadas para a obtenção das larvas.

*Controle compreende o meio LB sem o plaqueamento das amostras.

Foi possível observar que algumas colônias bacterianas também cresceram nas placas com ampicilina, juntamente com as colônias que expressam a proteína verde fluorescente (Figura 12). Isso demonstra o crescimento de colônias satélite e possivelmente o crescimento de bactérias naturalmente resistentes à ampicilina e que também estão em associação com mosquitos anofelinos.

Bactérias com resistência a antibióticos são comumente encontradas na natureza, tais organismos podem adquirir genes de resistência adicionais a partir de bactérias introduzidas no solo ou na água, e as bactérias residentes podem ser o reservatório ou a fonte de organismos resistentes disseminados encontrados em muitos ambientes (ASH et al., 2002).

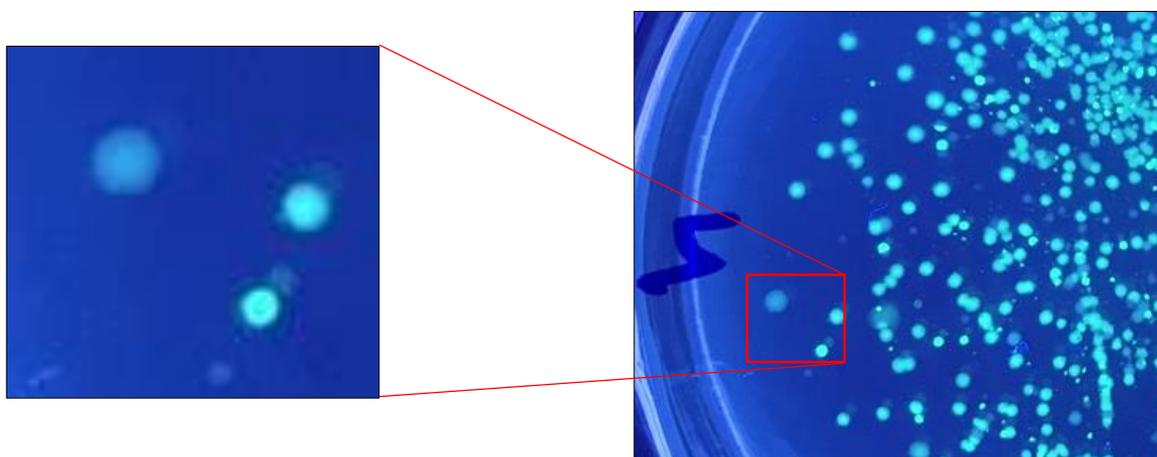


Figura 12. Placa de Petri com colônias de *P. agglomerans* transformadas, expressando a proteína verde florescente e algumas colônias não expressando.

A transmissão transtetadial bem sucedida de *P. agglomerans*-GFP abre caminho para o uso desta cepa em abordagens paratransgênicas, visto que a transmissão transtetadial é uma característica muito importante para o sucesso desta abordagem.

No estudo de Chavshin et al., (2015), a cepa *Pseudomonas* BND-YL1 foi transformada com um plasmídeo GFP que expressa a proteína verde florescente, e foi visualizada no intestino de larvas, pupas e adultos de *A. stephensi*, por microscopia florescente e confirmada por amplificação por PCR do gene GFP, neste estudo também foi observado uma intensa colonização no túbulos de Malpigh, o qual pode ser um fator determinante para a transmissão transtetadial.

Inserir um simbiote geneticamente modificado em populações selvagens seria mais viável no estágio larval, onde as larvas dos mosquitos estão concentradas em

seus locais de reprodução e também se alimentam em grande parte de bactérias (CHAVSHIN et al., 2015).

Portanto, nestes resultados do monitoramento, *P. agglomerans* apresentou a capacidade de transmissão transestadial, essa característica pode ser um passo importante pra o uso dessa cepa em abordagem paratransgênicas para o controle da malária.

Hipoteticamente, com o sucesso da prevalência dessa cepa, podem ser adicionados genes *Anti-Plasmodium* na sequência de nucleotídeos do plasmídeo pKS1-GFP que expressa a proteína fluorescente verde e em seguida realizar os testes paratransgênicos, algo pioneiro na Região Amazônica do Brasil.

CONCLUSÕES

O mosquito *Anopheles darlingi* apresenta grande diversidade bacteriana em sua microbiota cultivável, no presente estudo foi possível isolar 166 bactérias cultiváveis presentes em amostras de larvas, pupas e adultos de *A. darlingi*, dentre as quais 72 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 dentro do mosquito.

Na análise taxonômica foram detectados quatro filos comuns entre mosquitos (Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes) e 20 gêneros, com a prevalência dos gêneros *Bacillus* e *klebsiella*. Sete novos gêneros foram identificados em associação com *A. darlingi* são eles: *Lysinibacillus*, *Aquitalea*, *Azospirillum*, *Flectobacillus*, *Herbaspirillum*, *Moraxella* e *Ralstonia*.

As bactérias com mais representantes nas amostras de larvas, pupas e adultos de laboratório foram *E. asburiae* com quatro representantes e *klebsiella pneumoniae* com seis representantes. E de mosquitos selvagens foram as bactérias *Pantoea agglomerans* e *P. dispersa* com quatro representantes cada.

Após a análise taxonômica, quatro espécies apresentaram indícios de transmissão transestadial em mosquitos de laboratório e cinco em mosquitos selvagens. Três espécies foram submetidas a transformação genética (*E. asburiae*, *P. dispersa* e *P. agglomerans*), a bactéria que apresentou melhor resultado foi

P. agglomerans, a qual conseguiu incorporar o plasmídeo e expressar a fluorescência verde, sendo esta apta para utilização nos testes de transmissão transestadial.

A bactéria *P. agglomerans* foi transmitida de forma transestadial nas fases de desenvolvimento testadas, em *A. darlingi*, apresentando um perfil promissor para futura utilização em abordagens paratransgênicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de bactérias transmitidas transestadialmente em mosquitos *A. darlingi* se deve a capacidade que as mesmas possuem em sobreviver ao processo de metamorfose dos mosquitos, passando do estágio de larva para o mosquito adulto. Neste contexto, a cepa (EP4.4), identificada neste estudo como *P. agglomerans*, transformada geneticamente com o plasmídeo pKS1-GFP apresentou 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

AKORLI, J.; GENDRIN, M.; PELS, NAP.; YEBOAH-MANU, D.; CHRISTOPHIDES G. K.; WILSON M. D. **Seasonality and locality affect the diversity of *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* midgut microbiota from Ghana.** PLOS ONE, v.11(6), p. 1-18, 2016.

ALVES, W. C. L.; GORAYEB, I. S.; LOUREIRO, E. C. B. **Bactérias isoladas de culicídeos (Diptera: Nematocera) hematófagos em Belém, Pará, Brasil.** Revista Pan-Amazônica de Saude, v. 1(1), p. 131-142, 2010

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.

ASH R. J.; MAUCK, B.; MORGAN, M. **Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacteria in Rivers, United States.** Emerging Infectious Diseases, v. 8 (7), p. 713-716, 2002.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, J. R. W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. **Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on**

tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology, Salt Lake City, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

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.

BERHANU, A.; ABERA, A.; NEGA, D.; MEKASHA, S.; FENTAW S.; ASSEFA, A.; GEBREWOLDE, G.; WULETAW, Y.; ASSEFA, A.; DUGASSA, S.; TEKIE, H.; TASEW, G. **Isolation and identification of microflora from the midgut and salivary glands of *Anopheles* species in malaria endemic areas of Ethiopia.** BMC Microbiology, v. 19(85), p. 1-8, 2019.

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.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. **Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides.** Process Biochemistry, New York, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.

BRISSE, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT P. A. D. **The Genus *Klebsiella*.** In: Dworkin, M.; Falkow S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H., Stackebrandt E. (eds). **The Prokaryotes.** Springer, New York, NY, 2006.

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 *Culexquinquefasciatus* 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.

DUGUMA, D.; HALL, M. W.; RUGMAN-JONES, P.; STOUTHAMER, R.; TERENIUS, O.; NEUFELD, J. D.; WALTON, W. E. **Developmental succession of the microbiome of *Culex* mosquitoes**. BMC Microbiology, v. 15(140), p. 1-15, 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 (USA), 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.

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.

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.

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.

HEGDE S, KHANIPOV K, ALBAYRAK L, GOLOVKO G, PIMENOVA M, SALDAÑA M A; ROJAS M. M.; HORNETT, E. A.; MOTL, G. C.; FREDREGILL, C. L.; DENNETT, J. A.; DEBBOUN M.; FOFANOV, Y.; HUGHES, G. L. **Microbiome interaction networks and community structure from laboratory-reared and field-collected *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* mosquito vectors.** *Frontiers in Microbiology*, v. 9 (2160), p. 1-16, 2018

KABULA, B., TUNGU, P.; MALIMA, R.; ROWLAND, M.; MINJA, J.; WILILO, R.; RAMSAN, M.; MCELROY, P. D.; KAFUKO, J.; KULKARNI, M.; PROTOPOPOFF, N.; MAGESA, S.; MOSHA, F.; KISINZA, W. **Distribution and spread of pyrethroid and DDT resistance among the *Anopheles gambiae* complex in Tanzania.** *Medical and Veterinary Entomology*. v. 28 (3), p. 244–252, 2013.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. **Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections,** *Microbes and Infection*, v.2 (2), p. 189-198, 2000.

LIMA, L. M. **Conceitos Básicos em Biologia Molecular.** Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA200909/22214/1/DOC191.pdf>. Acesso em: 20 de janeiro de 2019.

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

LINDH, J. M.; BORG-KARLSON A. K.; FAYEA, I. **Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water.** *Acta Tropica*, v.107, p. 242–250, 2008.

LIU, Y. H.; GUO, J.W.; SALAM, N.; LI, L.; ZHANG, Y. G.; HAN, J.; MOHAMAD, O. A.; LI, W. J. **Culturable endophytic bacteria associated with medicinal plant *Ferula songorica*: molecular phylogeny, distribution and screening for industrially important traits.** *Biotech*, v. 6 (209), p. 1-9, 2016.

LOPEZ-ORDONEZ, T.; FLORES-LÓPEZ, C. A.; MONTEJO-LOPEZ, R.; CRUZ-HERNANDEZ, A.; CONNERS, E. E. **Cultivable Bacterial Diversity in the Gut of the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata*: Identification of Possible Bacterial Candidates for a Paratransgenesis Approach.** *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 5(174), p. 1-9, 2018.

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.

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.

MORO, C. V.; TRAN, F. H.; RAHARIMALALA, F. N.; RAVELONANDRO, P.; Mavingui, P. **Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus***. BMC Microbiology, v. 13 (70), p. 1-11, 2013.

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.

NGO, C. T.; AUJOUAT, F.; VEAS, F.; JUMAS-BILAK, E.; MANGUIN, S. **Bacterial Diversity Associated with Wild Caught *Anopheles* Mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam Using Culture and DNA Fingerprint**. PLoS ONE, v. 10 (3), p.1-18, 2015.

NGO, C. T.; ROMANO-BERTRAND, S.; MANGUIN, S.; JUMAS-BILAK, E. **Diversity of the Bacterial Microbiota of *Anopheles* Mosquitoes from Binh Phuoc Province, Vietnam**. Frontiers in Microbiology, v. 7(2095), p.1-11, 2016.

NILSSON, L. K. J.; OLIVEIRA, M. R.; MARINOTTI, O.; 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, C. B. S.; DANTAS, V. C. R.; NETO, R. M.; AZEVEDO, P. R. M.; MELO, M. C. N. **Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal/RN durante 10 anos**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 47 (6), p. 589-594, 2010.

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.

OZCAN, N. et al. **Is *Chryseobacterium indologenes* a shunt-lover bacterium? A case report and review of the literature**. Le Infezioni in Medicina, n. 4, p. 312-316, 2013.

PIDIYAR, V. J.; JANGID, K.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y. S. **Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal rna gene analysis**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 70(6), p. 597-603, 2004.

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.

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

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. V.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** Microbiology and Molecular Biology Review, Washington, v. 62, p. 775-806, 1998.

SERRAO, D. M. **Bioprospecção de bactérias cultiváveis isoladas de *anopheles darlingi* ROOT, 1926 para o controle da malária por paratransgênese.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). 85f, 2019.

SERVICE, M. W. **Mosquito ecology: Field sampling methods.** Halsted, New York, 1993.

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.

SHARK, K. B.; SMITH, F. D.; HARPENDING, P. R.; RASMUSSEN, J. L.; SANFORD, J. C. **Biolistic Transformation of a Procaryote, *Bacillus megaterium*.** Applied and Environmental Microbiology, v.57(2), p. 480-485, 1991.

STRAIF, S. C.; MBOGO, C. N. M.; TOURE, A. M.; WALKER, E. D.; KAUFMAN, M.; TOURE, Y. T.; BEIER, J. C. **Midgut Bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. Funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali.** Journal of Medical Entomology, v. 35(3), p. 222-226, 1998.

STUBBENDIECK, R. M.; VARGAS-BAUTISTA, C.; STRAIGHT, P. D. **Bacterial Communities: Interactions to Scale.** Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 1-19, 2016.

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.; SANTOS, J. M. M.; RODRIGUES, I. B.; RAFAEL, M. S. **Malária e Dengue na Amazônia: vetores e estratégias de controle.** Pesquisa Científica e Tecnologia em Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília. Cap. MCT-INPA. p.112-125, 2010.

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. **Adaptative processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region.** Hydrobiologia, v. 789 (1), p. 1-18, 2017.

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.

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.

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), 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.

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

WEISS, B.; AKSOY, S. **Microbiome influences on insect host vector competence**. *Trends In Parasitology*, V. 27(11), P. 514-522, 2011.

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.

MATERIAL COMPLEMENTAR

Metodologia detalhada

A área de estudo está situada no Município de Manaus-Am, mais precisamente no bairro Puraquequara, cuja coordenada geográfica é 3°02'33.5"S 59°53'15.6"W - Google Maps (Figura 13). 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 das larvas
Fonte: Google Maps

Coleta das larvas e identificação taxonômica

Larvas e pupas de *A. darlingi* foram coletadas, utilizando concha entomológica padrão, de capacidade volumétrica de 350 ml, abertura de 11 cm e cabo de manuseio de um metro (Figura 14). Triagens preliminares foram realizadas *in locu*, com apoio de técnicos especialistas em identificação de larvas de *A. darlingi* do Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Em seguida foram transferidas para depósitos de plásticos esterilizados e armazenados em isopor com gelo para o transporte até o laboratório.



Figura 14. Coletas de larvas e pupas
Fonte: Acervo do autor

Manutenção das larvas no laboratório

No laboratório as larvas foram colocadas em bandejas esmaltadas (Figura 15) com água do próprio criadouro e foram mantidas sob condições de umidade e temperatura controladas e com alimentação específica três vezes ao dia, até se transformarem em pupas e mosquitos adultos, De acordo com o POP (protocolo operacional padrão utilizado no laboratório de Malária e Dengue do INPA).



Figura 15. Manutenção em condições de laboratório
Fonte: Acervo do autor

Plaqueamento e isolamento bacteriano das amostras de larvas e pupas

As amostras de larvas e pupas foram lavadas por imersão em água estéril e etanol 70%, maceradas, centrifugadas e plaqueadas (Figura 16 A). Apenas três amostras de larvas e três de pupa de cada prole foram utilizadas neste processo de plaqueamento, o restante das larvas foram mantidas até a emergência dos adultos.

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.

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 (Figura 16 B). Novamente as placas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

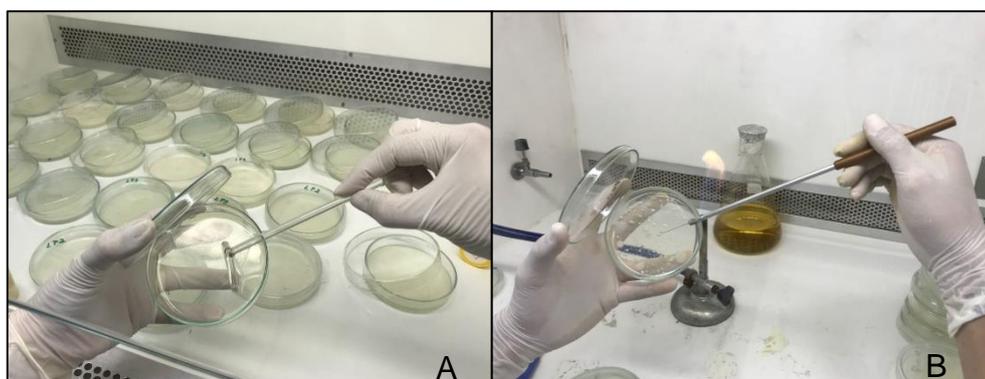


Figura 16 A: Plaqueamento das amostra e Figura16 B: Método de esgotamento por estrias cruzadas

Fonte: acervo do autor

Dissecção, plaqueamento e isolamento bacteriano de amostras estômagos

Conforme descrito por Consoli e Oliveira (1994), a dissecção do sistema digestivo dos mosquitos, para obtenção dos estômagos, foi feita da seguinte forma: A fêmea foi sacrificada a uma temperatura $\pm 18^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, em seguida foi colocada sobre uma lâmina microscópica limpa, com o ventre voltado para cima e uma gota de solução de NaCl_2 a 0,9% sobre ela. Na lupa, com auxílio de pinças finas e estiletos, foram removidas as asas e pernas e em seguida foi feito um pequeno corte no tegumento do 7º segmento que foi tracionado lentamente com o estilete na mão direita, enquanto o tórax era segurado com a pinça na mão esquerda. O estômago então foi separado das demais estruturas removidas (Figura 17).

Após a dissecção, os estômagos 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. Depois de centrifugada, cada

amostra foi ressuspensa em 200 μ L 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. As placas continham meio de cultivo sólido Nutriente Ágar (NA) com fluconazol, este favorece apenas o crescimento bacteriano.



Figura 17. Dissecção dos estômagos de *A. darlingi*
Fonte: Acevo do autor

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 Cruzadas, com auxílio de uma alça de platina embebida em álcool 70% e flambada em chama no bico de Bunsen (Figura 18 A). 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 (Figura 18 B). 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 μ L 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 μ L 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.

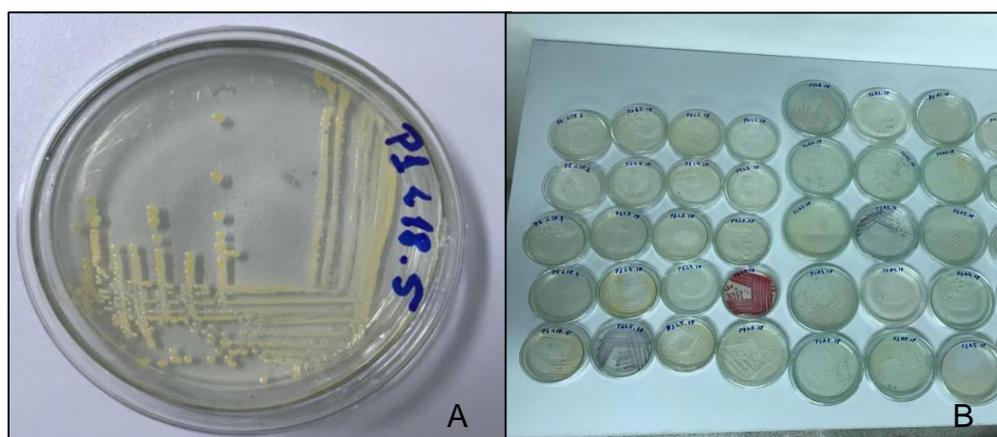


Figura 18 A: Purificação das amostras por Estrias Cruzadas e Figura 18 B: Caracterização das colônias isoladas

Fonte: Acervo do autor

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 larvas, pupas e adultos 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 amplificação de um fragmento de aproximadamente 1100 pb do rRNA bacteriano 16S, visando realizar a identificação molecular. Para esta etapa foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 9):

Tabela 9. Primers utilizados no estudo

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 μ L 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 40 seg 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) de acordo com as recomendações 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 em tubos coletores estéreis de 2 mL, em seguida foram levados para centrifugação a 10.000 g por 30 s.

As amostras resultantes da homogeneização 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 seqüências consenso

As amostras de DNA purificadas foram previamente quantificadas em Fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Para o sequenciamento utilizou-se um alíquota de 50ng de DNA purificado como matriz, kit BigDyeTerminator 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 3min, Desnaturação das fitas moldes 95°C 30s, Pareamento do iniciador 58°C 30s, Extensão 60°C 30s, Extensão final 60°C 4min 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 seqüências. 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 seqüências processadas e de boa qualidade.

A partir da tabela de qualidade foi possível analisar individualmente as seqüências das amostras de cada primer e montar os consensosdos 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 seqüências 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 bacterianas selecionadas 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 19).

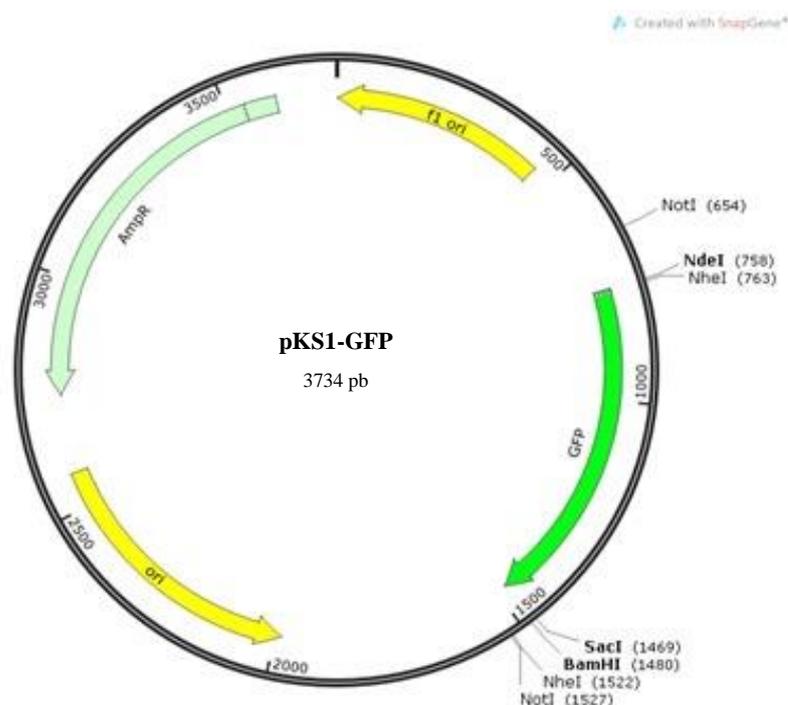


Figura 19. Plasmídeo Pks1-GFP.
Fonte: Laboratório de Tecnologia do DNA – UFAM.

Preparação de células eletrocompetentes

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

Após o crescimento bacteriano, 100 µL 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 x g por 30 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas foram ressuspendidas 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 x 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 ressuspendidas em 1 mL de glicerol 10%, distribuídas em microtubos estéreis (200 µL) devidamente etiquetados e foram estocadas em geladeira a -80°C.

Método de eletroporação

Em microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 100 µL de células eletrocompetentes e 2 µL 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 µL de bactérias transformadas com plasmídeo e bactérias controle em meio de cultivo LB sólido. 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 freezer a -80 °C para análises futuras.

Teste de monitoramento

As bactérias que conseguiram ser transformadas foram utilizadas nos teste de monitoramento.

Na etapa de monitoramento, foram utilizadas larvas recém eclodidas em laboratório, as mesmas foram colocadas em bandejas contendo água destilada e ampicilina (Figura 20). Em cada bandeja, contendo 200 mL de água destilada esterilizada foram adicionadas larvas de apenas uma fêmea. Em seguida, nesta água das larvas, foram adicionados 200 μ L na concentração de 2×10^8 UFC/mL de *P. Agglomerans*-GFP. Após 24 horas, as larvas foram retiradas e lavadas, uma a uma, com água destilada estéril, para retirar as bactérias da superfície de seus corpos e colocadas novamente em bandejas contendo também 200 mL de água destilada com ampicilina na concentração de 100 mg/mL. As larvas foram mantidas sob essas condições durante todo o experimento até a fase adulta.

Para verificar a presença de *P. agglomerans*-GFP nos estágios de desenvolvimento de *A. darlingi*, larvas de primeiro instar foram maceradas e plaqueadas em meio LB sólido, o mesmo ocorreu para larvas de terceiro e quarto instar, pupas e adultos. Após 24 horas as placas foram expostas à luz UV. O controle negativo foi realizado com a mesma cepa de *P. agglomerans* sem o plasmídeo pKS1-GFP.



Figura 20. Manutenção dos mosquitos no teste de monitoramento
Fonte: Acervo do autor

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

Tabela 10. Morfologia das colônias isoladas de larvas

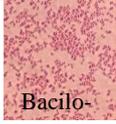
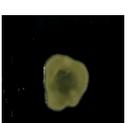
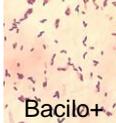
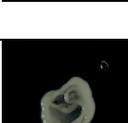
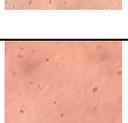
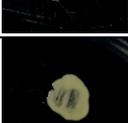
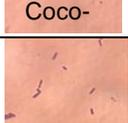
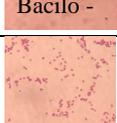
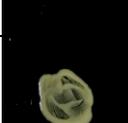
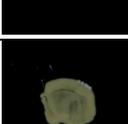
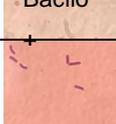
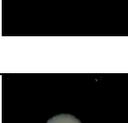
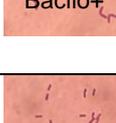
Cód	Colônia	Gram	Cód	Colônia	Gram	Cód	Colônia	Gram
5		Bacilo - 	30		Bacilo- 	45		Bacilo+ 
6		Bacilo 	31		Bacilo- 	46		Bacilo+ 
13		Coco + 	32		Vibrião - 	52		Bacilo+ 
14		Coco- 	33		Bacilo- 	53		Bacilo- 
15		Coco - 	35		Bacilo+ 	54		Bacilo- 
16		Bacilo- 	36		Bacilo+ 	70		Coco- 
19		Bacilo - 	37		Bacilo- 	73		Bacilo 
20		Bacilo - 	39		Bacilo 			
21		Bacilo - 	40		Bacilo+ 			
22		CoCO - 	44		Bacilo 			

Tabela 11. Morfologia das colônias isoladas de Pupas

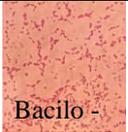
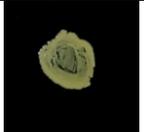
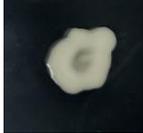
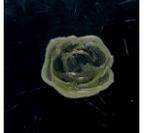
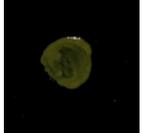
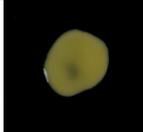
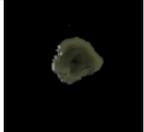
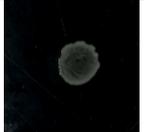
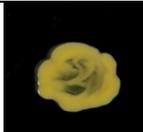
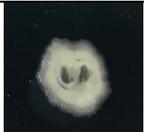
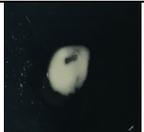
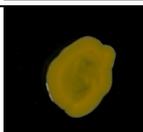
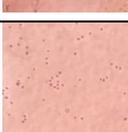
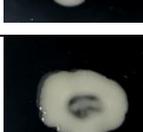
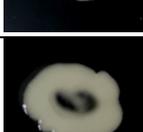
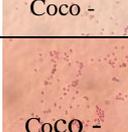
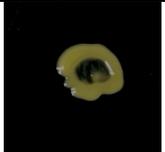
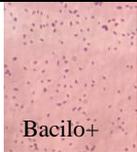
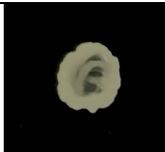
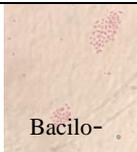
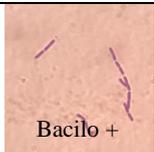
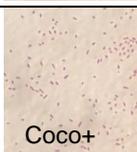
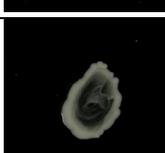
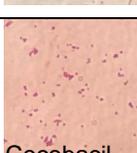
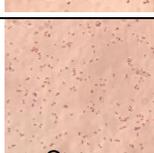
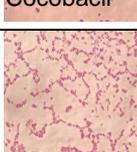
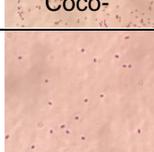
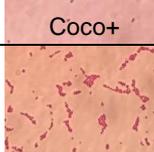
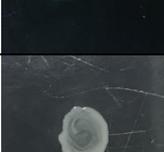
CÓD.	COLÔNIA	GRAM	CÓD.	COLÔNIA	GRAM	CÓD.	COLÔNIA	GRAM
1		 Bacilo -	38		 Bacilo+	61		 CocoBacil
2		 Coco-	41		 Bacilo-	66		 Coco-
3		 Bacilo+	42		 Bacilo -	71		 Cocobacilo
7		 Bacilo-	47		 Bacilo+	110		 Bacilo-
8		 Bacilo -	48		 Bacilo+			
10		 Bacilo-	49		 Bacilo+			
17		 Coco +	56		 Bacilo-			
23		 Coco -	57		 Bacilo			
24		 Coco -	59		 Bacilo-			
25		 CoCo -	60		 Cocobacilo-			

Tabela 12. Morfologia das colônias isoladas de Estômagos de adultos

CÓD.	COLÔNIA	GRAM	CÓD.	COLÔNIA	GRAM
4		 Bacilo+	62		 Bacilo+
11		 Bacilo	63		 Bacilo-
12		 Bacilo-	64		 Bacilo +
18		 Coco+	65		 Bacilo-
26		 Cocobacil	67		 Coco-
27		 Bacilo-	68		 Cocobacilo-
28		 Coco -	69		 Coco+
29		 Bacilo -	74		 Cocobacilo-
34		 Bacilo-	75		 Bacilo-
43		 Bacilo-	118		 Bacilo-