



**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA  
DA AMAZÔNIA LEGAL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA  
DA AMAZÔNIA LEGAL – PPG-BIONORTE**

**DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CULTIVÁVEIS ASSOCIADOS AO  
INTESTINO DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE) COM POTENCIAL À  
PARATRANSGÊNESE PARA O CONTROLE DA MALÁRIA**

**ANDRELISSE ARRUDA**

**PORTO VELHO-RO**

**2017**



**UFAM**

**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA  
DA AMAZÔNIA LEGAL**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL – PPG-BIONORTE**

**DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA**

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CULTIVÁVEIS  
ASSOCIADOS AO INTESTINO DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA:  
CULICIDAE) COM POTENCIAL À PARATRANSGÊNESE PARA O  
CONTROLE DA MALÁRIA**

**ANDRELISSE ARRUDA**

**PORTO VELHO-RO**

**2017**

**ANDRELISSE ARRUDA**

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CULTIVÁVEIS  
ASSOCIADOS AO INTESTINO DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA:  
CULICIDAE) COM POTENCIAL À PARATRANSGÊNESE PARA O  
CONTROLE DA MALÁRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Área de concentração: Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Almeida e Silva.

**PORTO VELHO-RO  
2017**

## Ficha Catalográfica

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

Arruda, Andreilisse  
A779i Identificação de microrganismos cultiváveis associados ao intestino de *Anopheles darlingi* (DIPTERA:CULICIDAE) com potencial à paratransgênese para o controle da malária / Andreilisse Arruda. 2017  
170 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre de Almeida e Silva  
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Microbiota de fezes. 2. Simbiontes. 3. Amazônia brasileira. 4. Pantoea. 5. Meyerozyma. I. Silva, Prof. Dr. Alexandre de Almeida e II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



150ª ATA DE DEFESA DE TESE

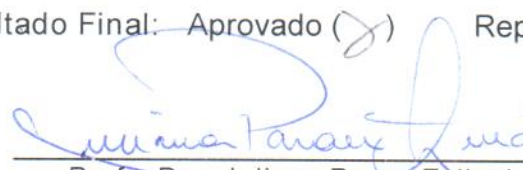
Aos trinta dias do mês de outubro de dois mil e dezessete, às 09:00 horas, na sala 103 do PPG- Biologia Experimental/UNIR/RO, a doutoranda Andre disse Arruda, defendeu sua Tese de Doutorado intitulada "Identificação de microorganismos cultivares associados ao intestino de Anopheles darlingi com potencial a paratransgênese para o controle da malária".

Banca de Examinadores:

Membros/ Instituição	Parecer	Assinatura
Dr. Alexandre de Almeida e Silva – UNIR CPF: 175.440.118-01	Aprovado (x) Reprovado ( )	A. Silva
Dr. Gabriel Eduardo Melim Ferreira – Fiocruz/RO CPF: 08292727751	Aprovado (x) Reprovado ( )	Gabriel Melim Ferreira
Dra. Paula Benevides de Moraes - UFT CPF: 611 458 746 49	Aprovado (x) Reprovado ( )	Paula Benevides de Moraes
Dra. Najla Benevides Matos - Fiocruz/RO CPF: 582 482. 422-34	Aprovado (x) Reprovado ( )	Najla B. Matos
Dra. Soraya dos Santos Pereira - Fiocruz/RO CPF: 739.335. 462-49	Aprovado (x) Reprovado ( )	Soraya S. Pereira

Porto Velho (RO), 30 de outubro de 2017.

Resultado Final: Aprovado (x)      Reprovado ( )

  
Prof. Dra. Juliana Pavan Zuliani  
Coordenador Estadual do PPG-BIONORTE/RONDÔNIA  
Dra. Juliana Pavan Zuliani  
Coordenadora PPG BIONORTE  
Portaria nº 298/2017/GR/UNIR  
SIAPE 1726461

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho  
Coordenador Geral do PPG-BIONORTE

## DEDICATÓRIA

Dedico a tese ao meu filho, Heitor Arruda dos Santos, que hoje está com 3 anos e ainda não teve a oportunidade de me conhecer na ausência do doutorado.

Meu filho, você foi planejado, gestado, nasceu e está crescendo muito rápido!

Então, aos 35 anos, desejo aproveitar muito a vida e as pessoas que amo.

E que possamos ser “felizes para sempre”, como você “sempre” diz, meu filho.

*“E que a minha loucura seja perdoada. Porque metade de mim é amor e a outra metade...também.”*

*Oswaldo Montenegro - Metade.*

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido ao longo de quase 5 anos e por ser tão multidisciplinar foi executado em diferentes locais. De 2013 a 2017 estive presente na Fiocruz-Rondônia, nos laboratórios Microbiologia Molecular, Engenharia de Anticorpos, Epidemiologia Genética e Entomologia; e também estive presente na Universidade Federal de Rondônia no laboratório de Entomologia-LABEIN. Nesse período muitas pessoas chegaram e tantas outras seguiram sua trajetória. Tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas que mudaram meu modo de enxergar a vida em muitos sentidos. Seja por uma boa conversa sobre ciência ou sobre a vida, vocês fizeram parte dessa história e me ajudaram a caminhar nesse percurso. Muito Obrigada!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre de Almeida e Silva, que me acolheu no momento mais difícil e me guiou ao longo desse caminho. Obrigada pelo apoio científico e emocional e por acreditar em mim e no desenvolvimento deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ao Dr. Rodrigo G. Stabeli, Dr. Luiz Shozo Ozaki, Dr. Leonardo Calderon e Dr. Luiz Herman por participarem do início desse trabalho.

Agradeço aos pesquisadores e professores Dra. Carla Celedônio, Dr. Cleberson Fernandes e Dra. Najla B. Matos, por tantas vezes que me orientaram. Ao Dr. Gabriel E. M. Ferreira, que me mostrou o caminho para as análises dos dados quando eu estava mais perdida. E também ao Dr. Leonardo E. O. Costa do IFRJ, que me indicou os primeiros caminhos para os classificadores taxonômicos e bancos de dados. Agradeço ao professor Dr. Carlos Gustavo N. da Silva, do Departamento de Biologia da UFAM, por ceder o plasmídeo contendo o gene repórter *Red Fluorescent Protein* e ao Professor Dr. Fernando Araripe Torres, da Biologia Molecular da UNB, por ceder uma cepa de *Pichia pastoris* expressando o gene *Enhanced Green Fluorescent Protein*. Agradeço à Dra. Luciana Gato Brito, Dra. Genimar e ao Dr. Jansen pelas contribuições e pela abertura à utilização de laboratórios na FIOCRUZ-RO e EMBRAPA-RO. Ao Dr. Eduardo Honda pela atenção dispensada e por ter cedido cepas e vetores para expressão em *Pichia pastoris* na primeira etapa do trabalho. Aos demais professores do programa por participarem da minha formação. Dra. Carolina Bione, Dr. Roberto Nicoletti, Dr. Quintino e Ivan do NIT por me orientarem quando foi preciso. Agradeço ao pessoal do setor administrativo Rosineide, Silvia Ferradaes, Lúcia, Marlene, Alice, Felipe, Alex, Giovani e Emerson por serem tão eficientes e agradáveis.

Agradeço ao Beto e Andreilson da Informática/FIOCRUZ-RO, que me auxiliaram em diversos momentos, principalmente nas lições de utilização do Linux, para o início das análises em bioinformática. Marlon Custódio da bioinformática, muito obrigada!

Pela agradável companhia, agradeço aos colegas maravilhosos do **LABEIn**: Aline, Dra. Frances, Dr. Moreno, Elis, Elisângela, Glauci, Isabel, Lucas, Débora, Tarsis, Aurea, Cláudia, Raquel, Ana Rosa, Jayr; da **Microbiologia**: Flávia, Dra. Leidiane, Dara, Laís, Taimara, Annemarie, Nagilla, Raquel, Louny, Esquerdo, Roger, Tiago e Gabriel. À Núcia Cristiane, Gabriel Ferreira e Alan Palhares que me auxiliaram nos trabalhos de bancada, da **Engenharia de Anticorpos**: Michele Suelen, Michele Pereira, Marcos, Naan, Marcela, Guilherme, Érica e Rosa; da **Genética**: Iasmin, Lilliam, Kátia, Cristiane, Helen e Adonai, da **Entomologia** FIOCRUZ-RO, Dra. Maísa, Wanne, Ane, Antônio e Raimundo; do **CEBIO** e **Biotecnologia** João Gabriel, Nery, Amália, Ana Paula, Dr. Leandro Dill, Dr. Rodrigo, Dr. Rudson e à Ana Gomez. Agradeço à Amy Grabner pelas traduções e paciência.

Queridas Juliana Sobrinho, Dra. Nidiane, Frances, Dra. Soraya Santos e Dra. Larissa Nicoletti, agradeço por compartilharem comigo um pouco da vida. Estamos vencendo grandes desafios! Nidiane, serei sempre grata a você por acolher minha família em sua casa em Manaus durante a disciplina Engenharia Genética. Foi uma bela experiência.

Aos demais colegas da pós-graduação por compartilharem tantos momentos e realidades.

Agradeço de coração à Tatiane Silva - LACEN/Clube da bactéria, Michele Silva de Jesus - Coleção de Bactérias da Amazônia – CBAM/Fiocruz, Verônica Vieira-Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde -CBAS/Fiocruz, Cassia Zocoli e Nina, laboratório Santa Luzia.

Ao Dr. Wanderley e Fernanda, profissionais competentes que me ajudaram a superar momentos difíceis.

Agradeço ao meu amado marido, Antonio dos Santos Júnior, por me incentivar nesta trajetória. Você é o meu biólogo favorito! Nossas longas conversas sobre biologia são muito prazerosas. É ótimo ter alguém para compartilhar.

Obrigada mãe, Alcineide Cristino, por nos ajudar nos momentos que ninguém mais poderia! Você, ajudando a cuidar do nosso filho, esteve presente durante a escrita da qualificação na Finlândia, e agora durante a escrita da tese em Porto Velho -RO. Serei eternamente grata. Agradeço ao meu filho pelos sorrisos e abraços que me enchem de alegria e coragem.



Agradeço ao meu pai, meu irmão, minha avó e aos familiares e amigos a compreensão pela minha ausência e pela escolha da distância geográfica. Mas vocês estão no meu coração.

Ao CNPq, CAPES, FIOTEC e PPG-BIONORTE pelo auxílio em bolsas, custeio de projetos e viagens a cursos e congressos. Agradeço à FIOCRUZ, UNIR e CEPEM pelo apoio logístico e à Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz, subunidades RPT01E - Sequenciamento de DNA – BH, RPT01H - Sequenciamento de DNA – AM e RPT01B - Sequenciamento de DNA – BA. Às coleções biológicas CBAM e CBAS.

## RESUMO

Microrganismos contidos no trato digestório de insetos vem sendo isolados e identificados com o intuito de desenvolver ferramentas biotecnológicas para o controle de doenças transmitidas por insetos. Nesse contexto, mosquitos *Anopheles* de diferentes partes do globo têm sua microbiota investigada com foco em paratransgênese. No entanto, a informação sobre microrganismos associados aos anofelinos neotropicais é escassa. Tratando-se de *Anopheles darlingi*, o principal vetor de malária no Brasil, até o presente trabalho, não havia informações sobre microrganismos cultiváveis associados a esse vetor. Os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar bactérias e leveduras cultiváveis isoladas das fezes de *An. darlingi*, o principal vetor da malária no Brasil; estimar riqueza e distribuição de frequência das bactérias e leveduras amostradas, e caracterizar e selecionar bactérias e leveduras isoladas das fezes de *An. darlingi* com potencial para paratransgênese. Os mosquitos *An. darlingi* fêmeas foram coletados em duas localidades rurais de Porto Velho, Rondônia, Brasil. Para favorecer o crescimento de bactérias, fezes dos mosquitos foram coletadas em meio LB ágar e cultivadas à 37°C por 24 horas, e para propiciar o crescimento de leveduras, fezes dos mosquitos foram coletadas em meio YPD ágar com cloranfenicol e cultivadas à 30°C por 48 horas. Sessenta colônias bacterianas e 60 colônias leveduriformes foram amostradas. Os isolados foram preservados em freezer -80 °C. Foram realizadas PCR utilizando DNA genômico dos isolados com iniciadores para a região do DNA ribossomal 16S para bactérias e 26S e ITS para leveduras. Todas as 60 bactérias isoladas foram identificadas. Das 60 leveduras isoladas, 27 foram identificadas. Os fragmentos foram sequenciados pelo método Sanger e as sequências com similaridades superiores a 97% frente a sequências disponíveis em bancos de dados foram depositadas no GenBank. Para bactérias, MALDI-TOF, VITEK®2 e BBL Crystal foram utilizados como métodos complementares para identificação dos isolados. As bactérias identificadas pertencem a 8 gêneros: *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Cedecea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia* e *Acinetobacter*. As leveduras identificadas pertencem a 7 gêneros: *Candida*, *Meyerozyma* (= *Pichia*), *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Papiliotrema* (= *Cryptococcus*) e *Pseudozyma*. São candidatas à paratransgênese para o controle da malária em *An. darlingi* as bactérias do gênero *Pantoea* e *Serratia* e as leveduras dos gêneros *Meyerozyma* (*Pichia*), *Metschnikowia*, *Hanseniaspora* e *Pseudozyma*.

**Palavras chave:** Microbiota de fezes. Simbiontes. Amazônia brasileira. *Pantoea*. *Meyerozyma*.

## ABSTRACT

Microrganisms living in insects' midgut have been isolated and identified for developing biotechnological tools to fight vector-borne diseases. In this context, the mosquitoes *Anopheles* from different regions around the world have been studied about their midgut microbiota focused on paratransgenesis. However, information about microrganisms living in neotropical mosquitoes midgut are scarce. And, specially about *Anopheles darlingi*, the main malaria vector in the Brazilian Amazon, still this study, there were not any report about culturable microrganisms associated to this insect. The first step for paratransgenesis is to isolate culturable microrganisms naturally associated to the insect vector, and thus amenable to experimentation in laboratory. The objectives of this work were to isolate and to identify culturable bacteria and yeasts isolated from feces of *Anopheles darlingi*, the main vector of malaria in Brazil; to estimate the species richness and frequency distribution of the sampled bacteria and yeasts and to characterize and to select the sampled bacteria and yeasts isolated from feces of *An. darlingi* with potential for paratransgenesis. The female mosquitoes of *An. darlingi* were captured in two rural places of Porto Velho, Rondônia, Brasil. For improving the bacterial growth, mosquito feces were collected on LB agar medium and cultivated at 37 °C for 24 hours, and for improving the yeast growth, mosquito feces were collected on YPD agar medium with Chloramphenicol and cultivated at 30 °C for 48 hours. Sixty pure bacteria colonies and sixty pure yeast colonies were sampled. The isolates were preserved in -80 °C freezer. PCR reactions with genomic DNA from each isolate were performed using the primers of 16S rRNA genes for bacteria and 26S and ITS for yeasts. From 60 bacterial isolates, 55 samples were identified. From 60 yeast isolates, 27 samples were identified. The fragments were sequenced with the Sanger method and the sequences with similarities above of 97% with sequences in reference database were deposited in Genbank (NCBI). For bacteria, MALDI-TOF, VITEK®2 and BBL Crystal were also used as a complementary protocols to identify the isolates. The identified bacteria fall into 8 genera, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Cedecea*, *Pantoea*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Burkholderia* and *Staphylococcus*. The identified yeast fall into 7 genera, *Pseudozyma*, *Papiliotrema* (*Cryptococcus*), *Meyerozyma* (= *Pichia*), *Rhodotorula*, *Candida*, *Hanseniaspora* and *Metschnikowia*. As candidates to paratransgenesis to control of malaria in *An. darlingi* are those bacteria belonging to the genera *Pantoea* and *Serratia* and the yeasts belonging to the genera *Meyerozyma* (= *Pichia*), *Pseudozyma*, *Hanseniaspora* and *Metschnikowia*.

**Keywords:** Feces microbiota. Symbionts. Brazilian Amazon. *Pantoea*. *Meyerozyma*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	-	Ciclo de vida do parasita da malária humana <i>Plasmodium vivax</i>	21
Figura 2	-	Paisagem global da malária por país em 2017	25
Figura 3	-	Distribuição das principais espécies de anofelinos vetores de malária no continente americano	27
Figura 4	-	<i>Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi</i> durante o repasto sanguíneo	28
Figura 5	-	Fluxo de microbiota no sistema digestório de mosquitos adultos	32
Figura 6	-	Número de gêneros bacterianos relatados em vetores (anofelinos) de malária humana (VILLEGAS; PIMENTA, 2014)	36
Figura 7	-	Uma visão atual da árvore da vida, abrangendo a diversidade total representada por genomas sequenciados	39
Figura 8	-	Dispositivo para coleta de fezes de mosquitos	53
Figura 9	-	Etapas para seleção dos microrganismos isolados	55
Figura 10	-	Amostra de um isolado de bactéria a partir das fezes de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> de campo armazenados na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Fiocruz Rondônia	56
Figura 11	-	Mapa das regiões variáveis V1-V9 da sequência 16S rRNA de <i>Escherichia coli</i> mostrando o local de anelamento dos iniciadores utilizados	58
Figura 12	-	Mapa da região de genes ribossomais de leveduras mostrando os locais de anelamento dos iniciadores para amplificação da região D1/D2 de 26s rRNA e da região ITS1-ITS2 de fungos	59
Figura 13	-	Mapa do vetor pSB1C3 – Bba_E1010 que contém gene repórter RFP	68
Figura 14	-	Mapa do vetor pGAPZαB	69
Figura 15	-	Amostras de bactérias isoladas a partir das fezes de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> de campo e colônias puras obtidas com o método de estriamento em placa de Petri	70
Figura 16	-	Amplificado da região 16S rRNA das bactérias de 1 a 60 que foram isoladas a partir das fezes de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> selvagens	75
Figura 17	-	Árvore filogenética dos taxa das bactérias isoladas a partir de fezes de <i>Anopheles darlingi</i> e identificadas utilizando sequência 16S rRNA parcial	79

Figura 18	-	Microbiota associada a <i>Anopheles</i> distribuída por continente (VILLEGAS; PIMENTA, 2014)	80
Figura 19	-	Amostras de leveduras isoladas a partir das fezes de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> de campo e colônias puras obtidas com o método de estriamento em placa de Petri	96
Figura 20	-	Amplificados da região D1/D2 do 26S rRNA das leveduras de 1 a 35 que foram isoladas a partir das fezes de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> selvagens	98
Figura 21	-	Amplificados da região D1/D2 do 26S rRNA das leveduras de 36 a 60 que foram isoladas a partir das fezes de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> selvagens	99
Figura 22	-	Amplificados da região ITS do rRNA das leveduras de 7 a 60 que foram isoladas a partir das fezes de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> selvagens	100
Figura 23	-	Árvore filogenética dos taxa das leveduras identificados utilizando a sequência 26S rRNA. As leveduras foram coletadas em fezes de <i>Anopheles darlingi</i> na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil	104
Figura 24	-	Árvore filogenética dos taxa das leveduras identificados utilizando a sequência ITS. As leveduras foram coletadas em fezes de <i>Anopheles darlingi</i> na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil	105
Figura 25	-	Árvore filogenética do gênero <i>Candida</i> referente aos taxa das leveduras 24, 29 e 36 e taxa relacionados utilizando a região ITS rRNA. As leveduras foram coletadas em fezes de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil	106
Figura 26	-	Árvore filogenética do gênero <i>Metschnikowia</i> referente aos taxa das leveduras 42 e 48, identificados utilizando a região ITS rRNA. As leveduras foram coletadas em fezes de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil	112
Figura 27	-	Distribuição de frequência das espécies de bactérias coletadas em fezes de mosquitos <i>Anopheles darlingi</i> oriundos de Porto Velho, RO	118
Figura 28	-	Curva de rarefação para estimativa da riqueza de espécies de bactérias coletadas em fezes de mosquitos <i>Anopheles darlingi</i> oriundos de Porto Velho, RO	119

Figura 29	-	Curva de rarefação mostrando a riqueza de bactérias encontradas por Rani et al (2009) para <i>An. stephensi</i> .	120
Figura 30	-	Curva de rarefação mostrando a riqueza de bactérias encontradas por Chandler et al. (2012) para <i>Drosophila</i> sp.	120
Figura 31	-	Distribuição de frequência das espécies de leveduras coletadas em fezes de mosquitos <i>Anopheles darlingi</i> oriundos de Porto Velho, RO	121
Figura 32	-	Curva de rarefação para estimativa da riqueza de espécies de leveduras coletadas em fezes de mosquitos <i>Anopheles darlingi</i> oriundos de Porto Velho, RO	122
Figura 33	-	Curva de rarefação mostrando a riqueza de espécies de leveduras encontradas por Chandler et al. (2012) para <i>Drosophila</i> sp.	124
Figura 34	-	Amplicom de RFP	134

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Determinação da hierarquia taxonômica de acordo com a similaridade de sequências 16S rRNA	43
Tabela 2	-	Data e local de coletas de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> capturadas na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil, utilizadas para o isolamento de bactérias cultiváveis associadas a essa espécie de mosquito	52
Tabela 3	-	Data e local de coletas de fêmeas de <i>Anopheles darlingi</i> capturadas na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil, utilizadas para o isolamento de leveduras cultiváveis associadas a essa espécie de mosquito	52
Tabela 4	-	Bactérias identificadas utilizando sequência 16S rRNA parcial. As bactérias foram isoladas a partir das fezes de <i>Anopheles darlingi</i> selvagens oriundos de Porto Velho, RO	76
Tabela 5	-	Ocorrência de gêneros bacterianos encontrados em outras espécies de <i>Anopheles</i>	82
Tabela 6	-	Leveduras identificadas utilizando as sequências D1/D2 do 26S rRNA e ITS rRNA. As leveduras foram isoladas a partir das fezes de <i>Anopheles darlingi</i> selvagens oriundos de Porto Velho, RO	101
Tabela 7	-	Lista de microrganismos isolados nesse trabalho com potencial para a realização de paratransgênese no controle da malária transmitida por <i>Anopheles darlingi</i>	132

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Pb	Pares de base
LB	Meio de Cultura Luria-Bertani
M	Molar
mL	Mililitro
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
rpm	rotações por minuto
TE	Tampão que contém Tris 0,01M; EDTA 0,01M; Tris-HCl 0,01 M
TEM	Tampão que contém Tris 0,05M; EDTA 0,05M; NaCl 0,1 M
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
PCR	Reação em cadeia da polimerase



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>MALÁRIA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>VETORES DA MALÁRIA .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4</b>	<b>MICRORGANISMOS E SEUS HABITATS .....</b>	<b>29</b>
<b>3.5</b>	<b>MICRORGANISMOS NO TRATO DIGESTÓRIO DE INSETOS ...</b>	<b>30</b>
<b>3.6</b>	<b>BACTÉRIAS ASSOCIADAS A CULICÍDEOS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.7</b>	<b>LEVEDURAS ASSOCIADAS A CULICÍDEOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.8</b>	<b>ESPÉCIE PARA MICRORGANISMOS E A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9</b>	<b>ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DA MALÁRIA .....</b>	<b>46</b>
<b>3.10</b>	<b>POTENCIAL DA PARATRANSGÊNESE PARA O CONTROLE DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR INSETOS, ESPECIALMENTE MALÁRIA</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>COLETA E TRIAGEM DOS MOSQUITOS .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2</b>	<b>AMOSTRAGEM E TRIAGEM DAS BACTÉRIAS E DAS LEVEDURAS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE BACTÉRIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4</b>	<b>EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE LEVEDURAS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.5</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO DOS DNAs GENÔMICOS .....</b>	<b>58</b>
<b>4.6</b>	<b>AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE 16S rRNA DE BACTÉRIAS</b>	<b>58</b>
<b>4.7</b>	<b>AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA D1/D2 DE 26S rRNA DE LEVEDURAS.....</b>	<b>59</b>
<b>4.8</b>	<b>AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA ITS1-ITS2 DO rRNA DE LEVEDURAS.....</b>	<b>60</b>
<b>4.9</b>	<b>PURIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS</b>	<b>60</b>

	<i>AMPLICONS</i> .....	
4.10	MONTAGEM DO DATASET.....	61
4.11	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA MOLECULAR .....	62
4.12	ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIA. ....	63
4.13	ANÁLISES COMPLEMENTARES PARA IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS .....	64
4.14	ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS .....	64
4.15	ANÁLISES FILOGENÉTICAS .....	65
4.16	ESTIMATIVA DE RIQUEZA E FREQUÊNCIA DAS ESPÉCIES ...	66
4.17	SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS CANDIDATOS A PARATRANSGÊNESE .....	66
4.18	SELEÇÃO DOS VETORES PARA MANIPULAÇÃO GENÉTICA DOS CANDIDATOS À PARATRANSGÊNESE .....	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
5.1	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRESENTES NAS FEZES DE <i>Anopheles darlingi</i> .....	70
5.2	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES NAS FEZES DE <i>Anopheles darlingi</i> .....	73
5.2.1	Gênero <i>Staphylococcus</i> .....	83
5.2.2	Gênero <i>Burkholderia</i> .....	84
5.2.3	Gênero <i>Cedecea</i> .....	85
5.2.4	Gênero <i>Enterobacter</i> .....	87
5.2.5	Gênero <i>Klebsiella</i> .....	88
5.2.6	Gênero <i>Pantoea</i> .....	89
5.2.7	Gênero <i>Serratia</i> .....	91
5.2.8	Gênero <i>Acinetobacter</i> .....	94
5.3	ISOLAMENTO DE LEVEDURAS PRESENTES NAS FEZES DE <i>Anopheles darlingi</i> .....	95
5.4	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES NAS FEZES DE <i>Anopheles darlingi</i> .....	96
5.4.1	Gênero <i>Candida</i> .....	108

5.4.2	Gênero <i>Meyerozyma</i> (=Pichia) .....	109
5.4.3	Gênero <i>Metschnikowia</i> .....	111
5.4.4	Gênero <i>Hanseniaspora</i> .....	113
5.4.5	Gênero <i>Rhodotorula</i> .....	114
5.4.6	Gênero <i>Papiliotrema</i> ( <i>Cryptococcus</i> ).....	115
5.4.7	Gênero <i>Pseudozyma</i> .....	116
5.5	<b>ESTIMATIVA DE RIQUEZA E DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS CULTIVÁVEIS COLETADAS NAS FEZES DE <i>Anopheles darlingi</i> .....</b>	118
5.6	<b>SOBRE A UTILIZAÇÃO DE BANCOS DE DADOS E CLASSIFICADORES TAXONÔMICOS UTILIZADOS NESSE TRABALHO.....</b>	125
5.7	<b>SELEÇÃO DE CANDIDATOS À PARATRANSGÊNESE E ENSAIOS PARA A MANIPULAÇÃO GENÉTICA .....</b>	129
6	<b>CONCLUSÕES .....</b>	135
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	137
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	139
	<b>APÊNDICE A.....</b>	157

# 1 INTRODUÇÃO

Os organismos, especialmente aqueles que pertencem aos Domínios Bacteria e Archaea, vivem nos mais variados habitats da Terra. Eles são encontrados desde fontes de água fervente até cada milímetro de neve no Polo Sul. A diversidade de populações microbianas indica que elas tiram proveito de qualquer habitat encontrado em seu ecossistema (TORTORA et al., 2012). No entanto, nenhuma espécie vive em isolamento e, muitas vezes, a associação com outras espécies é especialmente próxima. Para muitos organismos, o habitat que ocupam é um indivíduo de outra espécie. Essa interação entre espécies pode ser definida como Mutualismo ou Simbiose ('viver juntos'), termo que foi cunhado para essas associações físicas próximas entre espécies. Porém, a aplicação desses conceitos é controversa mesmo entre os ecologistas (BEGON; HARPER; TOWNSEND, 2006a; RICKLEFS, 2010). A interação entre um animal e a microbiota que vive em seu trato digestório tem sido alvo de grandes discussões, há ainda autores que utilizam o termo holobionte para descrever essa interação (MINARD; MAVINGUI; MORO, 2013; ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2011; ROSENBERG ZILBER-ROSENBERG, I., 2013). À luz desse debate, autores interessados na interação animais-microrganismos tem preferido utilizar o termo “associado” quando tratam do tema (EPIS et al., 2012; GUSMÃO et al., 2010; MATOS et al., 2014; TERENIUS et al., 2008; VALZANO et al., 2016).

A utilização de simbiontes intestinais para o controle de doenças transmitidas por insetos vetores tem ganhando destaque pelo fato da microbiota poder ser manipulada para reduzir a competência dos insetos para agentes de doenças zoonóticas. Em relação aos insetos vetores de agentes de doenças humanas, são desenvolvidas estratégias de utilização de microrganismos heterólogos e simbiontes microbianos geneticamente modificados (ARORA; DOUGLAS, 2017; RIEHLE et al., 2007; WANG et al., 2012). Para malária, doença parasitária que provoca prejuízos a saúde humana e mortes em diversas regiões tropicais do planeta, a microbiota intestinal do gênero *Anopheles* tem sido pouco investigada, a partir de técnicas de metagenômica (BOISSIÈRE et al., 2012; LINDH et al., 2005), por microbiologia clássica, através do isolamento de microrganismos contidos no trato digestório de *Anopheles*, que são dissecados um a um (STRAIF et al., 1998), ou ainda coletados a partir das fezes dos anofelinos, estratégia que facilita a investigação da microbiota que passou pelo trato digestório (ARRUDA et al., 2017). Esses esforços são justificados pelo fato da microbiota compartilhar o mesmo ambiente do *Plasmodium* e assim, podem ser utilizados como uma

ferramenta para interferir no desenvolvimento do parasita dentro do vetor, interrompendo assim, o ciclo dessa doença (WANG et al., 2017). No entanto, a informação sobre microrganismos dos anofelinos neotropicais é escassa (VILLEGAS; PIMENTA, 2014). No caso de *Anopheles darlingi*, o principal vetor de malária no Brasil, até o presente trabalho, não havia informação sobre microrganismos cultiváveis associadas a esse vetor.

Entre as ações para erradicação da malária ao redor do globo, é possível destacar para o Brasil o lançamento, em 2015, do “Plano de Eliminação da Malária no Brasil” com ênfase na malária por *Plasmodium falciparum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). No entanto, é aceito que a erradicação não será alcançada com as ferramentas atuais. Assim, é necessário acelerar o desenvolvimento de uma nova geração de ferramentas e conhecimentos voltados especificamente para a erradicação global da malária (MALERA, 2011). Nesse sentido, uma das alternativas promissoras para agir contra a malária é a paratransgênese, técnica de controle baseada em manipulação genética de microrganismos simbiotes que pode ser aplicada em conjunto com outros métodos de controle já utilizados, mas, para isso é primordial conhecer os microrganismos associados ao mosquito em questão (WANG; JACOBS-LORENA, 2013; WILKE; MARRELLI, 2015).

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar bactérias e leveduras cultiváveis associadas às fezes de *Anopheles darlingi*, o principal vetor da malária no Brasil. Assim, foi realizada uma descrição da riqueza de espécies de microrganismos associados a *An. darlingi* em uma região da Amazônia para contribuir com conhecimentos que poderão, levar ao desenvolvimento de uma solução biotecnológica para auxiliar na erradicação da Malária.

## 2 OBJETIVOS

1. Isolar e Identificar bactérias e leveduras cultiváveis isoladas das fezes de *Anopheles darlingi*, o principal vetor da malária no Brasil.
2. Estimar riqueza e distribuição de frequência das bactérias e leveduras amostradas.
3. Caracterizar e selecionar bactérias e leveduras isoladas das fezes de *An. darlingi* com potencial para paratransgênese.
4. Selecionar vetores de clonagem e expressão para realização da manipulação genética dos candidados à paratransgênese.

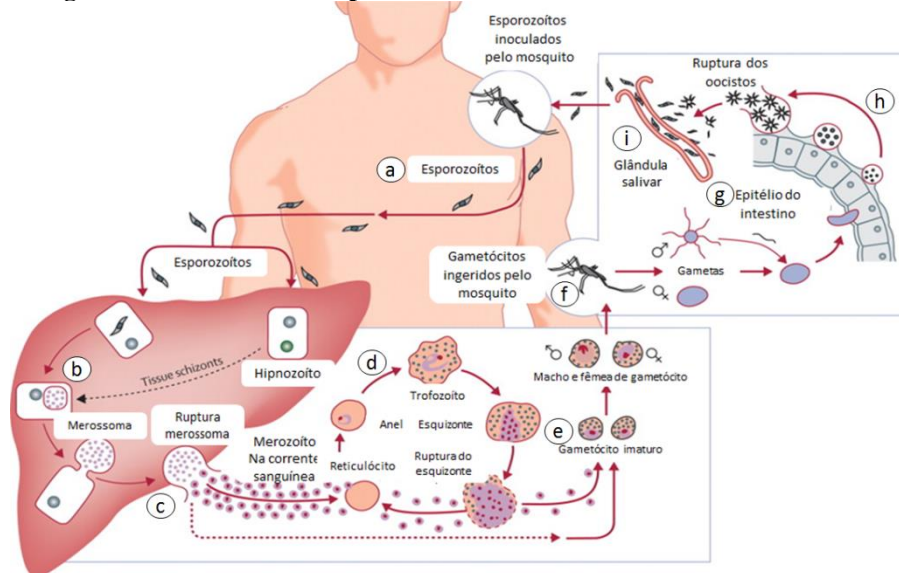
### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 MALÁRIA

Malária é uma doença parasitária provocada por protistas do gênero *Plasmodium*, pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae. Atualmente, são conhecidas cerca de 150 espécies que causam malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Dessas, apenas cinco espécies parasitam o homem: (1) *Plasmodium falciparum* Welch, (2) *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, (3) *Plasmodium malariae* Feletti & Grassi, (4) *Plasmodium ovale* Stephens, que ocorre apenas em regiões restritas do continente africano (NEVES et al., 2005) e (5) *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulligan, importante causador de malária na Malásia (AMIR et al., 2016; KANTELE; JOKIRANTA, 2011; SINGH et al., 2004; WHITE, 2008).

O ciclo da doença pode ser dividido em três partes (Figura 1), duas ocorrem no hospedeiro intermediário, o ser humano, no qual o parasita desenvolve a fase assexuada do ciclo de desenvolvimento; e uma ocorre no hospedeiro definitivo, o mosquito, no qual o parasita desenvolve a fase sexuada de seu ciclo evolutivo (FORATTINI, 1962; MUELLER et al., 2009; NEVES et al., 2005).

**Figura 1 - Ciclo de vida do parasita da malária humana *Plasmodium vivax***



Fonte: Adaptado de MUELLER et al., 2009

- a) Inoculação de esporozoítos no ser humano; b) Diferenciação de esporozoítos e formação de merozoítos; c) Liberação de merozoítos na corrente sanguínea por merossomas; d) Invasão dos eritrócitos por merozoítos; e)- Ingestão de gametócitos por mosquitos; f) Formação de zigoto; g) Formação de oocineto; h) Formação de oocistos; i) Liberação de esporozoítos na glândula salivar do mosquito.

No ser humano ocorrem as fases exo-eritrocítica, pré-eritrocítica ou tissular e o ciclo eritrocítico. No mosquito ocorre o ciclo sexuado ou esporogônico. Quando o ser humano é picado por um mosquito infectado por *Plasmodium* sp o mosquito suga o sangue humano e ao mesmo tempo injeta esporozoítos de *Plasmodium* sp no tecido injuriado (i). Inicia-se, nesse momento, o ciclo exo-eritrocítico (a). Estes esporozoítos, que tem forma alongada, migram até o fígado e dentro dos hepatócitos diferenciam-se em trofozoítos pré-eritrocíticos. Esses passam por sucessivas divisões celulares (reprodução assexuada chamada esquizogonia) formando diversos esquizontes teciduais (MUELLER et al., 2009; NEVES et al., 2005).

Os esquizontes (ou criptozoítos) são compostos por uma massa citoplasmática e milhares de núcleos filhos que darão origem aos chamados merozoítos, a forma que infecta eritrócitos (b). Os merozoítos de *Plasmodium* sp migram para a corrente sanguínea para invadir os eritrócitos (c). Quando um merozoíto invade um eritrócito se inicia o ciclo eritrocítico (d). O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito se dá por esquizogonia, com conseqüente formação de novos merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Após algumas passagens pelo ciclo eritrocítico alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos, que ficam na corrente sanguínea do ser humano (MUELLER et al., 2009; NEVES et al., 2005).

Quando um mosquito pica um ser humano infectado com gametócitos de *Plasmodium* sp ele se infecta com o parasita (e), o qual irá completar seu desenvolvimento biológico dentro do mosquito. No estômago do mosquito inicia-se o ciclo sexuado do *Plasmodium* sp. Os gametócitos ingeridos sofrem uma diferenciação no intestino médio do mosquito, fatores como temperatura inferior a 30 °C e aumento do pH estimulam o processo de gametogênese, no qual gametócitos se transformam em gametas extracelulares (f) (MUELLER et al., 2009; NEVES et al., 2005).

Poucos minutos após a ingestão do sangue o gametócito feminino transforma-se em macrogameta e o gametócito masculino passa por um processo denominado exflagelação e dá origem a oito microgametas. Em 20-30 minutos, um microgameta fecunda um macrogameta, formando o ovo ou zigoto. Dentro de 24 horas após a fecundação, o zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto (g). Esse atravessa a matriz peritrófica e atinge a parede do intestino médio, onde se encista na camada epitelial do órgão, passando a ser chamado oocisto (h) (MUELLER et al., 2009; NEVES et al., 2005).

A invasão da parede do intestino ocorre por receptores de membrana e Vega-Rodrigues e colaboradores (2014) citam evidências de que os oocinetos de *Plasmodium* sp. podem invadir o intestino médio do mosquito por caminhos alternativos, além da ligação de uma enolase (proteína presente na superfície do oocineto) com EBP (*enolase binding protein-*



proteína presente na superfície do intestino médio do mosquito) (VEGA-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Apesar de milhares de gametócitos serem ingeridos quando um mosquito fêmea alimenta-se de um indivíduo infectado, cerca de 10% se desenvolvem com sucesso em oocinetos e cerca de cinco indivíduos desses têm sucesso em invadir o epitélio do intestino médio, para formar oocistos sésseis (TAYLOR, 1999; WANG; JACOBS-LORENA, 2013). Esse gargalo populacional do parasita, no intestino do mosquito, tornou esse compartimento um alvo para interferir no o ciclo do parasita quando é pensado no controle da doença e têm sido estudado por diversos autores (ABRAHAM; JACOBS-LORENA, 2004; DREXLER; VODOVOTZ; LUCKHART, 2008; SMITH; VEGA-RODRÍGUEZ; JACOBS-LORENA, 2014).

No oocisto ocorre o processo de divisão esporogônica e, após um período de 9 a 14 dias, ocorre a ruptura da parede do oocisto, sendo liberados os esporozoítos formados durante a esporogonia. Nessa etapa ocorre uma grande amplificação no número de parasitas, pois cada oocisto libera milhares de esporozoítos na hemocele, assim, esporozoítos são disseminados por todo o corpo do inseto através da hemolinfa até atingir as células das glândulas salivares do mosquito (WHITTEN; SHIAO; LEVASHINA, 2006). Esses esporozoítos que atingem o canal central da glândula, entram no ducto salivar para serem injetados no hospedeiro vertebrado (NEVES et al., 2005), (FORATTINI, 1962), (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994) e assim reiniciar o ciclo.

### **3.2 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA**

Os últimos registros de ocorrência de casos de malária no mundo são de 2015 e foram contabilizados cerca de 212 milhões de casos da doença, uma queda de 22% desde 2000 e de 14% desde 2010. A maioria dos casos em 2015 foram reportados na Região Africana (90%), seguidos pela Região do Sudeste Asiático (7%) e Região do Mediterrâneo Oriental (2%). Cerca de 4% dos casos estimados globalmente são causados por *P. vivax*, mas, fora do continente africano, essa proporção aumenta para 41%. A maioria dos casos de malária causados por *P. vivax* ocorrem na Região do Sudeste Asiático (58%), seguido da Região do Mediterrâneo Oriental (16%) e da Região Africana (12%). Cerca de 76% dos casos estimados de malária em 2015 ocorreram apenas em 13 países. Quatro países (Etiópia, Índia, Indonésia e Paquistão) representaram 78% dos casos de *P. vivax* (WHO, 2016a).

Em relação às mortes por malária em 2015, estima-se que ocorreram globalmente 429.000 óbitos, uma diminuição de 50% desde 2000 e de 22% desde 2010. A maioria das mortes em 2015 foi na Região Africana (92%), seguida da Região do Sudeste Asiático (6%) e da Região do Mediterrâneo Oriental (2%). Quase todas as mortes (99%) resultaram da malária provocada por *P. falciparum*. Das mortes por malária ocorridas em 2015, 3.100 óbitos foram provocados por malária provocada por *P. Vivax* com a maioria dos casos (86%) ocorrendo fora da África (WHO, 2016a).

No Brasil, em 2015 foram notificados 143 mil casos de malária. Nas áreas endêmicas da doença no Brasil, que compreende a região amazônica – responsável por 99% dos casos autóctones –, incluindo Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, houve redução dos casos autóctones em comparação com 2014, de 139.204 para 138.069. Na análise por estado, o Maranhão apresentou a maior queda (71%); seguido de Rondônia (29%), Pará (17%) e Acre (14%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Em 2016 houve uma redução em 44% nos casos notificados com 81.565 registros (SIVEP-MALÁRIA-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os dados mais recentes sobre mortalidade por malária no Brasil são de 2015 e foram registrados 35 óbitos por malária em 2015, desses, 24 mortes foram na região norte, 5 na região sudeste, 3 na região nordeste, 2 na região centro-oeste e uma na região sul. Nesse período *P. falciparum* foi responsável por 12 óbitos e *P. vivax* por 13 óbitos (DATASUS-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Em relação às políticas para o controle da malária, há uma iniciativa mundial para a erradicação da doença. O programa “*Global Technical Strategy for Malaria (GTS) 2016–2030*” tem como objetivo, até 2030, eliminar a malária de 35 países em que a malária foi transmitida em 2015. Um outro alvo da estratégia é prevenir o restabelecimento da malária em todos os países que são livres de malária. Um país deve denunciar zero casos indígenas de malária por 3 anos consecutivos antes que se considere ter eliminado a doença. Entre 2000 e 2015, 17 países atingiram zero casos indígenas por 3 anos ou mais e 10 desses países atingiram zero casos indígenas por 3 anos dentro do período 2011-2015. A malária não foi restabelecida em nenhum desses países. Países que atingiram zero casos indígenas por 3 anos ou mais, e que têm sistemas de vigilância suficientemente sólidos para demonstrar isso realização, são elegíveis para solicitar que a OMS inicie procedimentos para certificação que são livres de malária. O processo de certificação é opcional. Entre 2000 e 2015, seis dos 17 países que atingiram zero casos indígenas por 3 anos ou mais foram certificadas como isentas de malária pela OMS (WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION), 2016).

Nesse contexto, o Brasil recebeu em 2015 o prêmio “*Malaria Champions of the Americas Award 2015*”, entregue ao Programa Nacional de Controle da Malária do Ministério da Saúde, na sede da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS), em Washington. Essa é a quarta vez que o país é premiado por seu esforço para reduzir os casos de malária. Apesar da redução dos casos de malária, a doença ainda constitui um importante problema de saúde pública. Ainda em 2015, o Ministério da Saúde lançou o Plano de Eliminação da Malária no Brasil com ênfase na malária por *Plasmodium falciparum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Complementariamente, em 2017, o Brasil foi classificado em uma das áreas com malária sob controle (Figura 2).

**Figura 2 - Paisagem global da malária por país em 2017.**



Fonte: UCSF Global Health Group's Malaria Elimination Initiative (MEI).

### 3.3 VETORES DA MALÁRIA

Os mosquitos da família Culicidae estão agrupados em duas subfamílias: Culicinae e Anophelinae. Esses insetos dípteros são holometábolos, seu ciclo biológico é composto por quatro fases: ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto. Os adultos são alados e possuem pernas e antenas longas, por isso, muitas vezes são chamados de pernilongos, sendo bastante conhecidos devido a atividade hematofágica das fêmeas. Nas fases imaturas, os mosquitos são aquáticos e, em geral, são considerados predadores, pois podem ingerir inúmeros organismos tais como microplâncton presente em seus habitats,

constituído de algas, rotíferos, bactérias, esporos de fungos, ou quaisquer partículas de matéria orgânica (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Os membros da subfamília Anophelinae são conhecidos como anofelinos, um grupo de grande importância médica. Os anofelinos distribuem-se em três gêneros: *Anopheles*, que é cosmopolita, *Chagasia* e *Bironella*, esses, restritos às regiões neotropical e australiana respectivamente. Apenas os dois primeiros citados são encontrados no Brasil (FORATTINI, 2002).

No final do século XIX, cientistas descobriram que algumas doenças, como a malária, dengue e febre amarela eram transmitidas por mosquitos e, desde então, têm-se estudado a sistemática e a biologia desses insetos com a finalidade de identificar pontos vulneráveis para combatê-los e controlar a veiculação de doenças transmitidas por esses animais (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Atualmente são conhecidas 486 espécies de mosquitos que pertencem ao gênero *Anopheles*. Dessas, 39 espécies ocorrem no Brasil (*Systematic Catalog of Culicidae*) (GAFFIGAN et al., 2015). No entanto, é importante salientar que estudos genéticos realizados por Emerson e colaboradores (2015) revelaram que a espécie *An. darlingi* apresenta três padrões moleculares bem definidos, assim, os autores levantam a hipótese de que os três grupos genéticos podem representar três espécies putativas (EMERSON et al., 2015). Mas, até o momento, a identificação das espécies de *Anopheles*, que ocorrem no Brasil, pode ser realizada com a utilização de chaves dicotômicas baseadas em características morfológicas (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Os principais vetores de malária no continente americano são: *An. freeborni*, *An. pseudopunctipennis*, *An. quadrimaculatus*, *An. albimanus*, *An. albitarsis*, *An. aquasalis*, *An. darlingi*, *An. marajoara* e *An. nuneztovari* (Figura 3) (SINKA et al., 2012). No entanto, no Brasil, as espécies consideradas como vetores primários são *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *An. albitarsis sensu lato*, *An. oswaldoi*, *An. nuneztovari*, *An. triannulatus* e *An. braziliensis*. No subgênero *Kerteszia*, infecções naturais foram relatadas para *An. cruzii* e *An. bellator* (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

O principal vetor de malária no Brasil é *An. darlingi* (Figura 4), pertencente ao subgênero *Nyssorhynchus*, tendo sido descrito por Root em 1926 (ROOT, 1926). *Anopheles darlingi* está amplamente distribuído em toda a América do Sul, sendo especialmente importante como vetor da malária nos países amazônicos (HIWAT; BRETAS, 2011).

Os criadouros dessa espécie são grandes coleções de água com pH de neutro a alcalino (FORATTINI, 1962). Esses mosquitos preferem coleções de água com pouca matéria

orgânica e águas profundas, límpidas e parcialmente sombreadas como represas, remansos de rios e lagoas (CHARLWOOD, 1996; DEANE, 1986; TADEI et al., 1988).

**Figura 3 - Distribuição das principais espécies de anofelinos vetores de de malária no continente americano.**



**Principais espécies de vetores da malária nas Américas. Destaque para a ampla distribuição de *Anopheles darlingi* na América do Sul (SINKA et al., 2012).**

Em época de seca, os criadouros podem ser localizados em leitos de rios pedregosos, podendo invadir pequenos vales e causar epidemias temporárias que cessam por ocasião das primeiras chuvas, quando esses criadouros são destruídos (FORATTINI, 1962). Além disso, a ocorrência de chuvas fortes pode acarretar em inundações dos sítios de reprodução e carrear as formas imaturas do mosquito. Esse mecanismo é cogitado por ter alguma influência no aumento da densidade de *An. darlingi* na estação seca ou no período de transição entre a seca e a estação chuvosa (CHARLWOOD, 1980; FORATTINI, 1987).

No Brasil, a malária humana se concentra na região amazônica e *An. darlingi* é o anofelino que melhor e mais rapidamente se beneficia das alterações que o homem produz no ambiente silvestre, como o caso da construção de represas e açudes. A substituição das florestas por pastagens altera o comportamento de hábitos silvestres de *An. darlingi* para hábitos sinantrópicos provocando aumento da densidade desses mosquitos e consequentemente aumento nos casos de malária (VITTOR et al., 2006).

**Figura 4 - *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* durante o repasto sanguíneo.**



**Foto do acervo do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.**

Além disso, Barros e Honório (2015) comentam que a Malária é uma doença de fronteira de desmatamento e sugerem que o determinante mais importante da incidência da malária pode ser a proximidade de locais de transição, portanto, a margem das florestas ou lagoas cobertas de floresta (BARROS; HONÓRIO, 2015). Atividades antrópicas e mudanças ambientais e climáticas favorecem a maior densidade vetorial de *An. darlingi* exigindo estratégias de controle específicas para reduzir as populações dessa espécie (TADEI et al., 2017).

Um fator importante que contribui para que *An. darlingi* seja o principal vetor da malária no Brasil é a sua susceptibilidade a infecção por *Plasmodium* que infectam humanos (KLEIN et al, 1991a; KLEIN et al, 1992b; DA SILVA-VASCONCELOS et al., 2002). *Anopheles darlingi* é o único anofelino brasileiro no qual foram detectadas infecções naturais pelas três espécies de *Plasmodium* que causam malária humana nas Américas: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; DE ARRUDA et al., 1986, 1989;

DEANE, 1986). Outros fatores que contribuem para sua alta capacidade vetorial, são a capacidade de transmitir a malária dentro e fora de residências e hábito antropofílico (CHARLWOOD, 1996; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; DEANE, 1986). Além disso, esta espécie só não é encontrada nas áreas secas do Nordeste, no extremo Sul (abaixo da foz do rio Iguaçu) e nas áreas de elevada altitude (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1962).

### **3.4 MICRORGANISMOS E SEUS HABITATS**

Microrganismos são ubíquos e podem, por exemplo, colonizar frutas, flores e fauna associada (CHANDLER et al., 2011; HONG et al., 2001); animais como humanos, porcos, ratos, bovinos e insetos (DETHLEFSEN; MCFALL-NGAI; RELMAN, 2007; YUN et al., 2014); ou ainda tantos outros habitats como solo (BEECK et al., 2014) e água (RICHARDS et al., 2015). No entanto, os estudos sobre a diversidade microbiana no Brasil são escassos quando comparados à literatura sobre a biodiversidade de plantas e animais (BRUCE et al., 2012). Por exemplo, apenas recentemente a diversidade microbiana dos solos da Amazônia e do Cerrado e o domínio marinho foram estudados de forma sistemática. Bruce e colaboradores (2012) apresentam um capítulo sobre biodiversidade microbiana dos biomas brasileiros, no qual sumarizam dezenas de publicações sobre o assunto.

Os microrganismos que colonizam as superfícies corporais de forma permanente, sem gerar doenças, são considerados membros da microbiota normal ou flora normal do corpo. Outros, denominados microbiota transiente, podem estar presente por vários dias, semanas ou mesmo meses, e depois desaparecem (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Muitos fatores determinam a distribuição e a composição da microbiota normal. Entre eles estão nutrientes, fatores físicos e químicos, defesas do organismo hospedeiro e fatores mecânicos (DILLON; DILLON, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Esse conjunto de microrganismos varia de acordo com os tipos de nutrientes que eles podem utilizar como fonte de energia. Consequentemente, tais organismos colonizam apenas os sítios que podem supri-los com os condições e recursos apropriados. Os nutrientes podem ser derivados de produtos celulares secretados ou excretados, substâncias em fluidos corpóreos, células mortas e alimentos do trato gastrintestinal.

Fatores físicos e químicos influenciam o crescimento dos micro-organismos e, assim, a composição e o crescimento da flora normal. Entre esses fatores estão o pH, a presença de oxigênio e dióxido de carbono, a salinidade e a luz solar (BEGON; HARPER; TOWNSEND, 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Muitos animais, vertebrados e invertebrados, possuem uma microbiota mutualística em seu trato digestório formando comunidades complexas de mutualistas. Para ruminantes e cupins, a relação com microrganismos é especialmente importante na digestão de celulose. Ou seja, existem microrganismos, como bactérias, que encontram o seu substrato em animais e que trazem benefícios nutricionais para seus hospedeiros (BEGON; HARPER; TOWNSEND, 2006a; MINARD; MAVINGUI; MORO, 2013).

Animais sem microbiota podem ser obtidos e mantidos em condições laboratoriais. A maioria dos mamíferos livres de germes usados em pesquisa é obtida por sua criação em ambientes estéreis. Por um lado, pesquisas com animais livres de germes mostram que a presença de microrganismos não é absolutamente necessária à vida animal. Por outro lado, as mesmas pesquisas mostram que animais livres de germes apresentam sistema imune subdesenvolvido e são extremamente suscetíveis a infecções e doenças severas. Animais livres de germes também requerem mais calorias e vitaminas em sua alimentação do que animais normais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

### **3.5 MICRORGANISMOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE INSETOS**

Protistas, fungos, archaeas e bactérias podem ser encontrados colonizando o trato digestório de insetos. Os fungos, por exemplo, são frequentemente encontrados em intestinos de insetos que se alimentam de madeira ou detritos e, provavelmente, desempenham um papel na digestão desse material vegetal. Quanto a bactérias, é conhecido que estas compõem a maioria dos microrganismos contidos nos intestinos dos insetos, as quais contribuem para a nutrição, proteção contra agentes patogênicos e parasitas, na modulação de respostas imunes e, ainda, comunicação (ENGEL; MORAN, 2013).

É fato que o trato digestório de insetos tem flora microbiana associada, e do ponto de vista ecológico, essa relação pode se estabelecer por ocupação de nicho nas populações de microrganismos que habitam o trato digestório de um indivíduo. Também é fato que quando diferentes espécies ocupam o mesmo local, algumas espécies se sobressaem em detrimento de outras (BEGON; HARPER; TOWNSEND, 2006b; RICKLEFS, 2010). Paralelamente a isso, do ponto de vista da colonização microbiana, tratos digestórios de insetos são habitats instáveis. Em insetos holometábolos, por exemplo, durante a metamorfose há uma remodelação radical do intestino e outros órgãos, com a eliminação de todo o intestino larval e seu conteúdo, fato que provoca alterações na composição da microbiota local e na maioria das vezes, resulta na eliminação completa ou quase completa das bactérias intestinais (MOLL



et al., 2001). Por este motivo alguns mosquitos adultos recém-emergidos não contém bactérias em seus intestinos (MOLL et al., 2001). Por outro lado, intestinos de outros insetos exibem criptas especializadas ou bolsas que favorecem a persistência microbiana (ENGEL; MORAN, 2013; MOLL et al., 2001).

Além disso, tratos digestórios de insetos variam amplamente na morfologia e propriedades físico-químicas, fatores que influenciam grandemente a estrutura da comunidade microbiana. A maioria de intestinos de insetos contém relativamente poucas espécies de microrganismos quando comparados aos microrganismos contidos dos intestinos de mamíferos, porém, alguns insetos abrigam grandes comunidades de bactérias especializadas no intestino, como os térmites, por exemplo, que dependem de protistas e bactérias para sua nutrição. Outros, são colonizados escassamente apenas por bactérias oportunistas comuns em outros ambientes (ENGEL; MORAN, 2013).

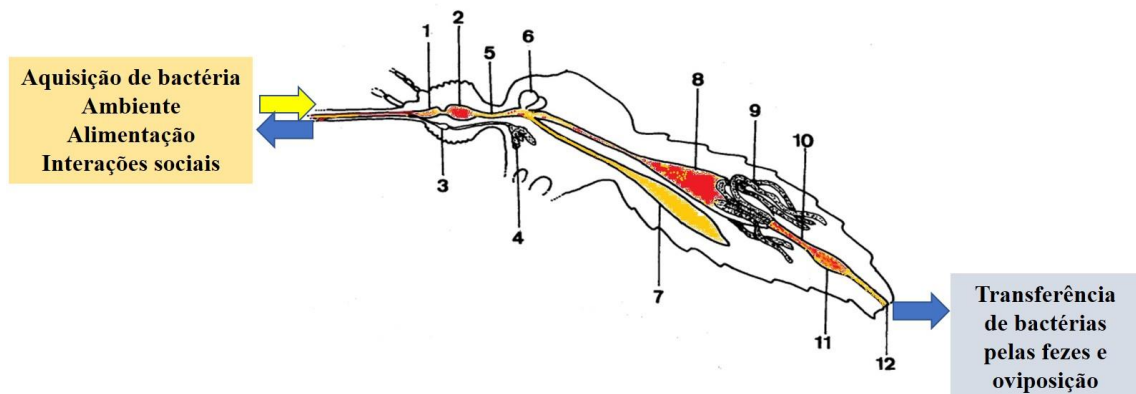
Insetos sociais, como cupins, formigas e abelhas, possuem interações intraespecíficas e sociais que oferecem oportunidades para transferência de bactérias do intestino com funções benéficas especializadas em nutrição e proteção. Isso implica em comunidades de microrganismos em intestino mais distintas e consistentes. Para insetos não sociais ou solitários, a infrequente interação intraespecífica cria um obstáculo para o conhecimento da dinâmica das associações íntimas de microrganismos dos intestinos desses insetos. Assim, há uma carência de informação sobre rotas de transmissão confiáveis entre os hospedeiros. Porém, para os insetos solitários com gerações que não se sobrepõem, hipotetiza-se que as fêmeas podem potencialmente transmitir bactérias à prole simplesmente por defecar na vizinhança de ovos e tendo as suas bactérias intestinais ingeridas pela sua prole (ENGEL; MORAN, 2013).

Em muitos insetos, bactérias amplamente distribuídas colonizam os animais de modo oportunista, mas as comunidades microbianas dos tratos digestórios associadas à uma espécie de inseto são fortemente influenciadas pela dieta ou localização geográfica, embora, alguns taxa bacterianos possam ser compartilhados com a maioria ou com todos os hospedeiros (AHARON et al., 2013; BRODERICK et al., 2004; CHANDLER et al., 2011; SCHAUER; THOMPSON; BRUNE, 2012).

A reincidência de determinados taxa em comunidades do intestino das mesmas e diferentes espécies potencialmente reflete transmissão direta entre os hospedeiros individuais, captação seletiva por parte dos hospedeiros, ou adaptação para colonizar intestinos de insetos por parte dos microrganismos, ou alguma combinação (ENGEL; MORAN, 2013).

Em mosquitos, algumas espécies de microrganismos se repetem entre os gêneros de diferentes espécies, mesmo em localidades geográficas distantes. Este fato tem sido debatido e pode ser devido à colonização dos tratos digestórios dos insetos por microrganismos ubíquos, que estão na flora, na seiva, em produtos de decomposição ou em outros locais que os insetos utilizam para se alimentar ou simplesmente pousar (Figura 5). Porém, há uma frente de estudo que acredita que há uma relação íntima entre microrganismos contidos nos tratos digestórios e seus hospedeiros, como a existência de relações simbióticas (DOUGLAS, 2011; KIKUCHI, 2009; MINARD; MAVINGUI; MORO, 2013).

**Figura 5 - Fluxo da microbiota no sistema digestório de mosquitos adultos**



**1: bomba cibarial; 2: bomba farigeana; 3: bomba salivar; 4: glândula salivar; 5:esôfago; 6: divertículos doesais; 7: divertículo ventral; 8: estômago ou intestino médio; 9:tubos de Malpighi; 10: íleo/cólon; 11:reto; 12: ânus. Adaptado de Consoli e Oliveira (1994) e Engel e Moran 2013.**

A diversificação e sucesso evolutivo dos insetos dependem em parte de suas relações com microrganismos benéficos, que são conhecidos por complementar as dietas pobres em nutrientes; auxiliar a digestão dos componentes dos alimentos recalcitrantes; proteger de predadores, parasitas e agentes patogênicos; contribuir para comunicação intra-específica; afetar a eficiência como vetores de doenças; e governar acasalamentos e sistemas reprodutivos, ou seja, a interação interespecífica entre espécies de insetos e de microrganismos tem efeito sobre o valor adaptativo ou *fitness* (BEGON; HARPER; TOWNSEND, 2006a; ENGEL; MORAN, 2013).

Um aspecto importante acerca dos estudos sobre microrganismos associados ao trato digestório de insetos, especialmente relacionados à mosquitos *Anopheles*, é que nas investigações da microbiota os autores destacam majoritariamente bactérias. E na maioria desses estudos, as bactérias não são isoladas, cultivadas e preservadas. Ao invés disso, têm sido utilizado iniciadores da sequência 16S rRNA para a identificação das bactérias. Essa

ampla utilização pode ser devida às dificuldades de se isolar muitos desses microrganismos, que podem ser exigentes em termos nutricionais ou ainda pela ampliação dos trabalhos utilizando metagenômica, método independente de cultura, no qual espécies são identificadas através de sequências nucleotídicas, mas não são obtidas em cultura (ENGEL; MORAN, 2013).

Apesar da proliferação dos estudos de comunidades microbianas utilizando análises das sequências 16S rRNA estarem começando a produzir um retrato da diversidade da comunidade em vários intestinos de insetos, as comparações diretas de medidas de diversidade entre os estudos devem ser interpretadas com cautela, porque diferentes estudos utilizam diferentes tecidos de partida, diferentes métodos para extração de DNA a partir de células bacterianas, diferentes iniciadores, diferentes métodos de sequenciamento, e diferentes pontos de corte para a definição das espécies. Outro cuidado a respeito dessas pesquisas é que, por si só, elas não permitem conclusões funcionais. A sequência de 16S rRNA é uma molécula altamente conservada, o que dá pouca informação sobre a capacidade metabólica de uma bactéria; isto é, genomas bacterianos com sequências de de 16S rRNA quase idênticos podem ter grandes diferenças no conteúdo de genes e capacidades metabólicas (ENGEL; MORAN, 2013; HUGHES et al., 2001).

Porém, estudos mais recentes sugerem que a análise de uma região considerada relativamente conservada, como a V4, pode ser equivalente à sequência completa do 16S rRNA para estudos filogenéticos (YANG; WANG; QIAN, 2016). Além disso, o número absoluto de bactérias no intestino pode diferir dramaticamente entre e dentro das espécies de insetos e isto é raramente investigado. Esses fatores podem ter efeitos importantes sobre a biodiversidade detectada nas amostras (ENGELBREKTSON et al., 2010). Estudos que documentam os perfis da sequência 16S rRNA de comunidades do intestino não fornecem estimativas dos números de células bacterianas presentes ou apenas retratam um único instante da comunidade. Estimativas de densidades absolutas seriam complementos úteis para dados de diversidade para ter uma idéia sobre a abundância e estabilidade da microbiota intestinal (ENGEL; MORAN, 2013).

### 3.6 BACTÉRIAS ASSOCIADAS A CULICÍDEOS

Alguns autores têm mostrado mosquitos (Diptera: Culidae) como hospedeiros de diferentes comunidades bacterianas (DOUGLAS, 2011; MANGUIN; NGO; TAINCHUM, 2013; MINARD; MAVINGUI; MORO, 2013; NGO et al., 2015; VALIENTE MORO et al., 2013), as quais podem variar dependendo do sexo do mosquito, do estágio de desenvolvimento e de fatores ecológicos. Hughes e colaboradores (2014), por exemplo, afirmaram que interações microbianas afetam profundamente o hospedeiro, pois verificaram que a microbiota nativa de *Anopheles* impede a transmissão vertical de *Wolbachia*. Os autores identificaram *Asaia* como a bactéria responsável pela inibição da transmissão de *Wolbachia* (HUGHES et al., 2014).

Argumenta-se ainda que a microbiota nos mosquitos pode ser considerada um fenótipo estendido desses últimos, uma vez que existem numerosos exemplos de microrganismos que influenciam os insetos que estabelecem associação com as comunidades microbianas que variam de parasitismo a mutualismo (DOUGLAS, 2011; TOFT; ANDERSSON, 2010). De fato, alguns autores consideram que os organismos superiores não são dissociáveis de seus parceiros microbianos e, em conjunto, formam uma unidade de seleção em que os genes dos parceiros inter-atuantes são reunidos para a função global do holobionte (Teoria Hologenômica) (MINARD; MAVINGUI; MORO, 2013; ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2011).

O número de investigações sobre a microbiota de insetos, especialmente culicídeos, tem crescido com o intuito de compreender a função dos microrganismos contidos no intestino de *Anopheles*. Neste contexto, isolamentos e identificações de bactérias associadas ao gênero *Anopheles* (Culicidae) vem sendo realizadas com o intuito de interferir no ciclo da malária dentro do mosquito vetor (BANDO et al., 2013; CHAVSHIN et al., 2012, 2014; CHEN et al., 2016; CHEN; BLOM; WALKER, 2017; DJADID et al., 2011; GENDRIN; CHRISTOPHIDES, 2013; MANGUIN; NGO; TAINCHUM, 2013; SHARMA et al., 2013; TERENIUS et al., 2008; VILLEGAS; PIMENTA, 2014).

Bactérias do gênero *Asaia* estão associadas a diferentes espécies de vetores da malária e estão localizadas no intestino, glândulas salivares e órgãos reprodutivos de mosquitos fêmeas e machos (DAMIANI et al., 2008). Cepas de *Asaia*, por exemplo, são capazes de se multiplicar em intestinos de mosquitos vetores e invadir outras espécies de mosquito (CHOUAIA et al., 2010; RICCI et al., 2011) e, ainda, demonstrou-se que uma cepa pode colonizar hospedeiros tão diversos como cigarrinhas e mosquitos (CROTTI et al., 2009).

Assim, Damiani e colaboradores (2008), argumentam que a disseminação dessas bactérias em populações de mosquitos ocorre através de diferentes mecanismos como co-alimentação, acasalamento sexual e transmissão materna (DAMIANI et al., 2008).

A colonização do intestino com comensal ou comunidades microbianas mutualísticas pode aumentar a resistência do hospedeiro contra a invasão de parasitas. Para insetos vetores de doenças, microrganismos simbiotes podem influenciar na competência vetorial (RICCI et al., 2012) ou no tempo de desenvolvimento e, assim, fornece alvos para o controle da doença em potencial (CHOUAIA et al., 2010).

Outro simbiote natural de mosquito é a bactéria *Pantoea*, a qual pode colonizar várias espécies de mosquitos e é facilmente transformada e cultivada; assim, *Pantoea* foi proposta para aplicações paratransgênicas (BISI; LAMPE, 2011; DJADID et al., 2011).

Além disso, *Serratia marcescens* HB3, que foi isolada de mosquitos *An. stephensi*, inibiu o desenvolvimento de *Plasmodium* no intestino do mosquito, interrompendo a invasão de oocinetos através das células epiteliais do intestino (BANDO et al., 2013).

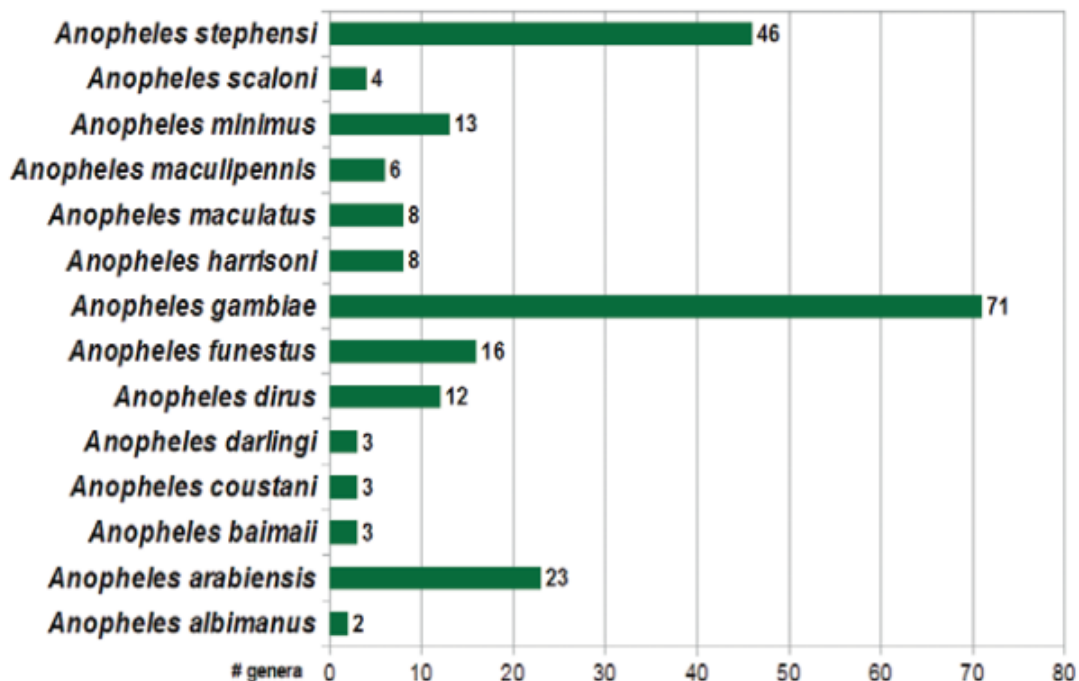
Apesar dos relatos sobre a microbiota em anofelinos nos últimos anos (KAMPFER et al., 2014; MANGUIN; NGO; TAINCHUM, 2013; NGO et al., 2015; RANI et al., 2009), este conhecimento ainda é escasso para algumas espécies de *Anopheles*, principalmente para espécies neotropicais. Villegas e Pimenta (2014) organizaram um banco de dados para a ocorrência de 109 gêneros bacterianos a partir de 14 diferentes espécies de *Anopheles*, distribuindo as ocorrências por continente. Para a África relataram 82 gêneros, para a Ásia registraram 58 gêneros, para a América listaram apenas cinco gêneros e, enfim, para a Europa citaram três gêneros (Figura 6). No entanto, é válido ressaltar que a maioria dos estudos foram realizados no continente africano e asiático, e portanto, nesses continentes a microbiota de um maior número de mosquitos foi investigada. Os cinco gêneros bacterianos com ocorrência no continente americano foram obtidos a partir de dois vetores neotropicais primários *An. darlingi* e *An. Albimanus* (Figura 6) (VILLEGAS; PIMENTA, 2014).

Os gêneros de bactérias que ocorreram no continente americano são: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Serratia*. A espécie anofelina com os gêneros bacterianos associados mais relatados foi *Anopheles gambiae*, com 71 gêneros, seguido pelo vetor da malária humana asiática *An. stephensi*, com 46 gêneros. Esse autores também indicaram a existência de apenas três gêneros de bactéria associadas a *An. darlingi*. As informações sobre a ocorrência dos gêneros bacterianos citados por Villegas e Pimenta (2014) são baseadas em diferentes técnicas que variam desde bactérias isoladas em meios de

cultura até a identificação de bactérias em múltiplas plataformas baseadas em genes 16S rRNA (VILLEGAS; PIMENTA, 2014).

Terenius e colaboradores (2008) identificaram por técnica independente de cultura (uma abordagem sem o isolamento dos microrganismos) bactérias associadas a *An. darlingi* pertencentes a três gêneros: *Aeromonas*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (TERENIUS et al., 2008); e recentemente, resultados obtidos no presente trabalho foram publicados divulgando bactérias que foram isoladas a partir de fezes de *An. darlingi*, essas foram identificadas pertencendo a cinco gêneros distintos: *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* (ARRUDA et al., 2017). Logo, até o momento, foram publicadas a ocorrência de sete gêneros de bactérias associadas a *An. darlingi*: *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Pantoea* e *Pseudomonas*.

Figura 6- Número de gêneros bacterianos relatados em vetores, anofelinos, de malária humana (VILLEGAS; PIMENTA, 2014).



### 3.7 LEVEDURAS ASSOCIADAS A CULICÍDEOS

As leveduras são fungos pertencentes aos filos Ascomycota ou Basidiomycota. Podem ser definidas como fungos cujo crescimento vegetativo predominantemente resulta de brotamento ou fissão e que não formam seus estados sexuais dentro ou em cima de um corpo de frutificação. Para leveduras do grupo ascomicetos, esta distinção foi confirmada por

comparações moleculares, que demonstram que leveduras de brotamento e leveduras de fissão são filogeneticamente distintas umas das outras e dos euascomicetos. Para leveduras do grupo basidiomiceto, pode ser feita uma distinção similar, pois aparecem filogeneticamente separadas dos cogumelos e outras taxa que formam corpos de frutificação complexos. Em resumo, as leveduras, quer ascomicetos ou basidiomicetos, são geralmente caracterizadas por brotamento ou fissão como o principal meio de propagação vegetativa e têm estados sexuais que não são colocados entre corpos de frutificação (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

A investigação de leveduras associadas a insetos vetores de doenças vem sendo realizada com intuito de conhecer esta diversidade de leveduras para prospectar ferramentas para futuras intervenções nos ciclos das doenças utilizando estes microrganismos. Em relação a leveduras associadas a mosquitos do gênero *Anopheles*, há poucos trabalhos que relatam esta associação. Este ramo do conhecimento ainda é pouco explorado, principalmente quando comparado à vasta literatura sobre bactérias associadas a esse mosquito.

Ricci e colaboradores (2011) fizeram a identificação molecular de leveduras associadas ao gênero *Anopheles* (Culicidae) utilizando domínios D1/D2 da subunidade grande do rRNA e das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Os autores relatam a ocorrência de 4 gêneros de fungos encontrados em *Anopheles stephensi* e em *An. gambiae*. Desses, três leveduras foram cultivadas: *Candida*, *Hanseniaspora* e *Wickerhamomyces* (*Pichia*), e uma identificação do fungo *Wallemia sebi* (AF548107) foi molecular sem o cultivo (RICCI et al., 2011).

Além de Ricci e colaboradores (2011), apenas Ignatova et al (1996) isolaram e identificaram leveduras de *Anopheles*. Os autores investigaram a flora de leveduras de *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* da Ucrânia e registraram as leveduras *Candida famata*, *C. (Yarrowia) lipolytica*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus*. E, ainda, concluíram que as linhagens estudadas fazem parte da microflora normal do mosquito (IGNATOVA et al., 1996). Os outros trabalhos relacionados com leveduras em *Anopheles* são estudos para controle simbiótico e paratransgênese utilizando *W. anomalus* ou citações em artigos de revisão (CAPPELLI et al., 2014; MANCINI et al., 2016; RICCI et al., 2012a, 2012b).

Um exemplo da importância ecológica das leveduras associadas a insetos vetores de doenças, é um recente trabalho realizado por Valzano e colaboradores (2016) que mostraram que a levedura *Wickerhamomyces anomalus* associada a mosquitos *An. stephensi*, produz uma toxina capaz de matar parasitas da malária *Plasmodium berghei in vitro* (VALZANO et al.,

2016). No entanto, até o momento, não foi publicado nenhum isolamento de leveduras associadas a *An. darlingi*, o principal vetor de malária na Amazônia brasileira.

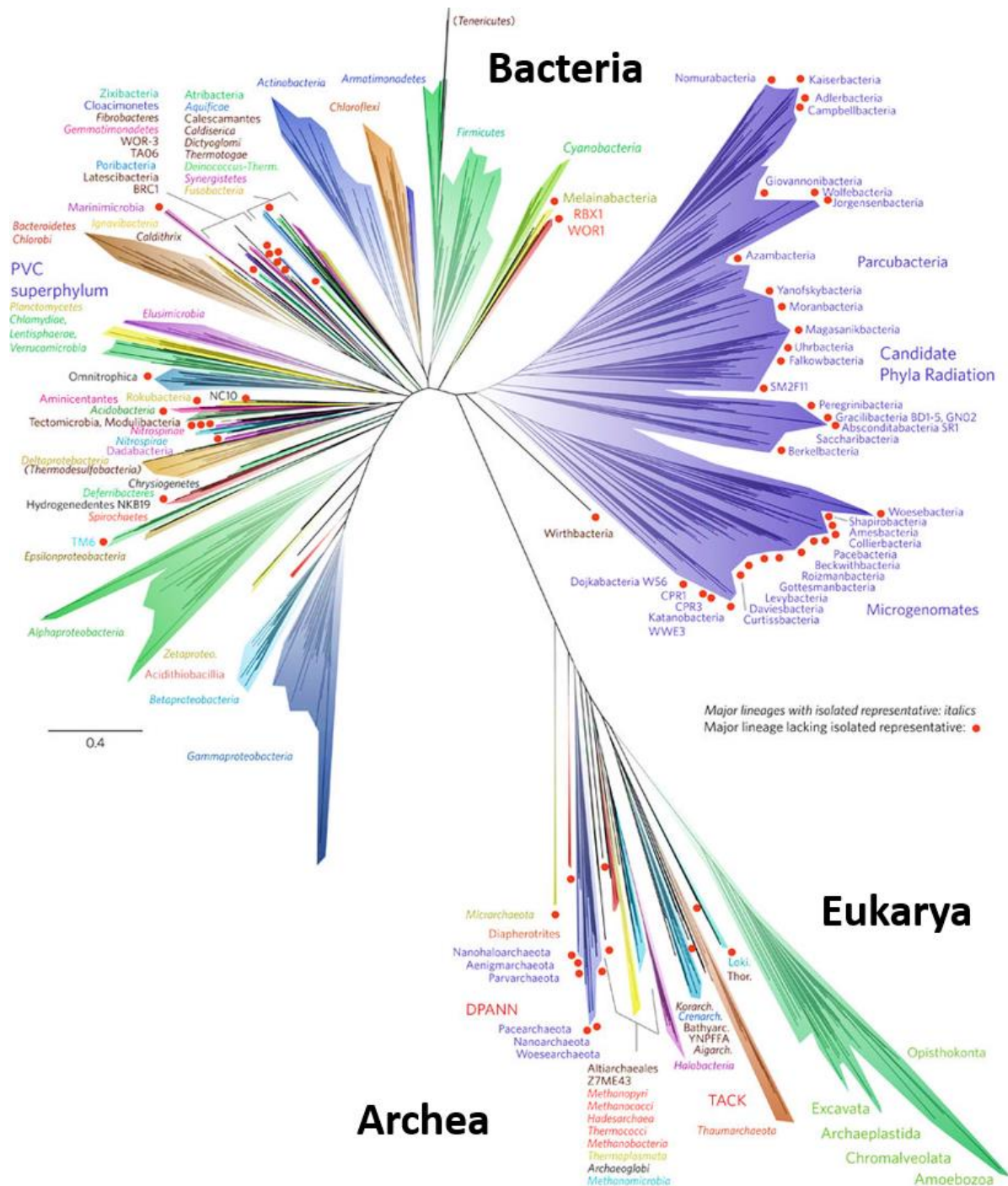
Apesar dos estudos escassos sobre a microbiota de leveduras associadas a anofelinos, a interação entre leveduras e outros insetos tem sido examinada há mais de um século, e os primeiros estudos mostram que as leveduras que vivem dentro dos aparelhos digestórios de moscas se multiplicam quando as moscas são alimentadas com uma solução de açúcar esterilizado (GIGLIOLI, 1897). A interação interespecífica *Drosophila* e leveduras é geralmente considerada como um mutualismo difuso (CHANDLER; EISEN; KOPP, 2012; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011), e.g., a transmissão de leveduras por *Drosophila buzzatii* durante o namoro e acasalamento (STARMER; PERIS; FONTDEVILA, 1988). Outro exemplo, são as leveduras que podem sobreviver à passagem através do trato digestório de *Drosophila*, dessa forma, esse hospedeiro atua como um vetor para a dispersão de leveduras para a colonização de novos habitats (GANTER, 1988; STARMER; PERIS; FONTDEVILA, 1988). As informações relatadas nestes estudos podem ser utilizadas como modelo para estudos da interação entre leveduras e anofelinos.

### **3.8 ESPÉCIE PARA MICRORGANISMOS E A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR**

A definição e a aplicação do conceito espécie foi debatido por décadas e ainda hoje é objeto de polêmicas (ALDHEBIANI, 2017; DE QUEIROZ, 2007). Após a proposição da classificação biológica em três domínios por Carl Woese (1990), diversas metodologias e ferramentas foram produzidas para identificar e reclassificar espécies baseando-se em sequências moleculares como a composição das moléculas de 16S ou 18S rRNA (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990). Os microrganismos estão classificados em três domínios: Bacteria, Archea e Eucarya (WOESE, 1994), nos quais os procariotos são representados pelos domínios Archea e Bacteria, e eucariotos pelo domínio Eucarya, no qual ficaram distribuídos protistas, fungos, plantas e animais. E de acordo com a árvore filogenética universal atual (Figura 7) o domínio Bacteria contempla a maior diversidade filogenética (HUG et al., 2016).



Figura 7 - Uma visão atual da árvore da vida, abrangendo a diversidade total representada por genomas sequenciados



Fonte: A new view of the tree of life (HUG et al., 2016).

Para microrganismos pode-se adotar o conceito filogenético de espécie, que está relacionado ao menor agrupamento de indivíduos distinguíveis com ancestralidade e descendência. E atualmente, muitas vezes, é adotado o conceito fenético de espécie, baseado

na taxonomia numérica, na qual uma espécie é definida com base na similaridade global ou divergência dos caracteres, aos quais podem ser atribuídos uma pontuação numérica, que normalmente é a presença ou ausência de uma característica (MCARTHUR, 2006). Em geral, o conceito de espécie tem um significado evolutivo e outro taxonômico, que podem ser independentes um do outro. O significado taxonômico de espécie tem uma aplicação prática, útil para a identificação de organismos de espécies que são importantes para indústria, saúde e outros. Neste contexto, existem autores que argumentam que a importância em se ter um conceito a ser adotado para espécies é justamente o fato de ter uma aplicação prática. Por exemplo, espécie é a unidade básica da conservação da biodiversidade. Assim, para a proteção da biodiversidade inicialmente mede-se o aumento ou redução do número de espécies, isto é a sua riqueza de espécies (MCARTHUR, 2006).

A identificação molecular para microrganismos pode ser realizada com base na homologia entre nucleotídeos de locus específicos. Esta homologia geralmente é dada em porcentagem de similaridade entre diferentes organismos. Tal metodologia consiste resumidamente em (1) escolher iniciadores adequados para os loci específicos, (2) amplificação dos loci utilizando PCR, (3) sequenciamento do amplicon, e (4) análise das homologias entre os nucleotídeos da sequência de interesse e sequências do mesmo locus, que estão disponíveis em bancos de dados, utilizando softwares que funcionam com algoritmos que validam estatisticamente estas comparações. É possível fazer a identificação de bactérias utilizando o locus do gene ribossomal 16S, mas existem outros locus menos utilizados. Para a identificação de leveduras é possível utilizar a região D1/D2 do locus do gene ribossomal 26S (KURTZMAN, 2014).

A utilização das sequências do gene rRNA 16S para taxonomia e filogenia é motivada por diversos fatores: (1) Esta sequência pode ser encontrada em todas as bactérias e archaea, e mesmo eucariontes as possuem em mitocôndrias e cloroplastos; (2) Diferentes regiões do gene tem diferentes níveis de variabilidade, que variam a partir de regiões altamente conservadas que são muito semelhantes em todos os organismos a outras regiões que são altamente variáveis e diferem muito entre os organismos distantemente relacionados. Ambas regiões são necessárias. As regiões altamente conservadas são muito úteis para encontrar os genes 16S rRNA em diferentes amostras, e por isso, as regiões conservadas da molécula 16S rRNA servem como alvo para os iniciadores de PCR. Vários conjuntos de iniciadores universais estão disponíveis para estas regiões; enquanto as regiões variáveis são essenciais para distinguir um grupo microbiano de outro; (3) filogenias derivadas do gene 16S

rRNA confirmam filogenias derivadas de outros genes, e são, portanto, adequadas para representar a história evolutiva (KIRCHMAN, 2012).

Considerando que o Conceito Biológico de Espécies não se aplica aos microrganismos com reprodução assexuada, como bactérias e leveduras; e que este estudo não está endereçado a reconstruir as relações filogenéticas e a história evolutiva das espécies de microrganismo, o Conceito Filogenético de Espécies também não se aplica à abordagem aqui utilizada para a produção de resultados. Então, será utilizado o Conceito Fenético de Espécie, endereçado para a diferenciação taxonômica de microrganismos associados a *An. darlingi* em uma dada região da Amazônia. Ou seja, o conceito de espécie adotado nesta tese tem um significado operacional e não necessariamente biológico, não sendo possível fazer inferências de processos evolutivos. Para estas medidas são utilizadas informações de genes conservados, que quando usados para discriminação de bactérias (como 16S, 23S rRNA, subunidades da ATPase, fatores de alongação, genes de RNA polimerases) mostram alto grau de correspondência quando analisados entre si (KIRCHMAN, 2012; MCARTHUR, 2006; ROSSELLÓ-MÓRA, 2012).

Aplicações similares vem sendo amplamente utilizadas nos últimos anos e os bancos de dados estão ficando cada vez mais informativos e robustos, aumentando a chance de atingir os resultados esperados nas buscas por homologias. Por outro lado, a utilização dessas sequências pode enfrentar problemas principalmente por poderem ser comparadas com sequências associadas a taxonomia incorreta. Pois o depósito das sequências em alguns bancos de dados, como Genbank, são realizados pelo próprio usuário, sem grandes exigências ou curadoria (ROSSELLÓ-MÓRA, 2012; YARZA et al., 2010).

Para minimizar esses problemas, banco de dados especializados em determinados grupos taxonômicos vem sendo criados com maiores critérios para minimizar este problema. Para bactérias por exemplo recomenda-se a utilização do *Ribosomal Database Project* (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>) (COLE et al., 2009, 2014); *SILVA RNA database project* (<http://www.arb-silva.de>) e *Greengenes database project* (<http://greengenes.lbl.gov/>) (DESANTIS et al., 2006).

No caso de microrganismos associados a insetos vetores de doenças, a identificação molecular vem sendo realizada com o intuito de conhecer esta diversidade bacteriana. Este conhecimento pode ser útil para prospectar ferramentas de intervenções nos ciclos das doenças utilizando estes microrganismos.

Um repositório importante para informação sobre a identificação e taxonomia de bactérias é o Bergey's Manual. Primeiramente produzido por um comitê presidido por David

H. Bergey, o manual foi publicado pela primeira vez em 1923 pela *Society of American Bacteriologists*, agora chamada de *American Society for Microbiology* (KIRCHMAN, 2012). O manual teve várias atualizações, principalmente após o incremento das identificações moleculares e atualmente chama-se *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (BMSAB). A edição de 2015, é considerada a descrição mais completa e oficial da diversidade de bactérias e archaeas. Pela primeira vez disponível on-line, esta edição oferece descrições da taxonomia, sistemática, ecologia, fisiologia e outras propriedades biológicas de todos os taxa procariotos descritos até a data da publicação.

Nas primeiras edições do *Bergey's Manual*, as bactérias eram agrupadas de acordo com a morfologia (bastonete, cocos), as reações de coloração, a presença de endosporos e outras características. Embora esse sistema tenha uso prático, os microbiologistas tinham consciência de que existiam limitações, como se morcegos e pássaros fossem agrupados juntos pelo fato de terem asas. O conhecimento das bactérias em nível molecular se expandiu a tal ponto que, agora, foi possível basear a última edição do *Bergey's Manual* em um sistema filogenético, tomando por base o Conceito Fenético de Espécies. Alguns microbiologistas acharam essa mudança perturbadora, mas ela reflete diferenças importantes. Essas diferenças são principalmente no RNA ribossômico (rRNA) dos microrganismos, que varia lentamente e realiza as mesmas funções em todos os organismos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Uma outra ferramenta para a taxonomia microbiana é MLSA (*Multilocus sequence analysis*). Esta abordagem baseia-se na utilização de diversas sequências completas ou parciais de genes *housekeeping*, concatenados num único seguimento, que são globalmente analisadas para o conjunto de estirpes em estudo. A recomendação original para fins taxonômicos foi o uso de cinco sequências completas ou 10 sequências parciais, um evento que ocorre raramente. Mas a principal dificuldade que um cientista pode enfrentar utilizando este método é a construção de uma base de dados adequada para os seus cálculos. Apesar de algumas exceções, os pesquisadores precisam mergulhar em repositórios públicos, a fim de selecionar os diferentes genes para serem usados (ROSSELLÓ-MÓRA, 2012). Assim, muitos ecologistas microbianos evitam o uso de "espécie" e em vez disso usam outros termos que podem ser definidas operacionalmente pelo investigador. Os termos incluem ribótipo, *phylotype* e unidade taxonômica operacional (OTU). Usualmente estes termos são usados para descrever organismos com sequências de rRNA 16S que são  $\geq 97\%$  semelhantes (KIRCHMAN, 2012; ROSSELLÓ-MÓRA, 2012). Microbiologistas arbitrariamente consideram que duas bactérias são da mesma espécie se os seus genes 16S rRNA são  $\geq 97\%$  idênticos (ROSSELLÓ-MÓRA, 2012).

Este corte de  $\geq 97\%$  é baseado em dados que comparam a semelhança de 16S rRNA contra hibridação DNA-DNA para bactérias em culturas puras. A hibridação DNA-DNA é expressa como uma porcentagem da quantidade do genoma de um organismo que hibrida ou liga-se ao genoma de um outro organismo. Alguns dos dados sugerem que dois organismos pertencem a uma mesma espécie, se a sua hibridação DNA-DNA for de pelo menos 70%. Este nível de 70% corresponde com o limiar de 97% nos dados de 16S rRNA. Porém existem problemas com este limiar. Dois organismos podem ter sequências de 16S rRNA que não são  $>97\%$  idênticos e não pertencem à mesma espécie. O problema é que dois organismos que partilham  $\geq 97\%$  16S rRNA genes idênticos podem ou não podem pertencer à mesma espécie. Um exemplo são os ecótipos da cianobactéria *Prochlorococcus*. Outro exemplo são os genes 16S rRNA de três espécies de *Bacillus* (*B. anthracis*, *B. thuringiensis* e *B. subtilis*) são  $> 99\%$  idênticos, ainda assim, características de sua fisiologia são muito diferentes, razões pelas quais elas são tratadas como espécies separadas (KIRCHMAN, 2012). Há ainda autores que sugerem valores de corte na identidade do gene 16S rRNA para vários níveis taxonômicos. (Tabela 1).

**Tabela 1 – Determinação da hierarquia taxonômica de acordo com a similaridade de sequências 16S rRNA**

HIERARQUIA TAXONÔMICA	IDENTIDADE
Cepa/estirpe	$>97\%$
Espécie	97-99%
Gênero	$>95\%$
Família	$>90\%$
Ordem	$>84\%$
Classe	$>78\%$
Filo	$>75\%$

Fonte: (KIRCHMAN, 2012; KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2007).

Com a redução de custos de sequenciamento e o grande aumento na obtenção de informações de alto rendimento para a geração de bancos de dados interativos, a identificação molecular é o método que vem sendo implementado, permitindo assim, uma aceleração no processo de classificação da taxonomia procariótica. Segundo Rosselló-Móra (2012) o gargalo na classificação de organismos provavelmente será o desenvolvimento de condições de cultura que permitam o isolamento da diversidade (ROSSELLÓ-MÓRA, 2012).

Para leveduras, assim como para outros fungos, as regras para a taxonomia obedecem ao Código Internacional de Nomenclatura Botânica (KURTZMAN; FELL, 1998). Leveduras têm grande importância na saúde pública, na indústria e agricultura e ainda seu relevante papel ecológico como decompositores (BEGON; HARPER; TOWNSEND, 2006a; KURTZMAN; FELL, 1998; RICKLEFS, 2010).

Existem vários métodos para a identificação de leveduras que foram padronizados desde a publicação de Wickerham (1951). Os detalhes, no entanto, podem variar de um laboratório para outro (KURTZMAN; FELL, 1998). O método convencional de Wickerham é baseado em testes para verificar a assimilação e a fermentação de diferentes compostos. Os ensaios de assimilação são para determinar a capacidade de utilizar substratos como a única fonte de carbono (por exemplo, sacarose). Este método é uma ferramenta poderosa e foi utilizado para a caracterização da taxonomia de leveduras. Porém, todo o processo para a identificação é longo e árduo e podem demorar até 4 semanas. Este "padrão ouro" é inadequado para utilização em laboratórios de rotina, no qual se processam muitas amostras, e foi substituído por outros métodos mais práticos (PINCUS; ORENGA; CHATELLIER, 2007).

Alguns testes rápidos de identificação foram desenvolvidos para amostras clínicas, como para *Candida* sp. Outros métodos baseados em compostos cromogênicos de primeira e segunda geração também foram desenvolvidos. Porém, funcionam bem com a maioria dos isolados de levedura clínicas, que pertencem a relativamente poucas espécies, mas para isolados incomuns há potencial para erros de identificação sem um teste mais abrangente (PINCUS; ORENGA; CHATELLIER, 2007).

A biologia molecular tem proporcionado novas ferramentas para micólogos taxonomistas e as técnicas de PCR e sequenciamento de genes relevantes fornecem uma identificação rápida e precisa de um grande número de leveduras. Atualmente, novas espécies não podem ser descritas sem a análise de algumas sequências nucleotídicas, uma vez que proporcionam uma separação mais objetiva de gêneros e espécies do que por testes fenotípicos (PINCUS; ORENGA; CHATELLIER, 2007). Ademais, a partir de comparações de sequências de genes, estirpes que representam novas espécies são geralmente reconhecidas. No entanto, alguns autores argumentam contra a descrição de uma nova espécie com base em uma única cepa. O argumento é que uma única estirpe não reflete a variação genética que pode ser encontrada em uma espécie, e que pouco pode ser aprendido da ecologia de uma espécie quando apenas uma única estirpe está disponível (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

A identificação das leveduras baseado em genes ribossomais tem ganhado destaque nos últimos anos e são os alvos mais populares para os ensaios baseados em PCR. As subunidades do DNA ribossomal (rRNA) contêm domínios altamente conservados separados por domínios mais variáveis que exibem sequências específicas de espécies, tornando-os um alvo de escolha para desenhar iniciadores universais para PCR ou iniciadores para gêneros específicos ou espécies (KURTZMAN; FELL, 1998; PINCUS; ORENGA; CHATELLIER, 2007).

A região rRNA consiste em genes que codificam para as subunidades pequenas (18S, 5.8S) e subunidades grandes (26S) do DNA ribossomal, separadas pelos espaçadores transcritos internos nomeados ITS1 e ITS2. Além disso, rRNA está presente em múltiplas cópias no genoma de leveduras. Um alvo de múltiplas cópias deverá conduzir a um ensaio baseado em PCR mais sensível do que a PCR com alvo de cópia única. Além disso, DNAs ribossomais são as sequências de DNA de fungos mais frequentes disponíveis nos bancos de dados públicos, tornando mais fácil para as pesquisas de homologia de sequência. Vários iniciadores universais de fungos foram concebidos e utilizados nas subunidades 18S, 5.8S ou na região do rRNA 26S, bem como nas regiões ITS1 e ITS2 (CIARDO et al., 2010; FERRER et al., 2001; MANTER; VIVANCO, 2007; RICCI et al., 2011), pois estas representam regiões altamente conservadas.

Ao longo das últimas décadas a grande subunidade (LSU) do rRNA 26S (domínio D1/D2) tornou-se o alvo de escolha para análises de sequências de leveduras (KURTZMAN, 2014). Kurtzman e Robnett (1997) demonstraram que o sequenciamento de uma região variável de 600 nucleótidos (D1/D2) permite uma separação confiável de uma vasta gama de espécies de leveduras clinicamente relevantes (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; PINCUS; ORENGA; CHATELLIER, 2007). Este achado foi ainda confirmado por sequenciamento do domínio D1/D2 em ascomicetos e espécies de leveduras basidiomicéticas e fungos *yeast-like* (FELL et al., 2000; KURTZMAN; ROBNETT, 1997, 1998; SCORZETTI et al., 2002). Estes estudos aumentam a cada dia e incrementam consideravelmente o número de sequências de domínio D1/D2 disponíveis em bases de dados (FERREIRA et al., 2010; KURTZMAN, 2014).

As análises moleculares têm contribuído de forma destacada para o sistema de classificação. A detecção, identificação e classificação de leveduras sofreram uma grande transformação na última década e meia, após a aplicação de análises de sequências de genes e comparações de genomas. O desenvolvimento de bancos de dados de sequências de genes que são facilmente determinados, como os domínios D1/D2 da subunidade grande do rRNA, 26S,

e do espaçador transcrito interno (ITS) permite agora que muitos laboratórios identifiquem as espécies com precisão, e isso levou a uma duplicação do número de espécies conhecidas de leveduras durante a última década. A análise filogenética de sequências de genes resultou em uma grande revisão da sistemática de leveduras, resultando em redefinições de quase todos os gêneros (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; KURTZMAN, 2014).

### 3.9 ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DA MALÁRIA

Mosquiteiros, inseticidas sintéticos para o controle do vetor e medicamentos contra a malária são algumas estratégias empregadas para o controle da doença. Mas o controle de vetores é atualmente a principal forma para prevenir e reduzir a transmissão da malária. Duas formas de controle de vetores são eficazes em uma ampla gama de circunstâncias: mosquiteiros tratados com inseticida (MTI) e pulverização residual interna (IRS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2015). Porém, existem duas grandes preocupações, o problema da resistência do *Plasmodium* às drogas empregadas no tratamento da doença e resistência dos mosquitos aos inseticidas utilizados. Em muitos países, o progresso no controle da malária está ameaçado pelo rápido desenvolvimento e disseminação de resistência às drogas antimaláricas. Até à data, a resistência de *P. falciparum* à artemisinina - o principal componente dos melhores medicamentos antimaláricos disponíveis - foi detectado em 5 países da sub-região do Grande Mekong (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Para *P. vivax*, pelo menos um caso de resistência à cloroquina foi confirmado em 10 países: Bolívia, Brasil, Etiópia, Indonésia, Malásia, Myanmar, Papua Nova Guiné, Peru, Ilhas Salomão e Tailândia. A resistência dos mosquitos aos inseticidas é outra preocupação crescente. Desde 2010, 60 dos 78 países que monitoram a resistência aos inseticidas relataram resistência dos mosquitos a pelo menos um inseticida usado em redes e borrifação intradomiciliar; Desses, 49 relataram resistência a duas ou mais classes de inseticidas (WORLD HEALTH ORGANIZATION et al., 2015).

Ademais, pesquisadores se esforçam no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra malária (ARAMA; TROYE-BLOMBERG, 2014; SCHWARTZ et al., 2012) e em 2015 foi divulgada a primeira vacina contra a malária que obteve um parecer científico positivo da Agência Europeia de Medicamentos (EMA). Foi recomendada a implementação piloto da vacina RTS, S em três a cinco regiões na África subsaariana. A OMS adotou estas recomendações e apoia veementemente a necessidade de prosseguir com os testes pilotos como o próximo passo para a primeira vacina contra a malária do mundo. A RTS, S é uma



vacina com eficácia parcial, mas quando combinada com outras ferramentas no arsenal de controle da malária, pode ter um grande impacto. A RTS, S foi desenvolvida através de uma parceria entre a *GlaxoSmithKline Biologicals* (GSK) e a *PATH Malaria Vaccine Initiative* (MVI), com o apoio da Fundação Bill & Melinda Gates e de uma rede de centros de investigação africanos. O teste clínico de RTS, S é de pelo menos 5 a 10 anos à frente de outras vacinas candidatas contra a malária. Mais de 20 outras candidatas a vacinas contra a malária estão atualmente sob avaliação em ensaios clínicos ou estão em desenvolvimento pré-clínico avançado (WHO, 2016b). No entanto, a RTS, S é uma vacina contra malária por *P. falciparum*, o parasita mais frequente na África e, portanto, não é eficaz contra a malária amazônica.

Em linhas gerais, o atual esforço para o controle da malária é centrado no desenvolvimento de produtos e processos existentes (por exemplo, as drogas e a distribuição de mosquiteiros) para reduzir a morbidade e mortalidade por malária. No entanto, é aceito que a erradicação não será alcançada com as ferramentas atuais (MALERA, 2011). Estratégias baseadas em 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 (SALDAÑA; HEGDE; HUGHES, 2017).

### **3.10 POTENCIAL DA PARATRANSGÊNESE PARA O CONTROLE DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR INSETOS, ESPECIALMENTE MALÁRIA**

Abordagens com modificações genéticas de bactérias isoladas de mosquitos para entregar moléculas anti-*Plasmodium* têm se destacado (BISI; LAMPE, 2011; BONGIO; LAMPE, 2015; WANG et al., 2012). Outros estudos mostraram que *Anopheles* com uma rica microbiota parecem ser mais resistentes a infecções por *Plasmodium* e, complementarmente, que certas bactérias (p.ex. *Enterobacter* sp. (*Esp\_Z*)) inibem parcialmente ou totalmente a formação de oocineto, oocisto e de esporozoítos (DONG; MANFREDINI; DIMOPOULOS, 2009; CIRIMOTICH1, et al., 2011), ficando claramente demonstrado que enterobactérias presentes em populações de *Anopheles* tem uma grande influência sobre a transmissão do parasita (BOISSIÈRE et al., 2012).

A despeito de todas as estratégias descritas, o estudo da microbiota no trato digestório de *Anopheles* pode ser crucial para o desenvolvimento de frentes alternativas de combate à malária e outras doenças transmitidas por insetos. No intestino desses insetos

podem co-habitar diferentes bactérias e o *Plasmodium*, agente causador da malária. Tais estudos buscam entender se a microbiota desses mosquitos está relacionada ao gargalo populacional (de oocinetos para oocistos) que ocorre na etapa do ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium* no intestino do mosquito vetor. Existem autores que acreditam que ao se conhecer os microrganismos que interagem com o *Plasmodium* neste habitat, talvez, seja possível interferir no ciclo de malária dentro do intestino do mosquito. Tal interferência pode ser utilizada como estratégia para bloquear a transmissão do parasita utilizando a técnica de paratransgênese, i.e., a manipulação genética de simbiontes intestinais (Riehle e Jacobs-Lorena 2005) com objetivo expressar moléculas antiparasitárias que exerçam uma ação direta no parasita.

O conhecimento acerca dos microrganismos que interagem com o *Plasmodium* em seu habitat pode ser explorado para bloquear a transmissão de malária dentro do intestino do mosquito *Anopheles*. Por exemplo, modificações genéticas nas bactérias isoladas dos mosquitos para entregar moléculas anti-*Plasmodium* têm sido investigadas (BISI; LAMPE, 2011; BONGIO; LAMPE, 2015; WANG et al., 2012).

Wang et al. (2012) relataram a presença de bactérias simbióticas, tal como *Pantoea agglomerans* no lúmen do intestino médio. Estas bactérias foram modificadas geneticamente para produzir proteínas efetoras anti-*Plasmodium* que tornam o mosquito hospedeiro refratário à infecção de malária. Esses autores também relataram que linhagens engenheiradas de *P. agglomerans* foram capazes de inibir o desenvolvimento de *Plasmodium falciparum* em até 98% (WANG et al., 2012).

Os trabalhos publicados por Ricci e colaboradores (2011a, 2011b, 2012) chamaram a atenção para o uso potencial de leveduras engenheiradas no controle de doenças transmitidas por insetos, como a malária. Alguns exemplos encontrados na literatura sobre espécies de leveduras associadas a esses insetos são *W.anomalus* (*P. anomala*) (RICCI et al., 2011), *Pichia caribbica* (Gusmão et al., 2007) e *P. guilliermondii* (Gusmão et al., 2010; Ricci et al., 2011; Ricci et al., 2012). A levedura *W. anomalus* foi considerada candidatas à paratransgênese e pode futuramente ser utilizada para interferir no ciclo da malária dentro do mosquito vetor (RICCI et al., 2011, 2012b, 2014). Argumenta-se que o isolamento e identificação de leveduras, assim como a caracterização de suas propriedades devem ser encorajados. Pois esses microrganismos podem ser utilizados como um sistema eucarioto de expressão heteróloga. Uma grande vantagem de leveduras em relação aos sistemas de expressão em bactérias é o potencial de realizar muitas das modificações pós-traducionais tipicamente associados com eucariotos, tais como o processamento de sequências de sinal,

dobramentos, formação de ponte dissulfeto, certos tipos de adição de lipídeos, e a glicosilação O e N-ligada (CREGG et al., 2000). Assim, as proteínas eucarióticas são mais susceptíveis de ser corretamente processadas, dobradas e montadas em moléculas funcionais quando sintetizadas numa levedura (CREGG, 2007).

Há, também, grupos de pesquisas que desenvolvem estudos de paratransgênese para o controle da malária com fungos filamentosos (RASGON, 2011) e vírus (REN; HOICZYK; RASGON, 2008). No entanto, esforços concentraram-se na manipulação de bactérias (BEARD; CORDON-ROSALES; DURVASULA, 2002; WANG et al., 2012).

Os critérios para a realização de paratransgênese divergem entre autores. Wang e Jacobs–Lorena (2013) citam cinco condições básicas para realização de paratransgênese: (i) Relação simbiótica estável entre microrganismo e vetor; (ii) Microrganismo simbiote que possa ser cultivado *in vitro* e manipulado geneticamente; (iii) O produto do gene efetor não deve prejudicar o simbiote e a capacidade de sobrevivência e reprodução do vetor; (iv) O produto do gene efetor deve ser secretado para assegurar a interação com o patógeno alvo; (v) Uma maneira eficiente de introduzir o simbiote engenheirado a campo deve ser idealizado (WANG; JACOBS-LORENA, 2013). Por sua vez, Wilke e Marelli (2015) citam quatro condições básicas para realização de paratransgênese: (i) É necessário que exista uma molécula efetora que realize o efeito desejado; (ii) Um mecanismo para expor ou secretar a molécula efetora; (iii) Uma bactéria que possa sobreviver no mosquito tempo suficiente para produzir a quantidade esperada de moléculas efetoras e assim alcançar o efeito desejado no mosquito; (iv) Identificação de uma bactéria adequada que não seja patogênica a humanos e animais (WILKE; MARRELLI, 2015). Apesar das divergências, os objetivos são os mesmos, i.e., obter uma estratégia eficaz que auxilie no controle das doenças transmitidas por insetos.

Quando comparada aos mosquitos modificados geneticamente, a paratransgênese pode ser observada como uma técnica mais flexível. Pois as moléculas efetoras (e.g. peptídeos) e o microrganismo simbiótico (bactéria ou levedura) podem ser substituídos se o resultado esperado não for atingido. Além disso, a transgenia de mosquitos enfrenta entraves quando se pensa na disseminação dos transgênicos a campo, como a existência de subespécies e diferentes populações. Tais condições podem dificultar a passagem da informação genética efetora para as próximas gerações (WILKE; MARRELLI, 2015). Outra vantagem da paratransgênese foi apresentada por Wang e colaboradores (2012), eles argumentaram que a máxima efetividade do bloqueio do parasita deverá ser obtida quando as moléculas efetoras forem secretadas do microrganismo engenheirado para o lúmen intestinal, permitindo a difusão das moléculas para o parasita ou alvos no intestino médio do inseto. Os parasitas da

malária (GHOSH et al., 2011) e da leishmaniose (RAMALHO-ORTIGAO et al., 2010) são exemplos cuja interação ligante-receptor é essencial para o parasita atingir um estágio infeccioso ao hospedeiro vertebrado.

Em referência a aplicação da técnica de paratransgênese, há um projeto em destaque, não está relacionado a malária, mas a outra doença parasitária, a doença de Chagas. Houve a inibição de *Trypanosoma cruzi* por bactérias *Rhodococcus rhodnii*, simbiontes do intestino do hospedeiro *Rhodnius prolixus*, que foram geneticamente modificadas (BEARD; CORDON-ROSALES; DURVASULA, 2002). Neste sistema, a Cecropina A e um anticorpo de cadeia simples foram expressos em *R. rhodnii* e ambos os peptídeos exibiram atividade inibitória eficaz contra *T. cruzi in vivo* (DURVASULA et al., 1997, 1999). Além disso, foi desenvolvido um método para a dispersão dos simbiontes recombinantes em populações naturais do inseto hospedeiro. Na qual, ninfas de *R. prolixus* adquirem *R. rhodnii* simbióticas sondando as fezes contaminada de adultos. Este comportamento alimentar (coprofagia) foi explorado pela adição dos simbiontes geneticamente modificados em uma pasta sintética chamada CRUZIGARD, que foi dispersa como gotículas no meio ambiente. A adição de uma pequena quantidade de sulfato de amônio na pasta, simulando fezes naturais de *R. prolixus* estimulou a alimentação de ninfas de *R. prolixus* (DURVASULA et al., 1997).

Apesar desse progresso, a avaliação e gerenciamento de risco ambientais são desafios inerentes associados à libertação de organismos geneticamente modificados. Não está claro se simbiontes transformados podem substituir os não transformados em populações de insetos naturais, embora tenha sido relatado não haver déficits de *fitness* devido à modificação genética dos simbiontes a partir de experimentos de laboratório. Outros desafios são: a instabilidade do DNA introduzido nas bactérias e se os simbiontes de alguns insetos serão transformados eficientemente.

Outro trabalho que merece destaque é o estudo piloto de semi-campo de Mancini e colaboradores (2016) com paratransgênese para controlar vetores da malária (MANCINI et al., 2016). Os autores utilizaram bactéria do gênero *Asaia* expressando GFP (*Green Fluorescent protein*) para serem dispersas por mosquitos *An. stephensi* e *An. gambiae* em condições controladas. As bactérias foram detectadas nos mosquitos diretamente por microscopia de fluorescência e análises moleculares. Além disso, em *An. gambiae* uma transmissão vertical das bactérias fluorescentes foi demonstrada. Os dados obtidos confirmam o potencial para empregar *Asaia* transgênica como uma ferramenta para o controle da malária, ampliando uma perspectiva promissora para a sua aplicação no campo com moléculas efetoras adequadas (MANCINI et al., 2016).

Existe, portanto, a necessidade de descrever a microbiota associada ao intestino desse anofelino brasileiro para o registro de espécies de microrganismos, assim como a necessidade de caracterizá-los para identificar potenciais candidatos à paratransgênese (VILLEGAS; PIMENTA, 2014). Enfim, a descrição da riqueza de espécies de microrganismos cultiváveis associados a *An. darlingi* na região Amazônica é a base para o desenvolvimento de paratransgênese, uma solução biotecnológica para o controle da Malária no Brasil.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 COLETA E TRIAGEM DOS MOSQUITOS

A coleta das fêmeas dos mosquitos *An. darlingi* foi realizada através da atração humana protegida utilizando aspiradores manuais (capturador de Castro). As capturas ocorreram em locais habituais para a coleta, em oito datas diferentes (Tabelas 2 e 3), de acordo com a disponibilidade da equipe técnica responsável pelas coletas. Os mosquitos, após capturados, foram transferidos diretamente para gaiolas de transporte, as quais foram dispostas em caixas térmicas cobertas com sacos de polietileno e recortes de tecido umedecido com água para manter temperatura e umidade relativa durante o transporte até o laboratório. No Laboratório de Entomologia da Fiocruz Rondônia, os mosquitos foram identificados utilizando características morfológicas descritas em chave dicotômica de identificação (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

**Tabela 2 - Data e local de coletas de fêmeas de *Anopheles darlingi* capturadas na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil, utilizadas para o isolamento de bactérias cultiváveis associadas a essa espécie de mosquito.**

Data	Local	Coordenadas Geográficas	Número de mosquitos coletados
05/09/2014	Rio Candeias	08°48'56.8" S 63°42'4.2" W	10
29/09/2014	Sítio	08°38'00.3" S 63°55'51.9" W	20
08/10/2014	Sítio	08°38'00.3" S 63°55'51.9" W	10
15/10/2014	Sítio	08°38'00.3" S 63°55'51.9" W	10
03/11/2014	Sítio	08°38'00.3" S 63°55'51.9" W	10
Total	-	-	60

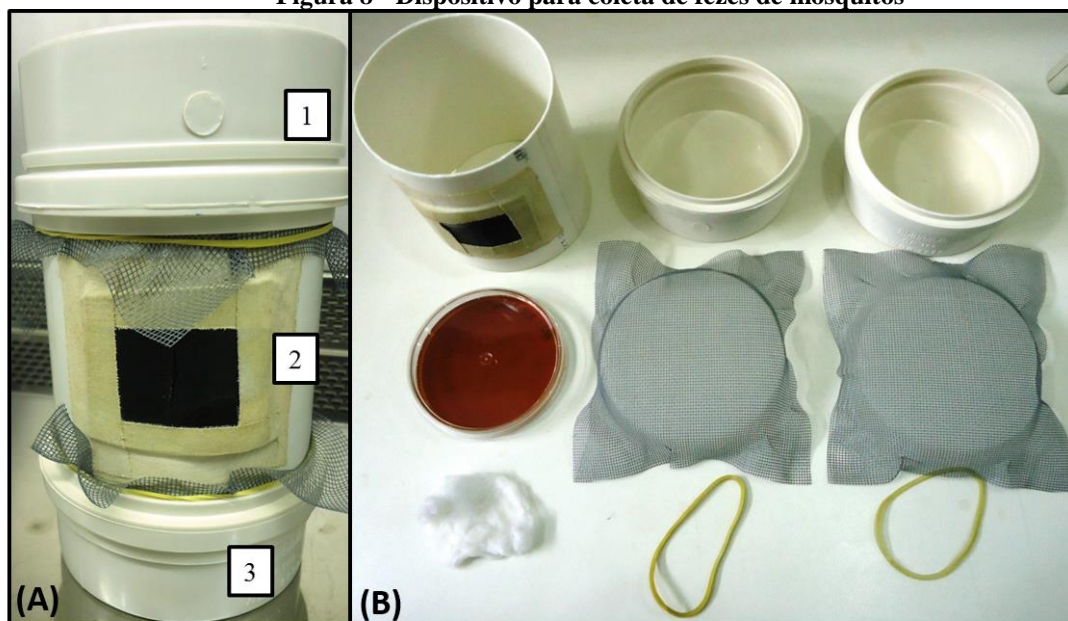
**Tabela 3- Data e local de coletas de fêmeas de *Anopheles darlingi* capturadas na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil, utilizadas para o isolamento de leveduras cultiváveis associadas a essa espécie de mosquito**

Data	Local	Coordenadas Geográficas	Número de mosquitos coletados
22/ 08/ 2013	Rio Candeias	08°48'56.8" S 63°42'4.2" W	20
23/ 09/ 2014	Sítio	08°38'00.3" S 63°55'51.9" W	20
03/11/2014	Sítio	08°38'00.3" S 63°55'51.9" W	10
26/01/2015	Sítio	08°38'00.3" S 63°55'51.9" W	10
Total	-	-	60

## 4.2 AMOSTRAGEM E TRIAGEM DAS BACTÉRIAS E DAS LEVEDURAS

A obtenção das bactérias e das leveduras contidas nas fezes dos mosquitos capturados foi realizada utilizando gaiolas desenvolvidas especificamente para este experimento (Figura 8). Pela inexistência de métodos para coletar bactérias e leveduras contidas nas fezes de mosquitos foi desenvolvido um método para atingir tal objetivo (ARRUDA et al., 2017). Destaca-se que, desde a captura até o laboratório, os mosquitos não receberam nenhuma alimentação ou repasto sanguíneo.

**Figura 8 - Dispositivo para coleta de fezes de mosquitos**



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

Os dispositivos para a coleta de microrganismos contidos nas fezes de mosquitos foram previamente higienizados com água e sabão neutro, enxaguado com água destilada e depois lavou-se com etanol a 70%. Em seguida, o dispositivo foi mantido dentro de um gabinete de segurança microbiológico, exposto à luz ultravioleta por uma hora, sendo girado em 180° após 30 minutos. Esta higienização se fez necessária para evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis à finalidade do experimento. Em seguida os dispositivos foram embalados em plástico filme até sua utilização.

Além disso, a esterilidade da superfície interna do dispositivo de coleta de fezes foi verificada após a limpeza e tratamento com luz ultravioleta. Três dispositivos foram amostrados de forma asséptica com hastes de algodão estéril. Em seguida, as amostras foram estriadas sobre a superfície das placas de Petri contendo meio de cultura LB ágar. Essas inoculações foram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 24 horas. Nenhuma colônia de microrganismo foi observada em cada placa após 24 horas.

Os mosquitos foram dispostos nas gaiolas específicas para coleta de fezes utilizando capturadores de Castro à base de sucção higienizados. Em seguida, eles foram alimentados *ad libitum* utilizando algodão autoclavado embebido em sacarose 10% autoclavada.

Para isolar bactérias, as fezes dos mosquitos foram coletadas diretamente em placas de Petri (90 mm) contendo meio de cultura Luria-Bertani ágar (LB - extrato de levedura 0,5%, triptona 1% e cloreto de sódio 1%, ágar bacteriológico 1,5%) como descrito por Rani e colaboradores (2009) (RANI et al., 2009).

Para isolar leveduras, as fezes dos mosquitos foram coletadas diretamente em placas de Petri (90 mm) contendo o meio de cultura YPD com Cloranfenicol (Extrato de levedura 1%, Triptona ou Peptona 2%, Dextrose 2%, ágar bacteriológico 2%, Cloranfenicol 34 µg/mL).

Para o isolamento de bactérias foram utilizadas 15 gaiolas, três gaiolas sem mosquito, referente aos controles negativos, e 12 gaiolas contendo cinco mosquitos em cada, totalizando 60 mosquitos. O mesmo delineamento foi utilizado para leveduras.

As três gaiolas utilizadas como controle negativo não continha mosquitos. Assim, para cada controle negativo foi disposta uma placa coletora contendo o meio de cultura para coleta de microrganismos para verificar se havia crescimento de microrganismos, mesmo após a higienização previa como descrito anteriormente.

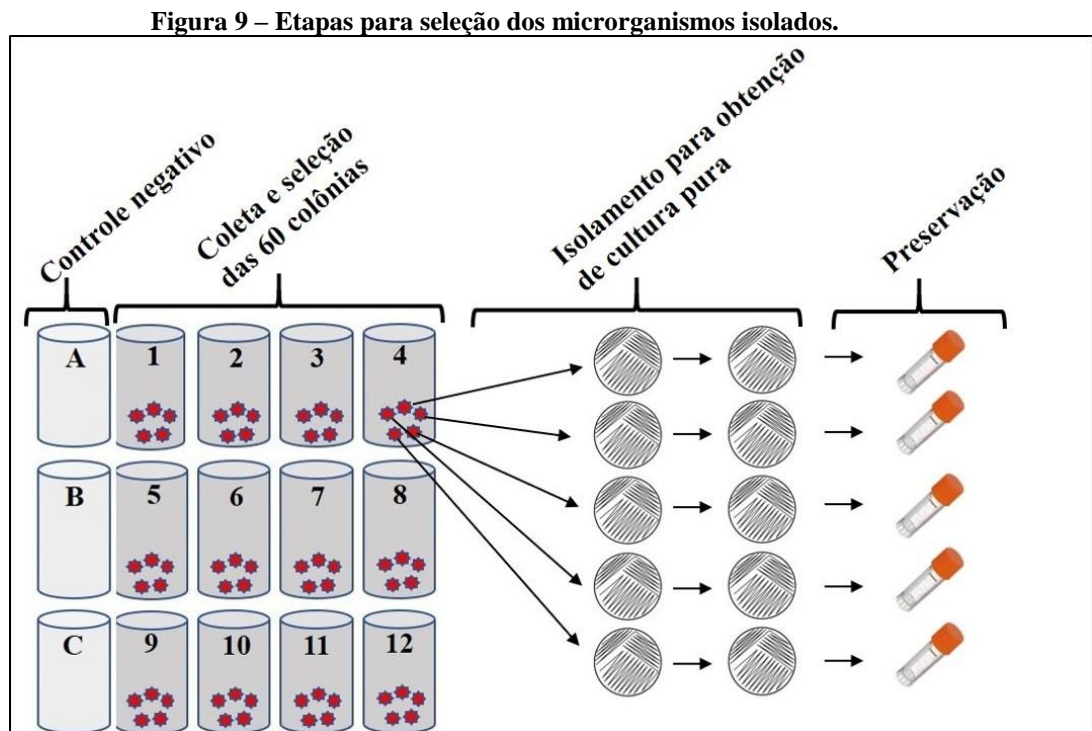
Após 24 horas, as placas de Petri contendo meio de cultura e fezes de mosquitos foram retiradas das gaiolas e transferidas para uma estufa de cultivo. As placas de Petri coletoras contendo as fezes de mosquito em meio de cultura LB, para selecionar bactérias,



foram incubadas a 37 °C por 24 horas (RANI et al., 2009). As placas de Petri coletoras contendo as fezes de mosquito em meio de cultura YPD com Cloranfenicol 34 µg/mL, para selecionar leveduras, foram incubadas a 30 °C por 48 horas.

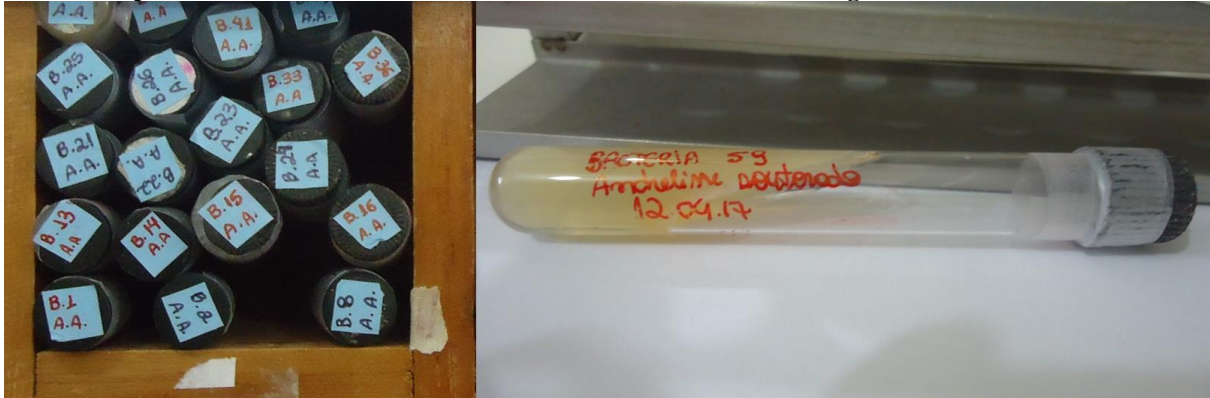
Após os períodos de crescimento determinados, as colônias visíveis foram analisadas com o intuito de selecionar os microrganismos que foram coletados. Na tentativa de obter-se a maior diversidade possível, durante a seleção dos microrganismos, foi priorizada a amostragem de colônias isoladas e com morfologia diversa (GUSMÃO et al., 2010).

Foram selecionados cinco isolados de cada uma das 12 placas coletoras para bactérias e cinco isolados a partir de cada uma das 12 placas coletoras para levedura, totalizando 60 isolados de bactérias e 60 isolados de leveduras. As coletas dos microrganismos foram realizadas de acordo com as datas das captura dos mosquitos (Tabelas 2 e 3). Os isolados selecionados foram repicados para novas placas de Petri contendo os meios de cultura supracitados com o intuito de aumentar a chance de isolamento das colônias e assim, garantir a obtenção de culturas puras (método de esgotamento por estrias). As colônias isoladas de bactérias e leveduras foram armazenadas individualmente em solução de glicerol 15% na temperatura de -80 °C (Figura 9).



Ademais, as bactérias foram identificadas com números ordinais e os isolados estão preservados em meio ágar nutriente devidamente identificados na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Fiocruz Rondônia (Figura 10).

**Figura 10 – Amostra de um isolado de bactéria a partir das fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* de campo armazenados na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Fiocruz Rondônia**



### 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE BACTÉRIAS

O DNA genômico das bactérias foi extraído conforme descrito no protocolo padrão para extração de DNA genômico de bactérias do Laboratório de Microbiologia Molecular da Fiocruz Rondônia. Cada uma das 60 colônias de bactéria foi inoculada em 3 mL de meio LB e cultivada sob agitação durante a noite. No dia seguinte, 1,5 mL de cultura bacteriana foi coletada em tubo tipo eppendorf. A cultura foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 300 µL de tampão TEN (Tris 0,05M; EDTA 0,05M; NaCl 0,1 M). Em seguida foi adicionado 30 µL de lisozima (20 mg/mL). A mistura foi homogeneizada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente adicionou-se 50 µL de Triton X-100 10% e 20 µL de NaCl 3M. A mistura foi novamente homogeneizada. A mistura foi aquecida a 60 °C por 5 minutos e deixada a temperatura ambiente por 2 minutos. Foi então adicionado 3 µL de RNase (10 mg/mL) e homogeneizada por inversão do tubo. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Foi adicionado à mistura 50 µL de SDS 10% e homogeneizado por inversão do tubo. Em seguida adicionou-se 30 µL de proteinase K (10 mg/mL) e procedeu-se com homogeneização seguida de incubação a 37°C por 30 minutos. Foi adicionado 400 µL de fenol e agitado sem vortex por 5 minutos.

A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 rpm. A fase aquosa foi recuperada e colocada em outro tubo tipo eppendorf de 1,5 mL. Foram adicionados 400 µL de clorofórmio e agitado por 5 minutos sem vortex. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a

12.000 rpm. A fase aquosa foi recuperada e colocada em outro tubo tipo eppendorf de 1,5 mL. Foi adicionado 40 µL de NaCl 3M e vagarosamente adicionado 1 mL de etanol 100%. A mistura foi homogeneizada e as amostras foram estocadas a -20 °C durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 12.000 rpm, 4 °C. O sobrenadante foi dispensado e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70%. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm, 4 °C. O sobrenadante foi dispensado e o sedimento foi seco em centrifuga à vácuo por 30 minutos. O sedimento seco foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE (Tris 0,01M; EDTA 0,01M; Tris-HCl 0,01 M). As amostras foram congeladas a -20 °C até o momento de sua utilização.

#### **4.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE LEVEDURAS**

O DNA cromossomal foi extraído de cada uma das 60 colônias isoladas de leveduras utilizando um protocolo de isolamento de DNA genômico para fungos (FERRER et al., 2001). A partir do cultivo de cada levedura em placa de YPD ágar com Cloranfenicol foi coletado biomassa do cultivo em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. O material foi estocado a -20 °C durante a noite. Ao material congelado, foram adicionados 500 µL de tampão de lise (Tampão de lise - 100 mL (0,5 g SDS; 1,4 g de NaCl; 0,73g de EDTA, 20 mL Tris-HCl 1 M)) e 5 µL de 2-mercaptoethanol dentro de capela de exaustão.

A mistura foi agitada no vortex vigorosamente e então incubada a 65 °C por 1 hora. Durante a incubação a mistura foi agitada no vortex por 2 vezes. Posteriormente foram adicionados 500 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (V:V:V 25:24:1) e, em seguida, foram agitadas vigorosamente por 2 minutos até obter uma suspensão homogênea. As misturas foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

A fase aquosa, que fica na porção superior, foi transferida para outro tubo e a este foi adicionado igual volume de isopropanol. Essa mistura ficou no freezer -20 °C durante uma noite. No dia seguinte a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e observou-se a formação de um precipitado. Em seguida o sedimento foi lavado com álcool 70%. Novamente as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi colocado por 10 minutos em centrifuga a vácuo para secar e o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água estéril. O material foi mantido na geladeira por 24 horas para solubilização do DNA e então congelado (FERRER et al., 2001).

## 4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS DNAs GENÔMICOS

A quantificação do DNA genômico extraído das bactérias e das leveduras isoladas foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) para padronizar o cálculo das diluições das concentrações dos DNAs. Uma alíquota de cada um dos DNAs foi diluída para uma concentração final de 10 ng/μL para a realização de PCR com iniciadores específicos para a identificação molecular das espécies. Os DNAs genômicos concentrados e diluídos foram devidamente armazenados a -20 °C.

## 4.6 AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE 16S rRNA DE BACTÉRIAS

Com o intuito de realizar a identificação molecular das bactérias isoladas foram realizadas amplificações via PCR de uma porção do DNA ribossomal bacteriano. A porção do gene de rRNA 16S (gene 16S do RNA da pequena subunidade ribossomal) amplificado corresponde a um fragmento de aproximadamente 700 pares de base. Para essa amplificação foram utilizados os iniciadores 16S08F (GYCCADACWCCTACGG) e 16S08R (CACGAGCTGACGAC). Os iniciadores foram desenvolvidos pelo Professor Doutor Luiz Shozo Ozaki da Virginia Commonwealth University (VCU), Richmond, Virginia. Estes iniciadores foram sintetizados com sequências degeneradas (iniciadores degenerados) utilizando o código de nucleotídeos da "International Union of Pure and Applied Chemistry" IUPAC (veja: <https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html> ). Esses iniciadores anelam nas posições 274-289 e 995-980 da sequência 16S rRNA de *Escherichia coli* (gb|J01859.1) (Figura 11) e portanto permitem amplificar um fragmento do 16S rRNA contendo as regiões V2-V6 contendo a região hipervariável V4, região considerada para estudos filogenéticos (YANG; WANG; QIAN, 2016).

Figura 11 - Mapa das regiões variáveis V1-V9 da sequência 16S rRNA de *Escherichia coli* mostrando local do anelamento dos iniciadores utilizados

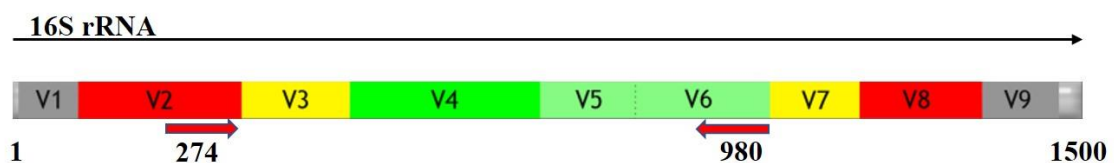


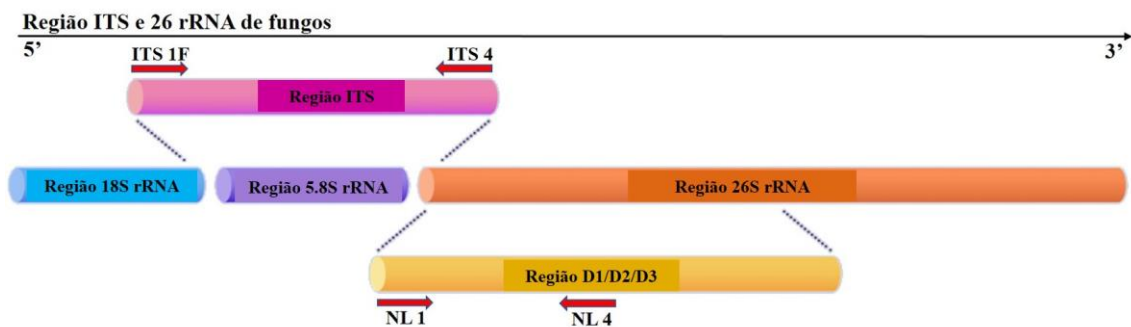
Figura adaptada de Yang et al 2016. Ilustração das diferentes regiões variáveis do 16S rRNA. Regiões vermelhas (v2 e v8) tem pouca resolução filogenética. Regiões verdes (v4, v5 e v6) podem ser a melhor escolha para análises filogenéticas (Yang et al 2016). As setas em vermelho representam a localização do anelamento dos iniciadores para amplificação da região variável neste trabalho.

As PCRs foram realizadas individualmente em um volume final de 50  $\mu$ L utilizando: 0,5  $\mu$ M de cada iniciador, 0,25 mM do MIX de dNTPs, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 unidades de Taq DNA polimerase da empresa DNA Express, 1X de tampão de reação da mesma empresa e 50 ng de cada DNA genômico bacteriano isolado. A condição de PCR empregada foi: extensão inicial de 94 °C/7 minutos; 30 ciclos de 94 °C/45 segundos, a temperatura de anelamento foi de 50°C /30 segundos, 72 °C/60 segundos; seguindo uma extensão final de 72 °C/10 minutos. Como controle positivo para as reações foi utilizado DNA cromossomal de *Escherichia coli* cepa EAEC 042 BUTANTÃ e como controle negativo foi utilizado mix da PCR sem DNA, completando o volume do mix com água.

#### 4.7 AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA D1/D2 DE 26S rRNA DE LEVEDURAS

Para realizar a identificação molecular dos isolados de leveduras foram realizadas reações de PCR com a utilização dos iniciadores: NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5' -GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (FERREIRA et al., 2010). Esses iniciadores amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pb correspondente ao domínio D1/D2 do 26S rRNA de leveduras (Figura 12) e são amplamente utilizados para essa finalidade por muitas vezes permitirem a identificação de leveduras até o nível taxonômico de espécie.

**Figura 12-** Mapa da região de genes ribossomais de leveduras mostrando os locais de anelamento dos iniciadores para amplificação da região D1/D2 de 26s rRNA e da região ITS1-ITS2 de fungos



**Figura adaptada da empresa MACROGEN (NDIKA, [s.d.]).** Ilustração das diferentes regiões do rRNA de fungos. As setas em vermelho representam a localização do anelamento dos iniciadores nas regiões ITS1 e ITS2 (iniciadores ITS 1F e ITS4), e Regiões D1/D2 ( iniciadores NL1 e NL4) utilizados neste trabalho para amplificação da região ITS e 26S rRNA de fungos.

As PCR utilizando os iniciadores NL1 e NL4 foram realizadas nas condições: 0,5  $\mu$ M de cada iniciador, 0,2 mM do MIX de dNTPs, 1X de tampão de reação (Taq Hot Master),

e duas unidades da enzima Hot Master Taq DNA polimerase da empresa 5 Prime. A condição de PCR empregada foi: extensão inicial de 94 °C/7 minutos; 30 ciclos de 94 °C/45 segundos, a temperatura de anelamento foi de 55°C /30 segundos, 72 °C/60 segundos; seguindo uma extensão final de 72 °C/10 minutos.

#### **4.8 AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA ITS1-ITS2 DO rRNA DE LEVEDURAS**

A identificação molecular dos isolados de leveduras foi realizada com o sequenciamento das regiões ITS entre 18S e 26S do rRNA. Para a amplificação do fragmento de ITS, os iniciadores foram ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (GARDES; BRUNS, 1993; MANTER; VIVANCO, 2007; WHITE et al., 1990). Esses iniciadores geram fragmentos de 400 a 850 pb (Figura 12).

As PCR utilizando os iniciadores ITS1F e ITS4 foram realizadas em um volume final de 50 µL nas condições: 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 mM do MIX de dNTPs, 1X de tampão de reação (Taq Hot Master), 1,25 unidades da enzima Hot Master Taq DNA polimerase da empresa 5 Prime e 20 ng de DNA. A condição de PCR empregada foi: extensão inicial de 94 °C/2 minutos; 35 ciclos de 94 °C/20 segundos, a temperatura de anelamento foi de 53°C /15 segundos, 65 °C/40 segundos; seguindo uma extensão final de 65 °C/3 minutos.

#### **4.9 PURIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS**

Os *amplicons* obtidos para a região 16S de bactérias e para as regiões 26S e ITS de leveduras foram purificados utilizando o *kit QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), conforme as especificações do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro do tipo NanoDrop (Thermo Scientific) e diluídas a 20 ng/µL em um volume final de 10 µL e enviadas para o sequenciamento.

Foi realizado sequenciamento pelo método de Sanger em Sequenciador de DNA ABI 3730 da Life Technologies. O sequenciamento foi realizado na Plataforma Tecnológica de Genômica da Fiocruz-Subunidade RPT01E - Sequenciamento de DNA – BH, localizada no Instituto René Rachou, Fiocruz Minas. Todas as amostras foram sequenciadas em duplicata ou triplicata, quando necessário.

## 4.10 MONTAGEM DO DATASET

As sequências consenso foram montadas utilizando de 4 a 6 *reads* no pacote PHRED-PHRAP-CONSED. Para esta montagem foram utilizados ao menos 2 *reads* com a qualidade de base PHRED acima de 30, fator que confere a acurácia de 99,9% para *base call* (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998). Ao final do processo foi gerada uma sequência consenso para cada *amplicom* dos isolados. Este procedimento foi realizado com montagens semi-automatizada das sequências consenso para as regiões 16S rRNA (regiões v3, v4, v5 e v6) de bactérias e, também, D1/D2 do 26S rRNA e ITS de leveduras.

Para isto, em ambiente Linux, foram criadas três estruturas de diretórios, 1 estrutura para cada locus analisado: (1) 16S rRNA de bactérias, (2) D1/D2 do 26S rRNA de leveduras e (3) ITS de leveduras. A partir do diretório home foram criados três diretórios *ppc\_assembly* para a execução dos projetos da seguinte forma:

```
$ cd
```

```
$ mkdir genome-assembly
```

```
$ cd genome-assembly
```

```
$ mkdir ppc_assembly
```

```
$ cd ppc_assembly
```

Posteriormente foram criados os subdiretórios para a execução do PPC da seguinte forma:

```
$ mkdir chromat_dir
```

```
$ mkdir edit_dir
```

```
$ mkdir phd_dir
```

Os arquivo contendo os eletroferogramas/cromatogramas foram inseridos no diretório *chromat\_dir*.

Para a execução do PPC foi necessário entrar no diretório “*edit\_dir*” com o seguinte comando:

```
$ cd./edit_dir
```

E para executar foi digitado o comando:

```
$ phedPhrap
```

Os alinhamentos foram visualizados com o programa Consed. Para isso o seguinte o comando foi digitado:

```
$ consed
```

No programa Consed foi selecionado e aberto utilizando duplo clique o arquivo

“*ppc\_assembly.fasta.screen.ace.1*”.

Com o programa *Consed* aberto foi observado o alinhamento dos 4 ou 6 *reads*, dependendo se o sequenciamento foi realizado em duplicata ou triplicata. As regiões que continham *reads* com nucleotídeos com qualidade de *phred* abaixo de 30 foram eliminadas.

Para isso foram observadas as cores claras na escara de cinza das bases, caracteres em caixa alta, o valor de phred que é mostrado para cada base e principalmente os picos do cromatograma, que foram abertos, para decisão de exclusão das bases.

Foram aceitas para montagem da sequência consenso regiões que apresentaram pelo menos 2 *reads* com qualidade phred acima de 30 para cada base nucleotídica. As sequências consenso contendo apenas *reads* com qualidade foram salvas uma a uma para cada isolado de bactéria e cada marcador dos isolados de leveduras (26S e ITS).

Utilizando o pacote phred-phrap-consed não foi possível realizar a montagem da sequência consenso de forma semi-automatizada para região D1/D2 do 26S rRNA da levedura 46. Logo, foi utilizada outra estratégia para a montagem da sequência consenso da região. Para a montagem da sequência consenso desses fragmentos foram realizadas análises dos 4 cromatogramas gerados pelo sequenciamento de Sanger, utilizando o software Chromas versão 2.6.5 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>). As sequências que apresentaram picos com baixa qualidade foram mascaradas (excluídas da análise) e apenas os fragmentos das sequências que apresentaram qualidade satisfatória (picos altos e únicos) foram salvas em formato fasta. Essas sequências nucleotídicas, com qualidade satisfatória, em formato fasta foram alinhadas utilizando o programa para alinhamentos MUSCLE (EDGAR, 2004) na plataforma do Software MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). A partir do alinhamento das sequências foi montada uma sequência consenso para a região amplificada. A sequência consenso para região 26S da levedura 46 foi salva em formato fasta e reunida ao dataset.

Foram realizadas edições nas sequências consenso dos amplificadas da região D1/D2 do 26S rRNA e ITS dos isolados leveduriformes, retirando regiões de anelamento dos iniciadores e nucleotídeos que apresentaram baixa qualidade nos cromatogramas.

#### **4.11 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA MOLECULAR**

As sequências consenso, em formato fasta, foram utilizadas para fazer um alinhamento global utilizando o software BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com o intuito de encontrar regiões de similaridades entre as sequências consenso geradas e regiões de sequências biológicas depositadas no banco de dados NCBI (“*National Centre for Biotechnology Information*”). Para a busca de similaridades foi utilizado o banco de dados “Reference RNA Sequence - refseq\_rna” (*NCBI Transcript Reference Sequences*) e o software BLASTN 2.7.0 (ZHANG, ZHENG; SCHWARTZ, SCOTT; WAGNER, LUKAS;



MILLER, 2000) na opção Megablast, uma opção para otimizar a busca por sequências altamente similares. O *software* BLASTN calcula a significância estatística dos resultados e pode ser usado para inferir relações funcionais e evolutivas entre sequências, bem como ajudar a identificar os membros de famílias de genes.

Os resultados dos alinhamentos realizados no programa BLASTN tiveram os valores de cobertura e identidade observados para auxiliar na escolha dos taxa mais similares. Alinhamentos com cobertura e identidade acima de 97 % foram considerados e anotados. Para busca de similaridades foram utilizados os bancos de dados: MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), BOLDSYSTEM ([http://www.barcodinglife.com/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](http://www.barcodinglife.com/index.php/IDS_OpenIdEngine)), e Polyphasic identification CBS-KNAW Collections (<http://www.westerdijkinstituut.nl/Collections/BiolomicsID.aspx?IdentScenario=Yeast2011I>). Foram utilizados os classificadores taxonômicos RDP Classifier (WANG et al., 2007) e Seqmatch RDP ([https://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](https://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)), além do SILVA *high quality ribosomal databases* (SINA 1.2.11 on line) (PRUESSE et al., 2007; QUAST et al., 2013).

#### **4.12 ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS**

As atribuições taxonômicas foram dadas a cada isolado utilizando duas abordagens distintas. Em primeiro lugar, determinando-se as identidades de todas as sequências utilizando classificadores taxonômicos descritos no item 4.12. Em segundo lugar, uma árvore filogenética foi construída contendo sequências representativas dos isolados e "sequências com as quais o isolado apresentou maior similaridade frente aos bancos de dados consultados. As árvores filogenéticas foram utilizadas para refinar a atribuição taxonômica para cada isolado, resolvendo conflitos taxonômicos encontrados nos classificadores como RDP classifier. (CHANDLER; EISEN; KOPP, 2012).

As identificações foram realizadas utilizando comparações das sequências consenso com a ferramenta Seqmatch (COLE et al., 2014) no banco de dados do RDP e RDP Classifier (WANG et al., 2007). Além disso, foi consultado o banco de dados "Reference rna sequences (refseq\_rna)" utilizando o software BLASTN 2.7.0.

A análise dessas regiões permitiu a identificação ao nível de gênero das leveduras utilizando os classificadores taxonômicos *on line* e comparações de similaridades de sequências com bancos de dados curados disponíveis na internet. Em seguida, com a

utilização da análise filogenética foi possível separar diferentes agrupamentos de sequências entre os gêneros identificados.

#### **4.13 ANÁLISES COMPLEMENTARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS**

As 60 amostras de bactérias também foram enviadas para identificação por espectrometria de massa em MALDI-TOF. Adicionalmente, as amostras de bactérias foram enviadas para identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF. VITEK MS-bioMerieux) no LABORATÓRIO MÉDICO SANTA LUZIA S/A, Florianópolis - SC – Brasil ([www.sluzia.com.br](http://www.sluzia.com.br)).

As bactérias 2, 28, 33, e 36 (candidatas ao gênero *Pantoea*) foram identificadas utilizando 64 testes bioquímicos automatizados em equipamento VITEK®2 Systems no LACEN em Porto Velho, Rondônia e no Laboratório Santa Luzia em Florianópolis, Santa Catarina.

Adicionalmente as bactérias 13, 14, 15, 33, 36, 39, 41, 52, 59 e 60 foram identificadas com kit comercial BBL Crystal pela equipe da “Coleção de Bactérias da Amazônia – CBAM” (inserida na Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane, CBILMD).

#### **4.14 ATRIBUIÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS**

Assim como para bactérias, as atribuições taxonômicas foram dadas a cada isolado de levedura utilizando duas abordagens que se complementaram. Em primeiro lugar, determinando a identificação taxonômica de todas as sequências utilizando classificadores taxonômicos descritos no item 4.12. Porém, para leveduras, foram utilizados 2 marcadores moleculares 26S e ITS. Em segundo lugar, duas árvores filogenéticas foram construídas contendo sequências representativas de cada marcador genético de todos grupos e seus taxa mais próximos. As árvores filogenéticas foram comparadas entre si e utilizadas para refinar a atribuição taxonômica de cada isolado de levedura, a fim de resolver os conflitos inter-taxonômicos observados conforme descrito na literatura (CHANDLER; EISEN; KOPP, 2012).

As identificações foram realizadas utilizando comparações das sequências consenso com bancos de dados: Seqmach RDP (COLE et al., 2014), banco de dados “Reference na

sequences (refseq\_rna)” do software BLASTN 2.7.0 (ZHANG, ZHENG; SCHWARTZ, SCOTT; WAGNER, LUKAS; MILLER, 2000), MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), **BOLDSYSTEMS** para ITS ([http://www.barcodinglife.com/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](http://www.barcodinglife.com/index.php/IDS_OpenIdEngine)). O RDP classifier foi utilizado, porém a classificação encontrada foi até nível taxonômico gênero, não diferenciando espécies.

#### 4.15 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Análises filogenéticas foram realizadas para refinar a atribuição taxonômica de cada grupo utilizando o Software Mega 7.

Para resolver os conflitos inter-taxonômicos foram construídas árvores filogenéticas usando o método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) utilizando bootstrap de 1000 repetições.

Foi realizado teste do modelo de substituição dos nucleotídeos para escolher o melhor modelo para cada um dos dataset das regiões 16S rRNA de bactéria, ITS e 26S de leveduras respectivamente. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura 2-parâmetros e estão baseadas no número de substituições de bases por sítio (KIMURA, 1980). O método Kimura 2-parâmetros foi o que apresentou o menor BIC score (Bayesian Information Criterion) no teste do modelo para os três datasets analisados, logo, foi o modelo mais adequado.

Para a região 16S rRNA de bactéria, a análise filogenética envolveu 67 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que continham lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 453 posições no conjunto de dados final. O resultado foi uma única árvore filogenética, na qual estão apresentados todos os isolados bacterianos agrupados com os grupos filogenéticos relacionados. Diversas árvores foram construídas para chegar a árvore mais representativa do conjunto de bactérias que foram isoladas a partir das fezes de *An. darlingi*. As análises filogenéticas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Para leveduras foram construídas 2 árvores filogenéticas, 1 para região ITS e 1 para região 26S. Cada árvore contemplou todos os indivíduos isolados e amplificados.

Para a região ITS a árvore filogenética foi inferida usando o método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) com distâncias evolutivas calculadas usando o método Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) e estão baseadas no número de substituições de bases por sítio. A análise envolveu 40 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que continham lacunas

e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 279 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no software MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Para a região 26S a árvore filogenética foi inferida usando o método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) e estão baseadas no número de substituições de bases por sítio. Para esta análise foram utilizadas 37 sequências de nucleotídeos. Todas as posições contendo *gaps* e dados faltantes foram eliminadas. Existiram 211 posições no final do dataset. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

#### **4.16 ESTIMATIVA DE RIQUEZA E FREQUÊNCIA DAS ESPÉCIES**

Bactérias e leveduras foram analisadas separadamente. A riqueza de espécies foi descrita pelo número total de espécies (entidades taxonômicas) determinadas.

As sequências foram depositadas no GenBank. Além disso, foram construídas curvas de rarefação não-Paramétricas. As curvas foram construídas utilizando o estimador Chao 2, que considera a frequência com a qual as espécies foram amostradas e estima um número máximo de espécies esperado para um dado esforço amostral. Todas as curvas de rarefação foram construídas utilizando o programa *EstimateS*®, versão 7.5.2 Windows (COLWELL, 2005).

A frequência das espécies foi dada pelo número de vezes que a espécie foi registrada no total de colônias amostradas, posteriormente, as espécies foram ordenadas em função da frequência (SANTOS, 2003).

#### **4.17 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS CANDIDATOS À PARATRANSGENESE**

Foram estabelecidos 2 critérios para a seleção dos microrganismos candidatos à paratransgênese, os quais foram elaborados a partir das publicações de Wang e Jacobs-Lorena (2013) e Wilke e Marelli (2015), no que se refere à seleção dos microrganismos, com adaptações para a disponibilidade de tempo para a execução deste trabalho e estrutura disponível no local das análises. Os critérios foram:

- 1) Identificação de bactérias e leveduras que não sejam patogênicas a humanos e animais;

2) Microrganismo que possa ser cultivado *in vitro* e manipulado geneticamente.

Para a seleção dos candidatos à paratransgênese os microrganismos isolados foram caracterizados quanto a patogenicidade, perfil de resistência a antimicrobianos e à ecologia da espécie. As investigações foram realizadas em artigos científicos e manuais de referência tanto para bactérias como para leveduras.

#### **4.18 SELEÇÃO DOS VETORES PARA MANIPULAÇÃO GENÉTICA DOS CANDIDATOS À PARATRANSGÊNESE**

Foram realizados ensaios para a escolha do vetor contendo gene repórter e protocolo de transformação bacteriana. Foi realizado um ensaio de transformação bacteriana por eletroporação, na qual as células se tornaram competentes através de lavagens com sacarose 300 mM (adaptado de CHOI et al., 2006). As bactérias isoladas precisam tornar-se electrocompetentes para estarem aptas a receber DNA exógeno. Para este ensaio foi utilizado *E. coli*, cepa TG1 como controle e 10 ng de DNA plasmidial pUC19. A eficiência de transformação foi avaliada pela fórmula: Eficiência = (Nº de colônias/mL)/(quantidade em µg de DNA). Foram obtidas aproximadamente  $1 \times 10^6$  colônias bacterianas em 1 mL de meio LB. Além disso, foi selecionado um vetor de expressão protéica contendo o gene repórter RFP (Figura 13), escolhemos novamente o protocolo de preparo de células competentes que utiliza lavagens das células com solução de sacarose 300 mM e centrifugações, seguido de transformação por eletroporação (CHOI; KUMAR; SCHWEIZER, 2006).

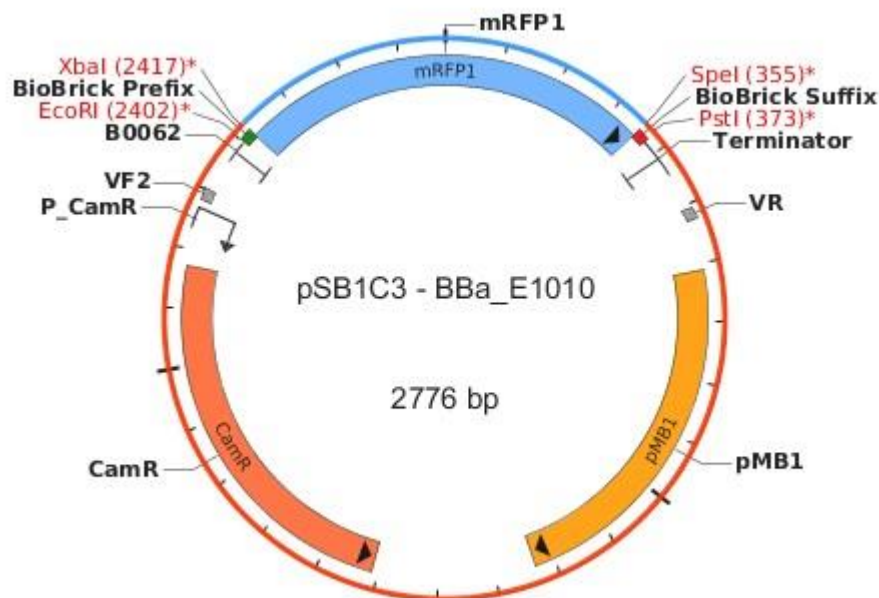
Uma bactéria foi selecionada como potencial candidata à paratransgênese e esta será submetida à transformação genética com um vetor contendo um gene repórter para verificar sua capacidade em ser transformada geneticamente. Para isto, inicialmente foi testado em *Escherichia coli* o protocolo de eletroporação rápida, adaptado a partir de Choi et al (2006) que foi descrito originalmente para *Pseudomonas aeruginosa* (CHOI; KUMAR; SCHWEIZER, 2006).

A cepa de *E. coli*, TG1, foi cultivada por 16 horas em 6 mL de meio LB. O cultivo foi igualmente distribuído em 4 tubos do tipo eppendorfs. Os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente por 2 minutos a  $16.000 \times g$ . O sedimentado de cada tubo foi lavado com 1 mL de sacarose 300 mM, e foram centrifugados novamente nas mesmas condições. Procedeu-se com mais uma lavagem seguida de mais uma centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado dos quatro tubos foi ressuspensionado

e reunido em um volume final de 100  $\mu\text{L}$  de sacarose 300 mM. Para eletroporação foram utilizados 10 ng de DNA plasmidial pUC19. O DNA plasmidial foi misturado aos 100  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes e transferido para a cubeta de eletroporação de 0,2 mm. Após a eletroporação foram adicionados 900  $\mu\text{L}$  de meio LB à mistura. A mistura foi levada ao shaker a 37 °C com rotação de 250 rpm. Desse cultivo foram plaqueados 100  $\mu\text{L}$  em placas de Petri contendo LB ágar com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina, marca de resistência do vetor pUC19. As placas de Petri foram levadas a estufa por 16 horas e as colônias que cresceram foram contadas para cálculo de eficiência da transformação utilizando a fórmula: Eficiência = (N° de colônias/mL)/(quantidade em  $\mu\text{g}$  de DNA).

Esse protocolo foi também utilizado para transformar em *E. coli* o vetor pSB1C-BBa\_E1010 (Figura 13), que contém o gene RFP1. Este vetor foi cedido pelo Professor Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva do Departamento de Biologia da UFAM. Este gene quando expresso confere ao organismo transformado uma coloração vermelha perceptível a olho nu. Este vetor contendo o gene RFP1 foi escolhido por propiciar um fenótipo de fácil detecção.

Figura13- Mapa do vetor pSB1C3 – Bba\_E1010 que contém gene repórter RFP



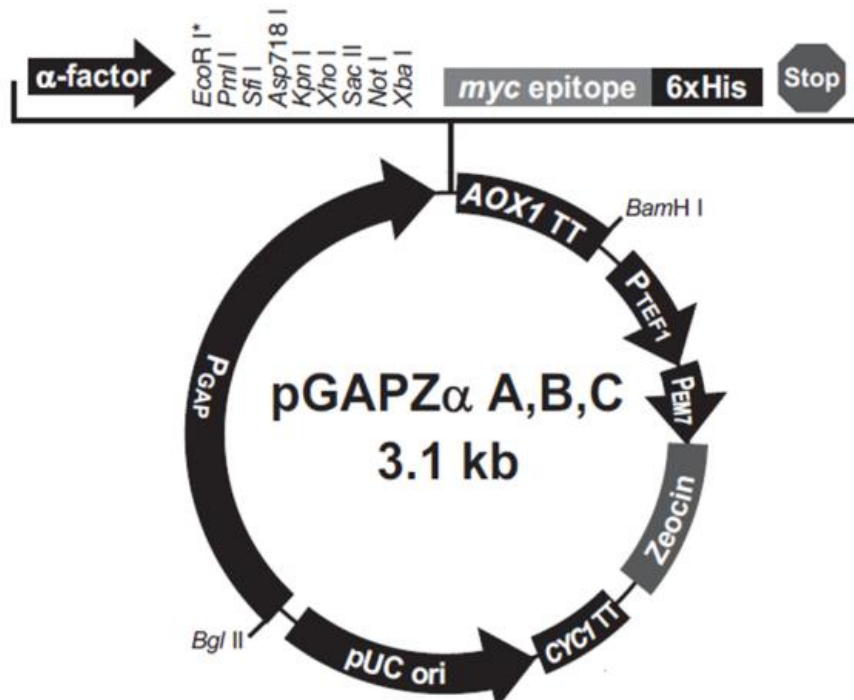
O vetor pSB1C-BBa\_E1010 é um vetor para expressão em procariotos. Foi portanto, necessário inserir o gene repórter RFP1 em um vetor para expressão em leveduras. Para isto, foram desenhados, a partir a sequência do vetor, iniciadores que anelam nas extremidades do gene. Os iniciadores para a amplificação dos genes repórteres foram desenhados por análise de complementaridade dos fragmentos do DNA molde com a adição de um sítio de restrição

para a enzima *EcoRI* na extremidade 5' do iniciador senso, e com a adição de um sítio de restrição para a enzima *NotI*, na extremidade 5' do iniciador anti-senso. A inserção das Enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* aos flancos foi realizada para facilitar a clonagem direcional. pRFP F- *EcoRI*- 5' agaattcATGGCTTCCTCCGAAGACGTTAT 3' e pRFP R- *NotI*- 5' atatctagcggccgcGCGTTA TTAAGCACCGGTGGA 3'.

Foi obtido um *amplicon* de aproximadamente 0,7 Kb. O *amplicon* foi purificado do gel e digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. A digestão foi purificada e em seguida realizada a ligação no vetor pGAPZ $\alpha$ B (Figura 14) previamente digerido e purificado com as mesmas enzimas.

Como arcabouço para o vetor para a expressão em leveduras foi utilizado o pGAPZ $\alpha$ B (Invitrogen) (Figura 14). Esse vetor contém o promotor da enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que é um promotor forte e constitutivo. O pGAPZ $\alpha$ B é um vetor do tipo *shuttle vector* que contém origem de replicação para *E. coli* e sequência para integração por recombinação homóloga na levedura.

Figura 14- Mapa do vetor pGAPZ $\alpha$ B



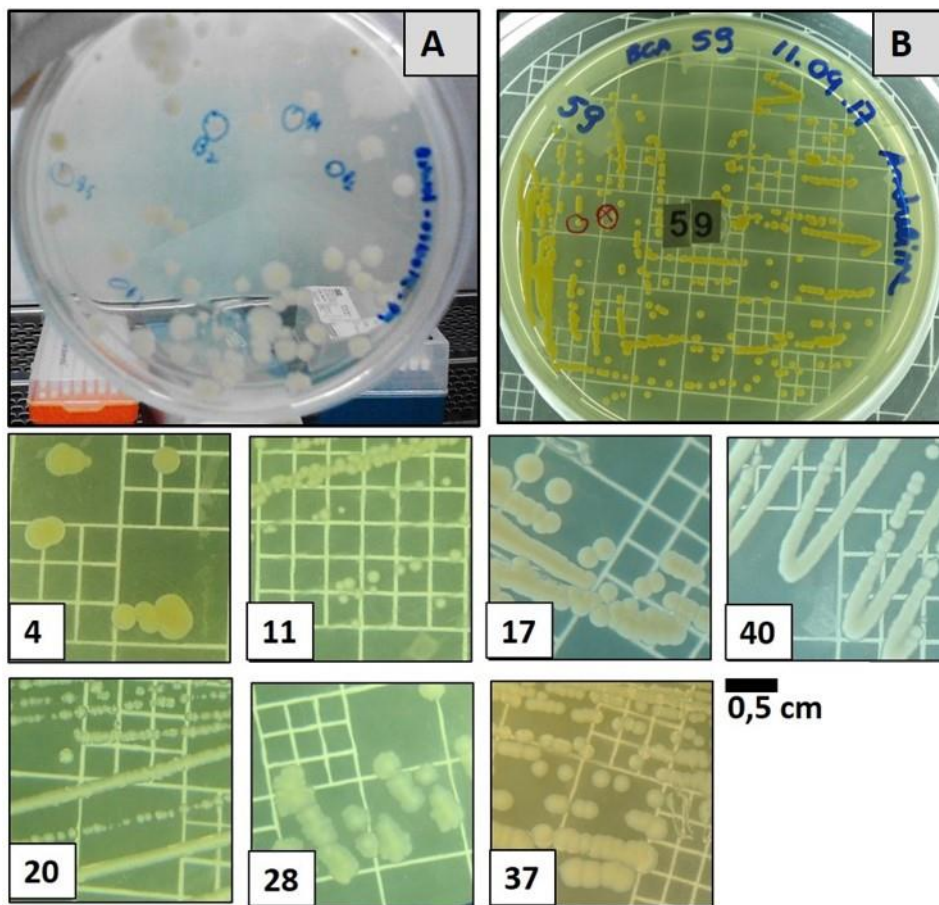
O vetor construído foi transformado em *E. coli* Top10 F' para amplificação do novo plasmídeo que foi nomeado pGAPZ $\alpha$ \_RFP1. O vetor está pronto para os ensaios de transformação no organismo modelo *Pichia pastoris* e posteriormente será transformado em uma levedura candidada à paratransgênese proposta nesse trabalho.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRESENTES NAS FEZES DE *Anopheles darlingi*

No presente estudo foram amostradas 60 colônias bacterianas em cultura pura a partir das fezes de fêmeas de mosquito *An. darlingi* selvagens (Figura 15).

Figura 15 – Amostras de bactérias isoladas a partir das fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* de campo e colônias puras obtidas com o método de estriamento em placa de Petri



A: Amostras de bactérias que cresceram a partir das fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* selvagens após 24 horas de cultivo em meio LB ágar a 37°C. B: Amostra de 1 isolado bacteriano. Os números correspondem a colônias das bactérias: 4. *Enterobacter cloacae*, 11. *Acinetobacter baumannii* 17. *Staphylococcus warneri*, 40. *Klebsiella pneumoniae* 20. *Cedecea* sp, 28. *Pantoea* sp e 37. *Serratia marcescens*.

O isolamento de microrganismos a partir de fezes de animais para análises microbiológicas é um estudo amplamente realizado e diversas técnicas têm sido aplicadas tanto para a coleta de fezes, quanto para o isolamento de microrganismos nelas contidas. Tal investigação microbiológica pode ser realizada para diversas finalidades como a identificação de patógenos ou interesses biotecnológicos. Isolamentos de microrganismos fecais são



realizados tanto para animais selvagens, como elefantes e gambás, (CHEN et al., 2016; GÜLLERT et al., 2016; TOBIAS et al., 2016) quanto para animais domesticados com importância na agropecuária, como cavalos (JULLIAND; GRIMM, 2016) e porcos (HEINRITZ et al., 2016; WHITEHEAD; COTTA, 2016). Além de investigações com interesse clínico em humanos (ANVISA, 2004; LI et al., 2016).

Porém, quando tratamos de animais pequenos como insetos, mais especificamente mosquitos, existe uma carência de estudos utilizando metodologias para realizar a coleta de microrganismos contidos em suas fezes. Apesar de fezes de mosquitos não receberam muita atenção, fezes de *Aedes* infectados com o vírus da febre amarela foram coletadas e analisadas por Aragão e Costa Lima (1929). Esses autores coletaram em laboratório fezes de *Aedes* contaminados com o vírus da febre amarela. A coleta das fezes foi realizada em uma gaiola na qual os autores buscaram visualmente marcas das fezes do mosquito logo após a defecação e lavaram cada marca com líquido utilizando uma seringa. O homogenato foi utilizado para infectar *Macacus rhesus* através da conjutiva ocular e pele. Através desse experimento, eles identificaram a possibilidade de infecção por febre amarela através de fezes de mosquitos, pois nessas foram detectados vírus ativos da doença.

A metodologia de lavagem de marcas das fezes do mosquito, descrita por Aragão e Costa Lima (1929), foi previamente testada no presente trabalho, mas resultou na recuperação de apenas 2 morfotipos de colônias, independentemente do número de repetições do experimento (dados não mostrados). Portanto, a metodologia utilizada por Aragão e Costa Lima (1929) não foi adequada para este trabalho que visou a recuperação de diversidade de bactérias e leveduras. A metodologia de coleta de fezes de *Ae. aegypti* de Aragão e Costa Lima (1929) foi utilizada por Bush e colaboradores (2012) porém, não com finalidade microbiológica (BUSH; WYSOCKI; SCARAFFIA, 2012).

Outra técnica para detecção de microrganismos a partir de fezes de mosquito foi realizada por Pilotte e colaboradores (2016). Para a coleta de fezes do mosquito *An. stephensi*, os autores utilizaram papel filtro e fizeram extração de DNA das amostras do conteúdo fecal contido no papel. A detecção molecular de *Brugia malaya* e *Plasmodium vivax* foi realizada por PCR. Porém, não realizaram o isolamento dos microrganismos. O autor sugere que amostragens de excreta/fezes de mosquitos pode ser uma estratégia atraente para o monitoramento de vários patógenos transmitidos por insetos (PILOTTE et al., 2016). Com metodologia similar, a partir de fezes coletadas em papel cartão, o DNA de *Rickettsia felis*, uma bactéria intracelular obrigatória, foi detectado por qPCR em fezes de *An. gambiae* até 14 dias após a infecção em laboratório por esta bactéria (DIEME et al., 2015).

Os estudos citados acima utilizaram fezes de mosquitos, contudo nenhum objetivou o isolamento e cultivo de bactérias ou leveduras. Para tal finalidade foi desenvolvida neste trabalho uma nova técnica de coleta de microrganismos contido nas fezes dos mosquitos com o objetivo de, potencialmente, coletar uma maior diversidade de bactérias e leveduras contidas nas fezes de mosquitos. E, uma vez que o conteúdo fecal passa pelo trato digestório, podemos hipotetizar que os microrganismos contidos nas fezes estiveram no trato digestório e refletem a diversidade da microbiota associada ao trato digestório desses insetos, ao menos em parte.

Neste sentido, a alimentação oferecida às fêmeas dos mosquitos *An. darlingi* que participaram do experimento foi sacarose 10%, alimento menos rico em nutrientes quando comparado à alimentação sanguínea. Pois é relatado na literatura que a alimentação sanguínea favorece a multiplicação de algumas famílias de bactérias, como gram-negativas e Enterobacteriaceae (WANG et al., 2012; ZAYED; BREM, 2004), fato que poderia inibir a ocorrência de outras espécies de bactérias pela competição por condições e recursos, por exemplo, espaço. E, no presente trabalho, o interesse foi descobrir a riqueza de espécies de bactérias que ocorre nas fezes de *An. darlingi*, quando estas fezes são coletadas em meio LB ágar e cultivadas a 37°C. No futuro, em outra fase da pesquisa, é possível analisar quais bactérias ocorrem nas fezes de *An. darlingi* após alimentação sanguínea.

Ademais, o método foi pensado para minimizar as manipulações e o tempo de processamento das amostras. Ao se reduzir o tempo de manipulação do inseto, também se reduz a chance de ocorrer contaminações externas. Para a execução do método foi desenvolvida uma gaiola específica (ARRUDA et al., 2017).

A investigação convencional para conhecer a microbiota intestinal de mosquitos tem sido realizada de duas formas: Uma delas é independente de cultura, isto é, sem o cultivo do microrganismo. Neste caso, estão as identificações moleculares por metagenômica. A outra é o método dependente de cultura, com o isolamento e cultivo de microrganismos em meios de cultura. No método dependente de cultura é realizada a dissecação do sistema digestório (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994) seguido de espalhamento em meios de cultura diversos para obtenção de colônias isoladas.

As desvantagens desses métodos é que o método independente de cultura identifica, mas não possibilita o isolamento dos microrganismos. Para executar o método que utiliza a dissecação do sistema digestório, são necessárias pessoas treinadas para a tarefa, com habilidades e conhecimento da anatomia de mosquitos, além do dispendioso tempo para retirar um a um os intestinos a serem avaliados. Straif e colaboradores (1998), por exemplo,

dissecaram 2.430 intestinos de *Anopheles* para investigar a diversidade de bactérias contidas no intestino dos mosquitos analisados (STRAIF et al., 1998). Além disso, durante a reutilização de utensílios para a extração e manipulação do intestino do mosquito, há o risco de contaminações indesejadas provocadas pelo método ou pelo pesquisador, possibilidade que não pode ser ignorada.

O método para coleta de microrganismos (bactérias e leveduras) contidos nas fezes de mosquito, utilizado neste trabalho, teve a acumulação de cinco mosquitos/gaiola e visou otimizar o recurso financeiro e tempo investidos na obtenção de colônias puras. Além disso, considera-se que tal otimização incrementa os resultados de diversidade obtidos, ao invés de limitar. Pois, cada inseto deve ser observado como um habitat colonizado por microrganismos. Dessa forma, ao se acumular insetos na gaiola, aumenta-se a área de amostragem e a diversidade registrada com o menor investimento de tempo e dinheiro. Isto é, o delineamento desenvolvido visou obter a maior biodiversidade com o menor esforço, seguindo o proposto por Santos (2003) (SANTOS, 2003).

O meio de cultura LB tem sido reportado por diversos autores para a recuperação de bactérias a partir de intestino de *Anopheles* (CHEN; BLOM; WALKER, 2017; RANI et al., 2009; VALIENTE MORO et al., 2013). Valiente-Moro e colaboradores (2013), investigando bactérias de *Aedes albopictus* selvagens, compararam a diversidade de bactérias recuperadas em três diferentes meios de cultura. A escolha do meio de cultura para a recuperação de microrganismos foi importante. Segundo os autores, o procedimento de isolamento usando meio LB permitiu o registro de maior riqueza de bactérias (VALIENTE MORO et al., 2013).

## **5.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES NAS FEZES DE *Anopheles darlingi***

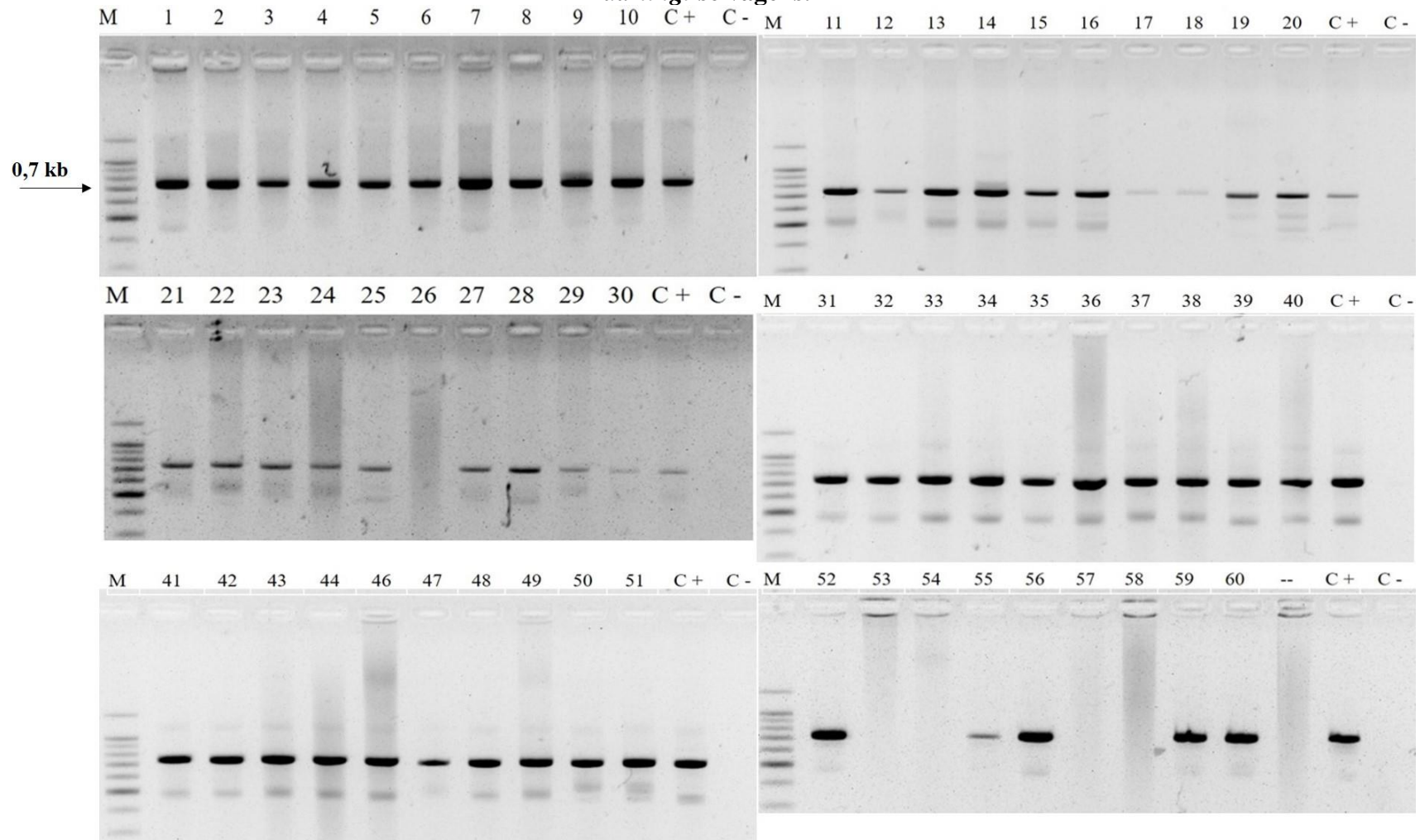
No presente estudo, a partir de 60 colônias bacterianas, todos os isolados foram identificados. Esses apresentaram-se distribuídos em 8 gêneros de bactérias: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Cedecea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia* e *Staphylococcus*. Destaca-se 2 filos: Firmicute e Proteobactéria e 4 famílias: Enterobacteriaceae (36), Staphylococcaceae (10), Moraxellaceae (7) e Burkholderiaceae (2). A família Enterobacteriaceae foi a mais frequente, assim como no trabalho de Boissière e colaboradores (2012) que detectaram maior frequência de bactérias Enterobacteriaceae em *An. gambiae* infectado por *P. falciparum* (BOISSIÈRE et al., 2012).

Das 60 reações de PCR realizadas para amplificação da região parcial do 16S rRNA, 54 amplificaram no tamanho esperado, aproximadamente 700 pb (Figura 16). As bactérias 28, 33, 36 foram identificadas apenas utilizando MALDI-TOF. Das 60 bactérias enviadas para identificação complementar utilizando MALDI-TOF, 47 isolados foram identificados ao nível de espécie, 2 isolados identificados ao nível de gênero (25 e 39), três não foram identificados (amostras 11, 27 e 28) e 4 amostras não cresceram no novo repique (amostras 1, 7, 8 e 9), impossibilitando a análise. As bactérias 2 (93% LACEN PVH), 28 (96% LSL E 98% LACEN PVH), 33 (98% LACEN PVH) e 36 (98% LSL) foram identificadas como *Pantoea* sp, conforme resultado de 64 testes bioquímicos automatizados em equipamento VITEK<sup>®</sup>2 (Tabela 4).

Bactérias 26, 45, 54, 57 e 58 não amplificaram 16S rRNA, mas cresceram tanto em meio LB ágar, quanto em meio ágar nutriente e estão preservadas na bacterioteca e no freezer -80 °C do Laboratório de Microbiologia da Fiocruz Rondônia. As bactérias 5 e 19 não cresceram em meio ágar nutriente, apenas em meio LB ágar. Não estão na bacterioteca, mas estão mantidas no freezer -80 °C do Laboratório de Microbiologia da Fiocruz Rondônia.

Foram depositadas no GenBank 48 sequências (Tabela 4). Estas sequências apresentaram similaridades superiores a 98% quando comparadas com sequências depositadas nos bancos de dados utilizados. Além disso, apresentaram agrupamento filogenético consistente com *bootstrap* acima de 95% quando 1000 aleatorizações foram realizadas (Figura 17).

**Figura 16 – Amplificado da região 16S rRNA das bactérias de 1 a 60 que foram isoladas a partir das fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* selvagens.**



**Gel de agarose 1,5%. (M) Marcador 100 pb da Promega. (C+) Controle positivo EAEC 042 UNIFESP. (C-) Controle negativo – Mix de PCR sem DNA**

**Tabela 4 - Bactérias identificadas utilizando sequência 16S rRNA parcial. As bactérias foram isoladas a partir das fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* selvagens oriundos de Porto Velho, RO, Brasil.**

Filo/ Classe/ Família	Amostra n°	Espécie identificada	Acesso da sequência 16SrRNA no GenBank	% Similaridade (refseq_rna BLASTn)	Código de acesso do táxon mais relacionado
<b>FIRMICUTES</b>					
<b>Bacilli</b>					
Staphylococcaceae	56	* <i>Staphylococcus arlettae</i>	MF685292	100	AB009933.1
	59	<i>Staphylococcus arlettae</i>	MF685293	100	AB009933.1
	60	<i>Staphylococcus kloosii</i>	MF685294	100	AB009940.1
	34	<i>Staphylococcus sciuri</i>	MF685274	100	AJ421446.1
	35	<i>Staphylococcus sciuri</i>	MF685275	100	AJ421446.1
	51	<i>Staphylococcus sciuri</i>	MF685289	100	AJ421446.1
	52	<i>Staphylococcus sciuri</i>	MF685290	100	AJ421446.1
	17	<i>Staphylococcus warneri</i>	MF685261	100	L37603.1
	18	<i>Staphylococcus warneri</i>	MF685262	100	L37603.1
	50	<i>Staphylococcus warneri</i>	MF685288	100	L37603.1
<b>PROTEOBACTERIA</b>					
<b>Betaproteobacteria</b>					
Burkholderiaceae	5	<i>Burkholderia cepacia</i>	MF685251	100	AB114607.1
	19	<i>Burkholderia cepacia</i>	MF685263	100	AB114607.1
<b>Gammaproteobacteria</b>					
Enterobacteriaceae	20	<i>Cedecea</i> sp	MF685264	100	KC201361.1
	25	<i>Cedecea</i> sp	MF685269	100	KC201361.1
	39	<i>Cedecea</i> sp	MF685278	100	KC201361.1
	3	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	MF685249	99	AY787819.1
	4	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	MF685250	99	AY787819.1

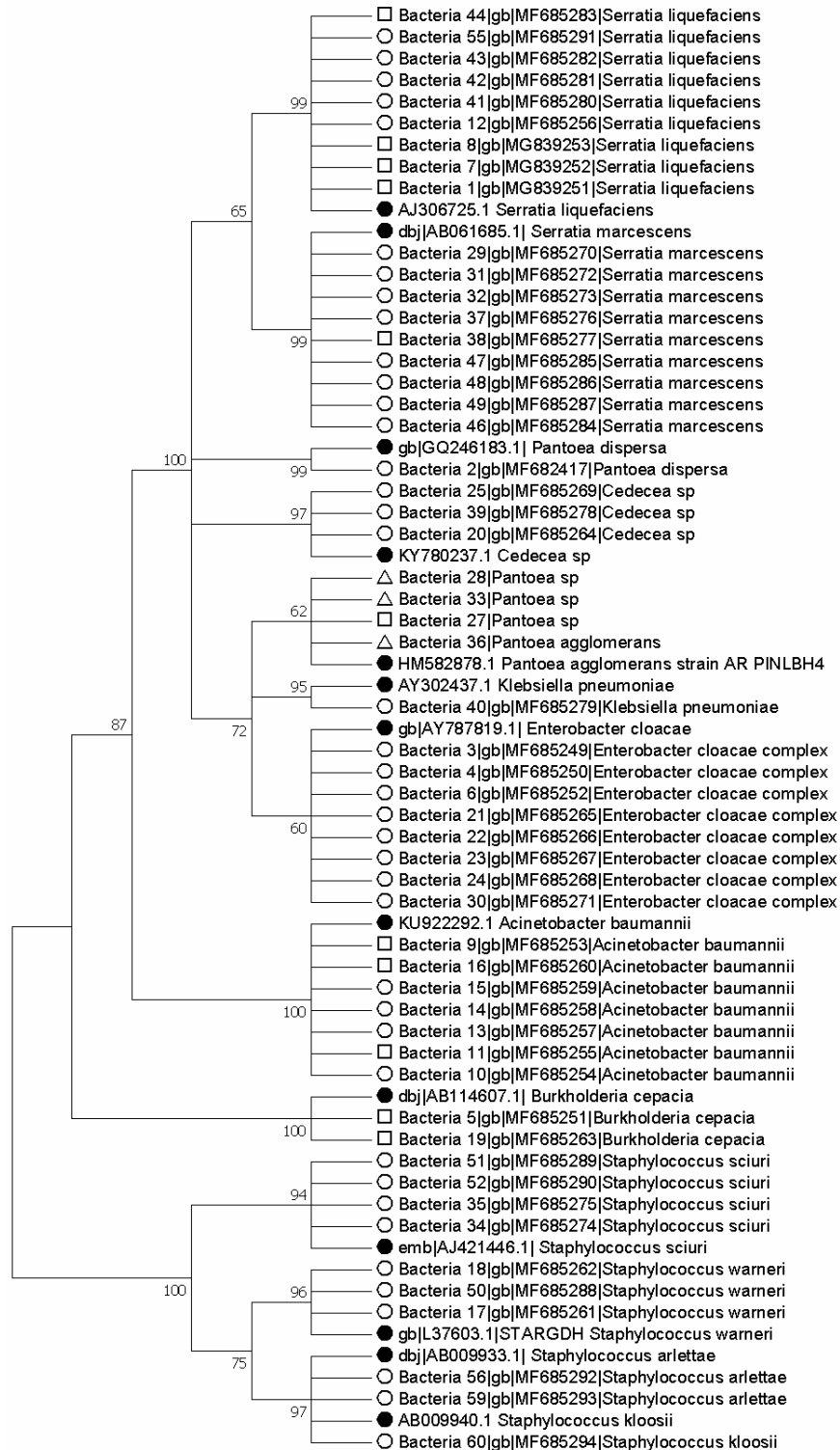
6	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	MF685252	100	AY787819.1
21	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	MF685265	100	AY787819.1
22	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	MF685266	100	AY787819.1
23	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	MF685267	100	AY787819.1
24	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	MF685268	100	AY787819.1
30	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	MF685271	100	AY787819.1
57	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (MALDI-TOF)	n/a	n/a	n/a
58	<i>Enterobacter cloacae</i> complex (MALDI-TOF)	n/a	n/a	n/a
40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MF685279	100	AY302437.1
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (MALDI-TOF)	n/a	n/a	n/a
36	<i>Pantoea agglomerans</i> (Cristal BD)	n/a	100	HM582878.1
2	<i>Pantoea dispersa</i>	MF682417	99	GQ246183.1
27	<i>Pantoea</i> sp		100	HM582878.1
28	<i>Pantoea</i> sp (VITEK®2)	n/a	100	HM582878.1
33	<i>Pantoea</i> sp (VITEK®2)	n/a	100	HM582878.1
1	<i>Serratia liquefaciens</i>	MG839251	98	AJ306725.1
41	<i>Serratia liquefaciens</i>	MF685280	100	AJ306725.1
42	<i>Serratia liquefaciens</i>	MF685281	100	AJ306725.1
43	<i>Serratia liquefaciens</i>	MF685282	100	AJ306725.1
12	<i>Serratia liquefaciens</i>	MF685256	100	AJ306725.1
55	<i>Serratia liquefaciens</i>	MF685291	100	AJ306725.1
53	<i>Serratia liquefaciens</i> (MALDI-TOF)	n/a	n/a	n/a
54	<i>Serratia liquefaciens</i> (MALDI-TOF)	n/a	n/a	n/a
45	<i>Serratia liquefaciens</i> (MALDI-TOF)	n/a	n/a	n/a
7	<i>Serratia liquefaciens</i>	MG839252	98	AJ306725.1
8	<i>Serratia liquefaciens</i>	MG839253	98	AJ306725.1

	44	<i>Serratia liquefaciens</i>	MF685283	100	AJ306725.1
	29	<i>Serratia marcescens</i>	MF685270	100	AB061685.1
	31	<i>Serratia marcescens</i>	MF685272	100	AB061685.1
	32	<i>Serratia marcescens</i>	MF685273	100	AB061685.1
	37	<i>Serratia marcescens</i>	MF685276	100	AB061685.1
	38	<i>Serratia marcescens</i>	MF685277	100	AB061685.1
	46	<i>Serratia marcescens</i>	MF685284	100	AB061685.1
	47	<i>Serratia marcescens</i>	MF685285	100	AB061685.1
	48	<i>Serratia marcescens</i>	MF685286	100	AB061685.1
	49	<i>Serratia marcescens</i>	MF685287	100	AB061685.1
Moraxellaceae	13	<i>Acinetobacter baumannii</i> (MALDI-TOF)	MF685257	100	KU922292.1
	14	<i>Acinetobacter baumannii</i> (MALDI-TOF)	MF685258	100	KU922292.1
	15	<i>Acinetobacter baumannii</i> (MALDI-TOF)	MF685259	100	KU922292.1
	10	<i>Acinetobacter baumannii</i> (MALDI-TOF)	MF685254	100	KU922292.1
	16	<i>Acinetobacter baumannii</i>	MF685260	100	KU922292.1
	9	<i>Acinetobacter baumannii</i>	MF685253	100	KU922292.1
	11	<i>Acinetobacter baumannii</i>	MF685255	100	KU922292.1

n/a: não se aplica, MALDI-TOF VITEK® MS (bioMerieux), VITEK®2 (bioMerieux), BD BBL™ Crystal™ identification system. Data Base refseq\_rna, NCBI Transcript Reference Sequences, Program BLASTN 2.7.0 (ZHANG et al., 2000). E value 0.0 para todas similaridades. \**Staphylococcus* é Gram-positivo, outros isolados são Gram-negativos.



Figura 17 – Árvore filogenética dos taxa das bactérias isoladas a partir de fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* e identificadas utilizando sequência 16S rRNA parcial.



Os números sobre os ramos da árvore indicam o valor de *bootstrap* encontrados a partir de 1000 repetições. Para esta análise foram utilizadas 67 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo *gaps* e dados faltantes foram eliminadas. Existiram 453 posições no final do dataset. Realizado no Software Mega 7.0.14. ● Referência no GenBank; ○ Bactérias identificadas com 16SrRNA e MALDI-TOF; △ Bactérias identificadas com 16SrRNA e bioquimicamente (VITEK 2); □ Bactérias identificadas apenas com 16SrRNA.



Para *An. darlingi*, o principal vetor da malária na Amazônia, até o momento, há apenas três publicações que mencionam a identificação de bactérias associadas ao mosquito.

Terenius e colaboradores (2008) relataram bactérias associadas a 3 gêneros: *Aeromonas*, *Pantoea* e *Pseudomonas*. Nesta abordagem molecular, sem o isolamento dos microrganismos, os autores utilizaram amplificação por PCR com iniciadores para região 16S de rRNA com DNA total de 8 mosquitos selvagens individuais inteiros, que foram alimentados com sangue. Os gêneros de bactérias apresentados por Terenius e colaboradores (2008) também foram identificados a partir de outros *Anopheles* de campo, tais como *An. gambiae* e *An. stephensi* (CHAVSHIN et al., 2012; DJADID et al., 2011; OSEI-POKU et al., 2012; STRAIF et al., 1998), além disso, *Pantoea* foi identificada nas fezes de *An. darlingi* no presente trabalho.

Na publicação de Marinotti et al (2013), do genoma de *An. darlingi*, os autores mencionam a presença (como contaminação ou associado) de *reads* e genes de bactéria. A detecção de *Aeromonas hydrophila* foi tratada como contaminante pelos autores (MARINOTTI et al., 2013). E por fim, dados preliminares deste trabalho foram publicados relatando a identificação 5 gêneros de bactérias que foram isolados a partir de fezes de *An. darlingi*: *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* (ARRUDA et al., 2017).

Levando em consideração a bibliografia publicada sobre o isolamento de bactérias associadas a *An. darlingi*, os gêneros bacterianos encontrados neste trabalho serão relacionados com gêneros de bactérias associados a outras espécies de *Anopheles*. A título de comparação, serão considerados apenas bactérias isoladas de *Anopheles* selvagens, pois espera-se que a diversidade de microrganismos associados a mosquitos selvagens seja maior do que a diversidade de microrganismos encontrada em mosquitos de laboratório. Mosquitos selvagens são habitados por microrganismos presentes em seu ambiente natural. Diversos autores demonstram a diferença da diversidade de microrganismos contidos em mosquitos de campo e laboratório (BOISSIÈRE et al., 2012; WANG et al., 2011). Rani et al (2009), por exemplo, demonstraram que a diversidade bacteriana da microflora do intestino médio de *An. stephensi* criado em laboratório foi menor do que a encontrada em mosquitos de campo, tanto para machos (15 versus 27 taxa bacterianos) quanto para fêmeas (7 versus 36 taxa bacterianos) (RANI et al., 2009).

Também foram consideradas, tanto a identificação de microrganismos isolados, portanto cultiváveis, quanto a identificação molecular, sem o isolamento. No entanto, é importante enfatizar que microrganismos a serem candidatos a paratransgênese devem ser

passíveis de fácil cultivo em laboratório. Muitos microrganismos são identificados molecularmente, porém, não são isolados (PIDIYAR et al., 2004), talvez por serem mais seletivos/exigentes nutricionalmente e precisarem de condições ambientais semelhantes ao de seu habitat original (intestino do mosquito) para se desenvolver, não sendo eletivos para a aplicação em paratransgênese. Alguns autores fizeram a comparação entre a identificação de bactérias da microbiota intestinal de mosquitos utilizando métodos dependente e independente de cultura e encontraram diferenças na composição da microbiota (LINDH et al., 2005; PIDIYAR et al., 2004).

Os gêneros de bactérias associados a *An. darlingi* encontrados no presente trabalho, que foram recuperadas utilizando meio LB ágar, também foram encontrados em outras espécies de *Anopheles* selvagens (Tabela 5). Porém, Chavshin (2012), utilizando o meio de cultura BH ágar isolou 5 gêneros diferentes de bactérias a partir de *An. stephensi*: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Myroides* e *Aeromonas* (CHAVSHIN et al., 2012).

Nesse contexto, Valiente-Moro e colaboradores demonstraram que a composição do meio de cultura afeta a variedade de microrganismos recuperados (VALIENTE MORO et al., 2013). Logo, ao se utilizar meio de cultura diferente do LB é possível que diferentes espécies de microrganismos sejam recuperadas a partir das fezes de *An. darlingi*.

**Tabela 5 - Ocorrência dos gêneros bacterianos encontrados em outras espécies de *Anopheles***

Filo/Classe/Família/Gênero de bactérias encontradas neste trabalho	Espécie selvagem/Autor
<b>FIRMICUTES/Bacilli</b> Staphylococcaceae <i>Staphylococcus</i>	<i>An. culicifacies</i> (CHAVSHIN et al., 2014)
<b>PROTEOBACTERIA/Betaproteobacteria</b> Burkholderiaceae <i>Burkholderia</i>	<i>An. gambiae</i> (BOISSIÈRE et al., 2012)
<b>PROTEOBACTERIA/Gammaproteobacteria</b> Enterobacteriaceae <i>Cedecea</i>	<i>An. funestus</i> (STRAIF et al., 1998) <i>An. gambiae</i> (STRAIF et al., 1998)
<i>Enterobacter</i>	<i>An. albimanus</i> (GONZALEZ-CERON et al., 2003)
<i>Klebsiella</i>	<i>An. stephensi</i> (RANI et al., 2009) <i>An. funestus</i> (STRAIF et al., 1998) <i>An. gambiae</i> (STRAIF et al., 1998) <i>An. stephensi</i> (Jadin, 1967) <i>An. durenii</i> (Jadin et al., 1966)
<i>Pantoea</i>	<i>An. stephensi</i> (DJADID et al., 2011)

<i>Serratia</i>	<i>An. gambiae</i> /Lindh et al, 2008 <i>An. gambiae</i> (STRAIF et al., 1998) <i>An. funestus</i> (STRAIF et al., 1998) <i>An. darlingi</i> (TERENIUS et al., 2008)  <i>An. Arabiensis</i> (LINDH et al., 2005) <i>An. albimanus</i> (GONZALEZ-CERON et al., 2003) <i>An. stephensi</i> /(Jadin, 1968) <i>An. stephensi</i> (RANI et al., 2009)
<b>PROTEOBACTERIA/Gammaproteobacteria/</b> Moraxellaceae <i>Acinetobacter</i>	<i>An. funestus</i> /(OSEI-POKU, 2012) <i>An. stephensi</i> (RANI et al., 2009) <i>An. claviger</i> (RAHARIMALALA et al., 2016) <i>An. maculipennis</i> (RAHARIMALALA et al., 2016) <i>An. plumbeus</i> (RAHARIMALALA et al., 2016)

Os 8 gêneros de bactérias identificados neste trabalho são distribuídos em 4 famílias. Seis gêneros pertencem a família **Enterobacteriaceae**, um pertence a família **Moraxellaceae**, um pertence a família **Burkholderiaceae** e um pertence a família **Staphylococcaceae** (Tabela 4). Para a identificação das bactérias isoladas foi considerado o agrupamento filogenético com representantes de cada gênero bacteriano. A seguir são comentados os agrupamentos filogenéticos e características de cada gênero.

### 5.2.1 Gênero *Staphylococcus*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 16S rRNA das bactérias isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 100% entre as bactérias do gênero *Staphylococcus*. Os isolados bacterianos 34, 35, 51 e 52 foram agrupados com *Staphylococcus sciuri* (gb|AJ421446.1) (*bootstrap* de 93%). Os isolados 17, 18 e 50 foram agrupados com *S. warneri* (gb|L37603.1) (*bootstrap* de 95%) e os isolados 56, 59 e 60 foram agrupados com *S. arlettae* (gb|AB009933.1) e com *S. kloosii* (gb|AB009940.1) (*bootstrap* de 97%).

**Taxonomia:** Domínio Bacteria; Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Bacillales, Família Staphylococcaceae, Gênero *Staphylococcus*.

**Morfologia/características de cultura:** Gram-positivos, as células esféricas, 0.5-1.5 µm de diâmetro, que ocorrem isoladamente, em pares ou a formação de agregados irregulares

(dividindo-se em mais de um plano). Metabolismo respiratório e fermentativas, anaeróbios facultativos, sem motilidade.

**Ecologia:** *S. sciuri* pode ser isolado do solo, água, areia, pele animal e amostras clínicas de humanos (urina). Pode crescer em habitats que contêm apenas uma fonte de nitrogênio inorgânico e, portanto, pode ser mais de forma livre do que outros estafilococos (DE VOS et al., 2009). *S. warneri* foi isolado a partir de pele humana e animal.

**Patogenicidade:** *S. sciuri* pode causar infecção do trato urinário, endocardite, peritonite, choque séptico e infecções de feridas em seres humanos. Patogenicidade duvidosa. *S. sciuri* é frequentemente presente na flora da pele, boca e nariz em cães saudáveis e bovinos.

*S. warneri*: Geralmente é um organismo comensal na pele de seres humanos e animais. Podem produzir bacteremia e endocardite por dispositivos contaminação da prótese em humanos. Tem sido associada a mastite em bovinos. Possível causa de aborto bovino (DE VOS et al., 2009).

**Resistência à antimicrobianos:** *Staphylococcus aureus* não possui a característica de carregar resistência intrínseca à antibióticos, porém *Staphylococcus* sp pode apresentar resistência intrínseca ao antibióticos Novobiocina, fosfomina e ácido fusídico. Por exemplo, *S. sciuri* é resistente à Novobiocina e Lisozima e *S. warneri* é sensível a Novobiocina e resistente à lisozima. A resistência de *Staphylococcus* aos antibióticos Azitromicina, caritromicina, eritromicina, clindamicina, ocacilina, cefoxitina, penicilina e trimetropim-sulfametoxazole devem ser reportadas a FDA ((CLSI), 2017).

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** Não foram encontrados relatos até o momento.

### 5.2.2 Gênero *Burkholderia*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 16S rRNA das bactérias isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 100% entre os isolados bacterianos 5 e 19 com uma bactéria do gênero *Burkholderia* (gb|AB114607.1).

O gênero *Burkholderia* foi proposto em 1992, a partir da divisão do gênero *Pseudomonas* em decorrência da análise dos dados de rRNA. A espécie tipo é *B. cepacia*, anteriormente denominada *Pseudomonas cepacia*.

O complexo *Burkholderia cepacia* inclui as espécies: *Burkholderia anthina*, *B. ambifaria*, *B. arboris*, *B. cepacia*, *B. cenocepacia*, *B. diffusa*, *B. dolosa*, *B. latens*, *B.*

*metallica*, *B. multivorans*, *B. fenazinio*, *B. pyrrocinia*, *B. seminalis*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*.

**Taxonomia:** Domínio Bacteria; Filo Proteobacteria, Classe Betaproteobacteria, Ordem Burkholderiales, Família Burkholderiaceae, Gênero *Burkholderia*.

**Morfologia/características de cultura:** Bacilo reto, com um único flagelo polar ou um tufo de flagelos polares (com a exceção de *B. mallei*, que é aflagelado). Gram-negativa, não-fermentadoras. A maioria das espécies pode crescer a 40°C. Todos podem utilizar glicose, glicerol, inositol, galactose, sorbitol e manitol.

**Ecologia:** Isolado de água, solo, plantas (*Allium cepa* - cebola), animais (ABIS, [s.d.]; BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005).

**Patogenicidade:** Patogênica (DENTINI et al., 2017; LEITÃO et al., 2010). *B. cepacia* é patógeno comum encontrado em infecção urinária e pulmonar. A infecção respiratória por *B. cepacia* pode ser fatal (ABIS, [s.d.]).

**Resistência à antimicrobianos:** *Burkholderia* possui a característica de carregar resistência intrínseca aos antibióticos: Ampicilina, piperacilina, ticarcilina, amoxicilina+clavulanato amoxicilina+sulbactam, aztreonan, ertapenem, trimethoprim, fosfomicina, piperacilina,+tazobactam, cefotaxime, ceftriaxone, cefepine, imipenem, ertapenem, polimixina B(colistina), aminoglicosídeos. Porém, não existe recomendação que estas resistências sejam reportadas a FDA ((CLSI), 2017).

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** Não foram encontrados relatos até o momento.

### 5.2.3 Gênero *Cedecea*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 16S rRNA das bactérias isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 97% com uma bactéria *Cedecea* (gb|KC201361.1).

**Taxonomia:** Domínio Bacteria; Filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Enterobacteriales, Família Enterobacteriaceae, Gênero: *Cedecea*.

**Morfologia/características de cultura:** bastonetes Gram-negativos, 0,6-0,7 a 1,3-1,9 µm. É móvel por flagelos peritricosos.

**Ecologia:** isolada de espécimes clínicas de humanos, fezes e alguns artrópodes.

**Patogenicidade:** Patógeno oportunista. Associada a infecções em humanos. Há relatos de *C. lapagei* provocando periodontite, após intervenção cirúrgica (ABIS, [s.d.]; BERGEY, 2005).

**Resistência à antimicrobianos:** Não consta no CLSI 2017 ((CLSI), 2017).

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:**

Não foram encontrados relatos até o momento.



#### 5.2.4 Gênero *Enterobacter*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 16S rRNA das bactérias isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético dos isolados bacterianos 3, 4, 6, 21, 22, 23, 24 e 30 com *Enterobacter cloacae* (gb|AY7878.1) com valor de *bootstrap* de 61% (Figura 17). A identificação das espécies foi confirmada por MALDI-TOF. As sequências das bactérias 57 e 58 não estão representadas na árvore, pois estas sequências não amplificaram na PCR para 16S rRNA, logo a identificação foi realizada apenas com MALDI-TOF.

**Taxonomia:** Domínio Bacteria; Filo Proteobacteria; Classe Gammaproteobacteria; Ordem Enterobacteriales; Família Enterobacteriaceae; Gênero *Enterobacter*.

**Morfologia/características de cultura:** Bactérias pequenas, Gram-negativas, bacilos retos, usualmente móveis com 4-6 flagelos peritricosos (flagelos uniformemente distribuídos sobre o corpo). 0,6-1 x 1,2 -3,0 µm. Anaeróbias facultativas (realizam tanto metabolismo respiratório como fermentativo). Colônias em ágar nutriente são circulares de 2-3 mm de diâmetro.

**Ecologia:** Podem ser encontradas na pele de humanos e plantas, assim como no solo, água, trato intestinal de humanos e animais, espécimes clínicas e alguns produtos diários.

**Patogenicidade:** *Enterobacter* raramente causam doenças em um indivíduo saudável. É um patógeno oportunista, similar aos outros membros da família Enterobacteriaceae. Possui uma endotoxina conhecida por desempenhar um papel importante na patofisiologia de sepse e suas complicações (ABIS, [s.d.]; BERGEY, 2010).

**Resistência à antimicrobianos:** *Enterobacter cloacae* possui a característica de carregar resistência intrínseca aos antimicrobianos: Ampicilina, amoxicilina+clavulanato, amoxicilina+sulbactam, cefalosporina I (cefazolin, cefalotin), cefamicina (cefoxitin, cefotetan) cefalosporinaII (cefuroxime) e polimixina B (colistina). É recomendado que a resistência de *E. cloacae* aos antimicrobianos: Ampicilina, cefazolin, gentamicina e tobramicina seja monitorada e reportada a FDA ((CLSI), 2017).

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** Cirimotich e colaboradores (2011) mostraram que os mosquitos não se contaminam com parasitas de *Plasmodium* quando expostos a uma bactéria *Enterobacter* isolada de populações de mosquitos selvagens no sul da Zâmbia, denominada Esp\_Z. Os autores mostraram que a inibição do desenvolvimento de parasitas pode ser mediada por geração bacteriana de ROS (espécies reativas de oxigênio). A geração de ROS por *Enterobacter* Esp\_Z resulta em uma maior resistência à infecção por *Plasmodium* em *An. gambiae* (CIRIMOTICH et al., 2011).

Além disso, Esp\_Z foi isolada de 25% dos mosquitos coletados durante uma estação chuvosa. Os autores sugerem que pode ser possível manipular a composição da flora microbiana do intestino médio em mosquitos selvagens para aumentar a prevalência de Esp\_Z ou outras bactérias naturalmente inibitórias como parte de uma estratégia integrada de controle da malária (CIRIMOTICH et al., 2011).

A presença de *Enterobacter cloacae* em *An. stephensi* provoca um aumento da resposta imune do mosquito à infecção por *P. falciparum* por elevar a expressão de SRPN6 (inibidor de serino proteases putativo) (EAPPEN; SMITH; JACOBS-LORENA, 2013).

### 5.2.5 Gênero *Klebsiella*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 16S rRNA das bactérias isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 95% entre o isolado bacteriano 40 com a espécie *Klebsiella pneumoniae* (gb|AY302437.1) (Figura 17). O Isolado 26 foi classificado como *K. pneumoniae* apenas no MALDI-TOF, pois este isolado não amplificou na PCR para 16S rRNA.

**Taxonomia:** Domínio Bacteria; Filo Proteobacteria; Classe Gammaproteobacteria; Ordem Enterobacteriales; Família Enterobacteriaceae; Gênero *Klebsiella*.

**Morfologia/características de cultura :** Gram-negativa, reta, não móvel, capsulada, bacilo de 0.3-1.0 µm x 0.6-6 µm. Colônias úmidas brilhantes que variam em diferentes graus de viscosidade (*M-type colonies*). Nenhum requisito especial. Anaeróbios facultativos, a temperatura ótima de crescimento é entre 35 e 37 °C. Meios: Ágar Nutriente ou caldo nutriente, Ágar de Soja Trypticase ± 5% de sangue de carneiro, Mac Conkey, ágar Mueller Hinton.

**Ecologia:** Amplamente distribuída na natureza. Isolada de solo e plantas, onde elas parecem ser responsáveis pela fixação de nitrogênio, também isoladas a partir de água, e de algumas espécimes clínicas (humanos e animais).

**Patogenicidade:** Patogênica. Frequentemente causam infecções nosocomiais humanas. Em particular, a espécie *Klebsiella pneumoniae*, mais importante do ponto de vista médico, é responsável por uma proporção significativa de infecções do trato urinário adquiridas no hospital, pneumonia, septicemia e infecções nos tecidos moles (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Apresentam antígenos K (capsular) e O (Somático). Pode ocorrer reação cruzada com antígenos K e O de *Klebsiella*, com antígenos de *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae* e

*Salmonella.paratyphi*. Não apresentam antígenos H (flagelar). Muitas linhagens produzem bacteriocinas (ABIS, [s.d.]).

**Resistência à antimicrobianos:** O gênero *Klebsiella* possui a característica de carregar resistência intrínseca aos antimicrobianos Ampicilina e Ticarcilina. É recomendado que a resistência de *Klebsiella* aos antimicrobianos Ampicilina, cefazolin, gentamicina e tobramicina seja monitorada e reportada a FDA ((CLSI), 2017).

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênesse:** Não foram encontrados relatos até o momento.

### 5.2.6 Gênero *Pantoea*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 16S rRNA das bactérias isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de de 99% entre o isolado bacteriano 2 com espécie de *Pantoea dispersa* (gb|GQ246183.1) e um agrupamento filogenético com *bootstrap* de de 63% entre os isolados bacterianos 27, 28, 33 e 36 com *Pantoea agglomerans*. Porém, serão necessárias análises complementares para afirmar a espécie desses isolados, uma vez que 28, 33 e 36 amplificaram para 16S rRNA, mas não foi possível classificar taxonomicamente utilizando estas sequências, nem mesmo foi possível identificar utilizando MALDI-TOF. A identificação foi realizada com base no agrupamento filogenético, pois as bactérias 27, 28, 33 e 36 agruparam no mesmo clado que *P. agglomerans*, e com base na identificação bioquímica automatizada utilizando 64 provas bioquímicas no VITEK<sup>®</sup>2 da Biomérieux.

A identificação da bactéria *P. dispersa* (bactéria 2) foi realizada utilizando tanto 16S rRNA parcial (região v4, v5, v6), quanto MALDI-TOF (bioMérieux), técnica utilizada em laboratórios clínicos (FOSTER, 2013). Ambos métodos foram eficientes para identificação de *P. dispersa*. Porém, para as bactérias 27, 28, 33 e 36, identificadas como *Pantoea* sp por método bioquímico automatizado VITEK<sup>®</sup>2 (bioMérieux) e que ficaram filogeneticamente agrupadas no mesmo clado, não foi possível determinar a espécie nem com 16S rRNA parcial (no banco de dados RDP 16S e refseq BLASTN), nem com MALDI-TOF (bioMérieux), utilizando o banco de dados atual do fabricante. A bactéria 36 foi identificada como *Pantoea agglomerans* utilizando identificação bioquímica automatizada CRISTAL BD realizada pela “Coleção de Bactérias da Amazônia – CBAM” (inserida na Coleção Biológica do Instituto Leônidas e Maria Deane, CBILMD).

Filogeneticamente, a bactéria *P. dispersa* (bactéria 2), ficou agrupada em um clado diferente das bactérias 27, 28, 33, 36 e 38 (Figura 17). Estas bactérias foram provisoriamente tratadas como *Pantoea* sp pela identificação com VITEK<sup>®</sup>2 (bioMerieux) e Cristal BD. Mas, as sequências obtidas do sequenciamento não foram depositadas no GenBank, pois para uma identificação precisa de *P. agglomerans* são necessárias outras análises. Para essa espécie, Rezzonico e colaboradores (2010), recomendam a tipagem de sequência Multilocus (MLST) ou MALDI-TOF MS Whole-Cell (REZZONICO et al., 2010).

Segundo Rezzonico e colaboradores (2012) utilizando os painéis bioquímicos, juntamente com seus bancos de dados comumente empregados nos diagnósticos médicos, por exemplo API system (bioMerieux SA) é difícil diferenciar *P. agglomerans* de outras espécies do mesmo gênero ou mesmo de outros gêneros de enterobactérias (REZZONICO et al., 2012).

Bancos de dados para o sistema sistema API (bioMerieux SA), não possuem referências para discriminar *P. agglomerans* das outras 13 espécies de *Pantoea*, ocasionando falsas identificações de *P. agglomerans* (REZZONICO et al., 2012). Segundo os autores, estes painéis de identificação são inadequados para a resolução das espécies de *Pantoea* (DELÉTOILE et al., 2009; REZZONICO et al., 2010) e este fato levou à confusão em torno de sua patogenicidade, pois estudos moleculares baseados em sequenciamento de DNA refutaram a identidade de vários isolados clínicos inicialmente relatados como *P. agglomerans* (DELÉTOILE et al., 2009; REZZONICO et al., 2009).

Utilizando 16S rRNA parcial, VITEK<sup>®</sup>2 e MALDI-TOF não foi possível afirmar a espécie das bactérias 27, 28, 33, 36 e 38, classificadas provisoriamente como *Pantoea* sp. Portanto, estas bactérias deverão ser enviadas para a identificação por um especialista no gênero *Pantoea*.

**Taxonomia:** Domínio Bacteria; Filo Proteobacteria; Classe Gammaproteobacteria; Ordem Enterobacteriales; Família Enterobacteriaceae; Gênero *Pantoea*.

**Morfologia/características de cultura:** Gram-negativa, bacilo sem esporos, tamanho de 0.5-1.3 x 1.0-3.0 µm, móvel por flagelos peritricosos. Algumas bactérias formam estruturas agregadas chamadas simplasmata. As colônias desenvolvidas em ágar nutriente são lisas, translúcidas, e mais ou menos convexas, com margem inteira. Não pigmentado ou amarelo, bege pálido, ou ainda colônias amarelas avermelhadas pálidas. Anaeróbios facultativos, temperatura de crescimento 30-37 °C. Crescem em meios: ágar nutriente ou caldo nutriente; Ágar Triptona de Soja (TSA)± 5% de sangue de carneiro; meio LuriaBertani.

**Ecologia:** Amplamente distribuídos na natureza. Isolados de água, solo, plantas e fezes de animais e humanos.

**Patogenicidade:** Em geral não é considerada patogênica. Oportunista (ABIS, [s.d.]).

**Resistência à antimicrobianos:** Não possui resistência intrínseca a antimicrobianos. Não consta no CLSI 2017((CLSI), 2017).

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:**

*Pantoea* é considerada um simbiote natural de mosquitos. Podem colonizar várias espécies de mosquitos e é facilmente transformada e cultivada. Assim, *Pantoea* tem sido proposta para aplicações em paratransgênese (BISI; LAMPE, 2011; DJADID et al., 2011).

Wang et al (2012) relataram a presença de *P. agglomerans* no lúmen do intestino médio de *Anopheles*. Estas bactérias foram modificadas geneticamente para produzir proteínas efetoras anti-*Plasmodium* que tornam o mosquito hospedeiro refratário à infecção de malária. Esses autores também relataram que linhagens engenheiradas de *P. agglomerans* foram capazes de inibir o desenvolvimento de *Plasmodium falciparum* em até 98% (WANG et al., 2012). Além disso, Wang e colaboradores (2012) relataram que o número de bactérias *P. agglomerans* aumentou mais de 200 vezes durante os 2 primeiros dias após a alimentação sanguínea (WANG et al., 2012), fato que é vantajoso, pois aumentando a quantidade de bactérias, conseqüentemente é possível aumentar a expressão de peptídeos anti-*Plasmodium*. Além disso, bactérias Gram-negativas, como *P. agglomerans* reduzem a infecção por *P. falciparum* de *An. stephensi* (PUMPUNI et al., 1996; PUMPUNI C. B., BEIER M.S., NATARO J.P., GUERS L.D., 1993).

Entre as vantagens de utilização de *P. agglomerans* como candidata a paratransgênese podemos citar que a bactéria não é patogênica a humanos, sobrevive a várias passagens no trato digestório de *Anopheles* e esta colonização persiste por até 2 semanas após ingestão da bactéria. Ainda, ela é naturalmente encontrada em diversas espécies de mosquito, incluindo *Anopheles* sp (RIEHLE et al., 2007).

### 5.2.7 Gênero *Serratia*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 16S rRNA das bactérias isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 99% entre os isolados bacterianos 29, 31, 32, 37, 38, 46, 47, 48 e 49 com espécies de *Serratia marcescens* (gb|AB061685.1) e um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 99% entre os isolados bacterianos 1, 7, 8, 12, 41, 42, 43, 44 e 55 com *S. liquefaciens*. As bactérias 53 e 54

não amplificaram na PCR da região 16S rRNA e foram identificadas apenas no MALDI-TOF como *S. liquefaciens*.

**Taxonomia:** Domínio Bacteria; Filo Proteobacteria; Classe Gammaproteobacteria; Ordem Enterobacteriales; Família Enterobacteriaceae; Gênero *Serratia*.

**Morfologia/características de cultura:** Gram-negativo, bacilos retos, 0.5-0.80 x 9-2.0 µm, não esporuladas. Algumas cepas são capsuladas. Móveis por flagelos peritricosos. Algumas espécies produzem um pigmento vermelho insolúvel em água (prodigiosina). A produção do pigmento é variável e nem todas as cepas produzem. A produção é influenciada por condições de cultivo (30 °C) e composição do meio. As colônias apresentam de 1 a 3 mm de diâmetro, circular, brilhante, opaca, creme branco suave e com uma margem inteira. Algumas cepas podem ter um odor de mofo distintivo. Anaeróbios facultativos, temperatura de crescimento de 20-35 °C (intervalo pode variar de 10 a 40 °C). Não necessitam de fatores de crescimento. Meios: Agas nutriente ou Caldo Nutriente, Ágar Triptona de Soja (TSA) ± 5% de sangue de carneiro, Mac Conkey Ágar, Ágar Leite.

**Ecologia:** Espécies de *Serratia* estão amplamente distribuídas na natureza. Isoladas a partir de amostras clínicas, água, solo, alimentos, humanos e animais, principalmente a partir de feridas e no trato respiratório (mais frequentemente *S. marcescens*) também de moluscos e insetos.

**Patogenicidade:** *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. grimesii* podem causar osteomielite, peritonite, pneumonia, ceratite, conjuntivite, infecções do trato urinário, septicemia, infecções de feridas, infecções nosocomiais. Idosos e recém-nascidos são mais suscetíveis. *S. ficaria* predominantemente podem causar infecções biliares e sepse em áreas que cultivam árvores de figo. A patogenicidade não é muito clara (ABIS, [s.d.]).

**Resistência à antimicrobianos:** Não possui resistência intrínseca a antimicrobianos ((CLSI), 2017).

#### **Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:**

*Serratia marcescens* HB3 inibe o desenvolvimento do *Plasmodium* dentro do intestino médio do mosquito *An. stephensi* interrompendo a invasão do oocineto através das células epiteliais do intestino médio. Os autores do estudo supracitado observaram que *S. marcescens* cepa HB3 deve ser introduzida de maneira contínua ao inseto vetor para exercer esta ação. Isso indica que podem existir fatores de estresse ativos, tais como imunidade inata, que modulam a dinâmica das populações de *Serratia* dentro do ambiente fechado do intestino médio do mosquito (BANDO et al., 2013). *S. marcescens* também bloqueia o desenvolvimento esporogônico de *P. vivax* em *An. albimanus* (GONZALEZ-CERON et al., 2003). Além disso, reduz a susceptibilidade de *An. stephensi* à infecção por *P. falciparum*.

Recentemente, *Serratia marcescens* AS1 foi geneticamente modificada para secreção de proteínas efetoras anti-*Plasmodium* e as cepas recombinantes inibiram o desenvolvimento de *Plasmodium falciparum* em mosquitos (WANG et al., 2017).

### 5.2.8 Gênero *Acinetobacter*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 16S rRNA das bactérias isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 100% entre os isolados bacterianos 9, 10, 11, 13, 14, 15 e 16 com uma bactéria *Acinetobacter baumannii* (gb|KU922292.1).

**Taxonomia:** Domínio Bactéria; Filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Pseudomonadales, Família Moraxellaceae, Gênero *Acinetobacter*.

**Morfologia/características de cultura:** Bastonetes Gram-negativos (0.91.6-1.5 x 1,5-2,5 µm), tornando-se esférica na fase estacionária de crescimento. Agrupadas em pares ou em cadeias. Não móveis, mas podem exibir motilidade por contração. Temperatura ótima de crescimento varia entre 33-35°C. Alguns podem não crescer a 37 °C. Aeróbico.

**Ecologia:** Encontrada principalmente em água e solo. Em mosquitos, a presença de *Acinetobacter* no intestino de mosquitos aumenta consideravelmente após alimentação sanguínea quando comparada à alimentação açucarada dos mosquitos adultos (ZAYED; BREM, 2004).

**Patogenicidade:** A maioria das espécies de *Acinetobacter* estão associadas a bacteriemia, infecções pulmonares, meningites, diarreia e infecções nosocomiais e portanto são um problema para saúde humana. Além disso, são responsáveis pelo rápido desenvolvimento de resistência a uma ampla gama de antimicrobianos (ABIS, [s.d.]; DOUGHARI et al., 2011).

**Resistência à antimicrobianos:** *Acinetobacter baumannii* possui a característica de carregar resistência intrínseca aos antibióticos: Ampicilina, amoxicilina+clavulanato, aztreonam, ertapenem, trimethoprim, clorofenicol e fosfomicina. Porém, não existe recomendação que estas a resistências sejam reportadas a FDA ((CLSI), 2017).

#### **Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:**

Não foram encontrados relatos até o momento. Apesar de *Acinetobacter* sp ser encontrada frequentemente no intestino de mosquitos não é recomendada para realização de paratransgênese porque está altamente associada com bacteremia, infecções pulmonares, meningites, e rápido desenvolvimento de resistência a antimicrobianos (RAHARIMALALA et al., 2016).

*Acinetobacter* sp aumenta a resistência de *An. gambiae* ao desenvolvimento de *Plasmodium*, em parte através da indução da via de Imd (BAHIA et al., 2014b).

Além disso, 20 isolados foram enviados para depósito na “Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS)”, do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do



Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Até o presente momento, aguardamos o número de depósito das linhagens na coleção CBAS (bactérias 1, 2, 3, 4, 7, 8, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 33, 36, 39, 41 e 44).

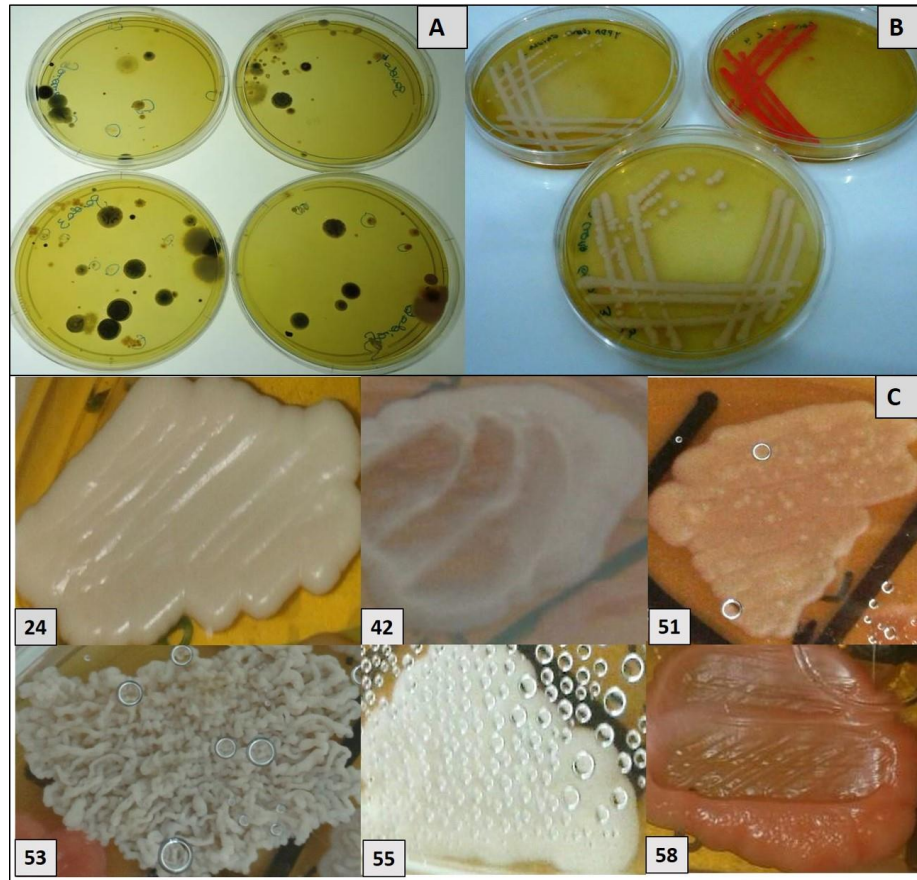
### **5.3 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS PRESENTES NAS FEZES DE *Anopheles darlingi***

Foram selecionadas 60 colônias leveduriformes a partir das fezes de fêmeas de mosquito *An. darlingi* selvagens (Figura 19). Estas leveduras foram identificadas com números ordinais que correspondem a ordem na qual elas foram coletadas.

Para o isolamento de leveduras a partir de diferentes amostras ambientais, técnicas seletivas são utilizadas para a recuperação de leveduras, empregando meios que permitem que as leveduras cresçam enquanto suprime bolores e bactérias. Na composição desses meios de cultura adiciona-se antibióticos para suprimir bactérias (KURTZMAN; FELL, 1998). No trabalho aqui desenvolvido foi utilizado cloranfenicol para inibir o crescimento de bactérias. Segundo Kurtzman e Fell (1998), leveduras nunca ocorrem naturalmente em culturas puras, e um equilíbrio deve ser atingido entre o desejo de identificar todos os componentes, independentemente da abundância, e a necessidade de reconhecer quais componentes são mais frequentes. Assim, protocolos de coleta próprios para ecologia de leveduras devem ser formulados para se obter um número suficiente de amostras para a descrição da riqueza de espécies de leveduras (KURTZMAN; FELL, 1998). O método desenvolvido para este estudo permitiu descrever a riqueza de espécies de leveduras a partir das fezes de *An. darlingi* e a obtenção de culturas puras em meio YPD com cloranfenicol.

Santos (2003) também argumenta sobre a necessidade de desenvolver estratégias de inventário e monitoramento rápido da diversidade biológica. Ele diz que, devido à altíssima diversidade de microrganismos que podem ser encontrados em qualquer ambiente por menor e aparentemente simples que seja, é praticamente impossível determinar a sua riqueza total. A única opção factível é inventariar alguns grupos taxonômicos e algumas características físicas do ambiente (um intervalo de condições e recursos), na tentativa de construir uma visão geral sobre toda a biota. O que se espera desses organismos selecionados para o inventário é que sua diversidade em um determinado local reflita pelo menos uma parte dos componentes da diversidade total (Pearson, 1994). Mas isso não significa que táxons não selecionados não sejam importantes e é necessário concentrar esforços em alguns grupos (SANTOS, 2003).

**Figura 19 – Amostras de leveduras isoladas a partir das fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* selvagens e colônias puras obtidas com o método de estriamento em placa de Petri**



**A:** Amostras de leveduras que cresceram a partir das fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* selvagens após 48 horas de cultivo em meio YDP com cloranfenicol a 30°C. **B:** Amostras de três isolados leveduriformes. **C:** colônias das leveduras 24 (*Candida*), 42 (*Metschnikowia*), 51 (*Papiliotrema*), 53 (*Pseudozyma*), 55 (*Candida*) e 58 (*Rhodotorula*).

#### **5.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES NAS FEZES DE *Anopheles darlingi***

Das 60 amplificações realizadas para a região D1/D2 do 26S rRNA de leveduras, 27 tiveram amplificação entre 400 e 700 nucleotídeos (Figuras 20 e 21 e Tabela 6) e 26 para análise da região ITS (Figura 22 e Tabela 6) sendo identificados nove gêneros de leveduras: *Pseudozyma*, *Moesziomyces*, *Papiliotrema* (=Cryptococcus), *Meyerozyma* (=Pichia), *Diutina*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Hanseniopsis* e *Metschnikowia*. O isolado 46 foi identificado apenas pela região 26S rRNA pois não amplificou a PCR para a região ITS.

Um total de 53 sequências foram submetidas ao GenBank referente às sequências consenso curadas das regiões utilizadas para as identificações (Tabela 6). Estas sequências apresentaram similaridades superiores a 97% quando comparadas com sequências depositadas

nos bancos de dados utilizados, e apresentaram agrupamentos filogenéticos com *bootstrap* acima de 90% quando 1000 aleatorizações foram realizadas (Figuras 23, 24 e 25).

A combinação das identificações utilizando 2 regiões moleculares, região D1/D2 do 26S rRNA e ITS foi crucial para a determinação das espécies pertencentes ao mesmo gênero, mas que ficaram agrupadas em clados diferentes nas árvores filogenéticas elaboradas. Para as espécies de *Candida* e *Pseudozyma*, a análise da região ITS gerou agrupamentos filogenéticos consistentes e assim foi possível a determinação das espécies das leveduras isoladas (Figuras 23, 24 e 25).

O estudo de leveduras em anofelinos, inclusive *An. darlingi*, ainda é uma frente de pesquisa incipiente, mas leveduras simbiotes foram encontradas em associação com uma ampla gama de insetos, incluindo, vespas, abelhas e besouros (BENDA, 2008; GIBSON; HUNTER, 2009; ROSA et al., 2003; TORTO et al., 2007). Invertebrados dependem de microrganismos para várias funções metabólicas, incluindo a síntese de aminoácidos, vitaminas, lipídeos, esteróis e ferormônios, até mesmo degradação de substrato alimentar, e detoxificação de compostos (SUH et al., 2003).

Apesar de não haver relatos do isolamento ou associação de leveduras com *An. darlingi*, três dos gêneros encontrados em *An. darlingi* também ocorreram em *An. stephensi*: *Candida*, *Hanseniaspora* e *Wickerhamomyces* (= *Pichia*) (RICCI et al., 2011). É importante observar que para registrar esses três gêneros de leveduras cultiváveis, Ricci e colaboradores (2011) triaram 100 colônias puras isoladas, empregando em suas rotinas meios de cultura YM e PDB e o cultivo a 30 °C. A riqueza de três espécies por eles registradas é menor que a descrita aqui, provavelmente devido ao fato de terem amostrado leveduras de mosquitos nascidos em laboratório. Aqui, além dos três gêneros de leveduras relatados por Ricci e colaboradores (2011), registrou-se a ocorrência de outros seis gêneros de leveduras: *Pseudozyma*, *Moesziomyces*, *Papiliotrema* (= *Cryptococcus*), *Diutina*, *Rhodotorula* e *Metschnikowia*, ao se investigar fezes de mosquitos selvagens da Amazônia brasileira.

Figura 20- Amplificado da região D1/D2 do 26S rRNA das leveduras de 1 a 35 que foram isoladas a partir das fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* selvagens

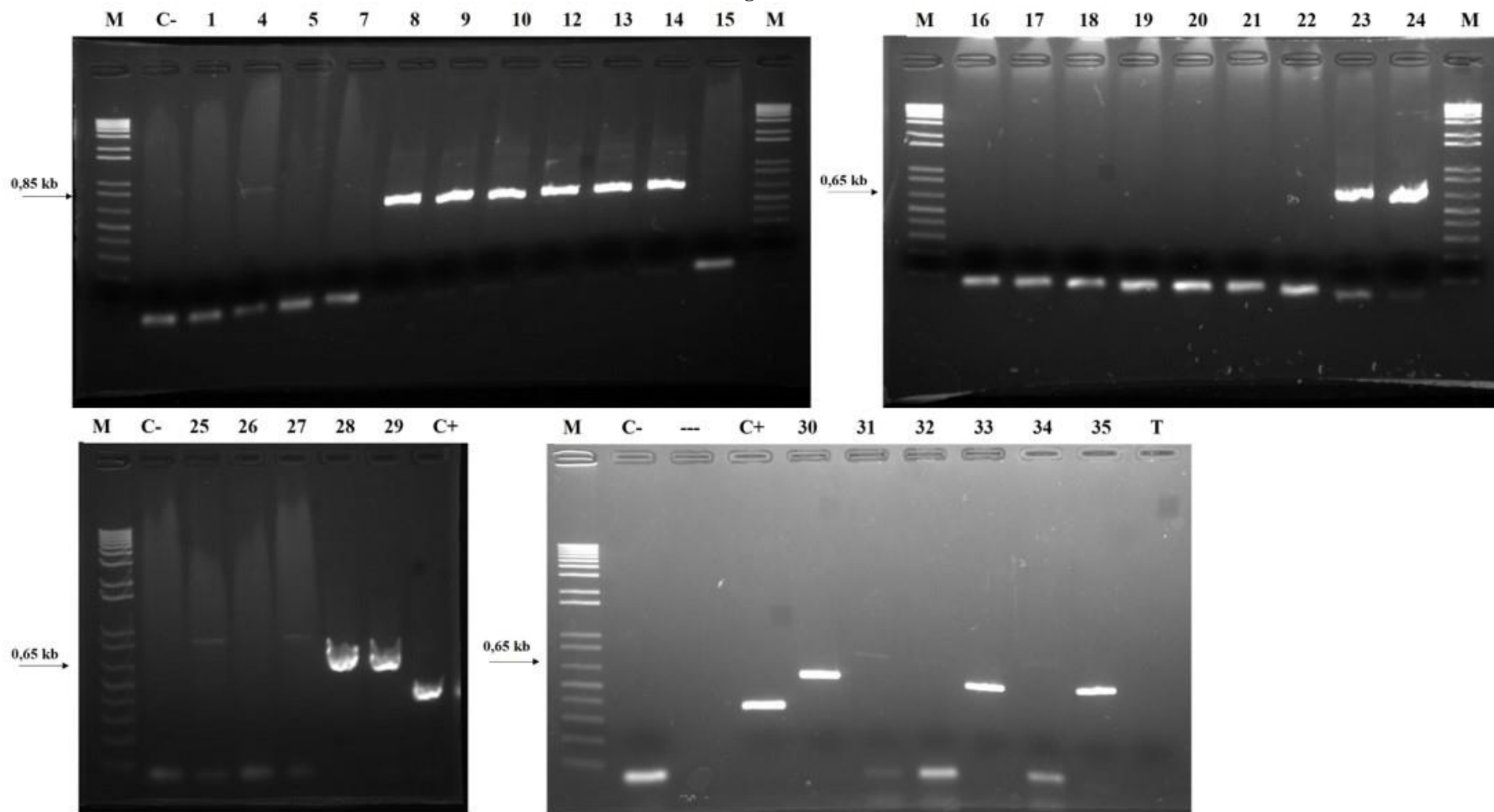
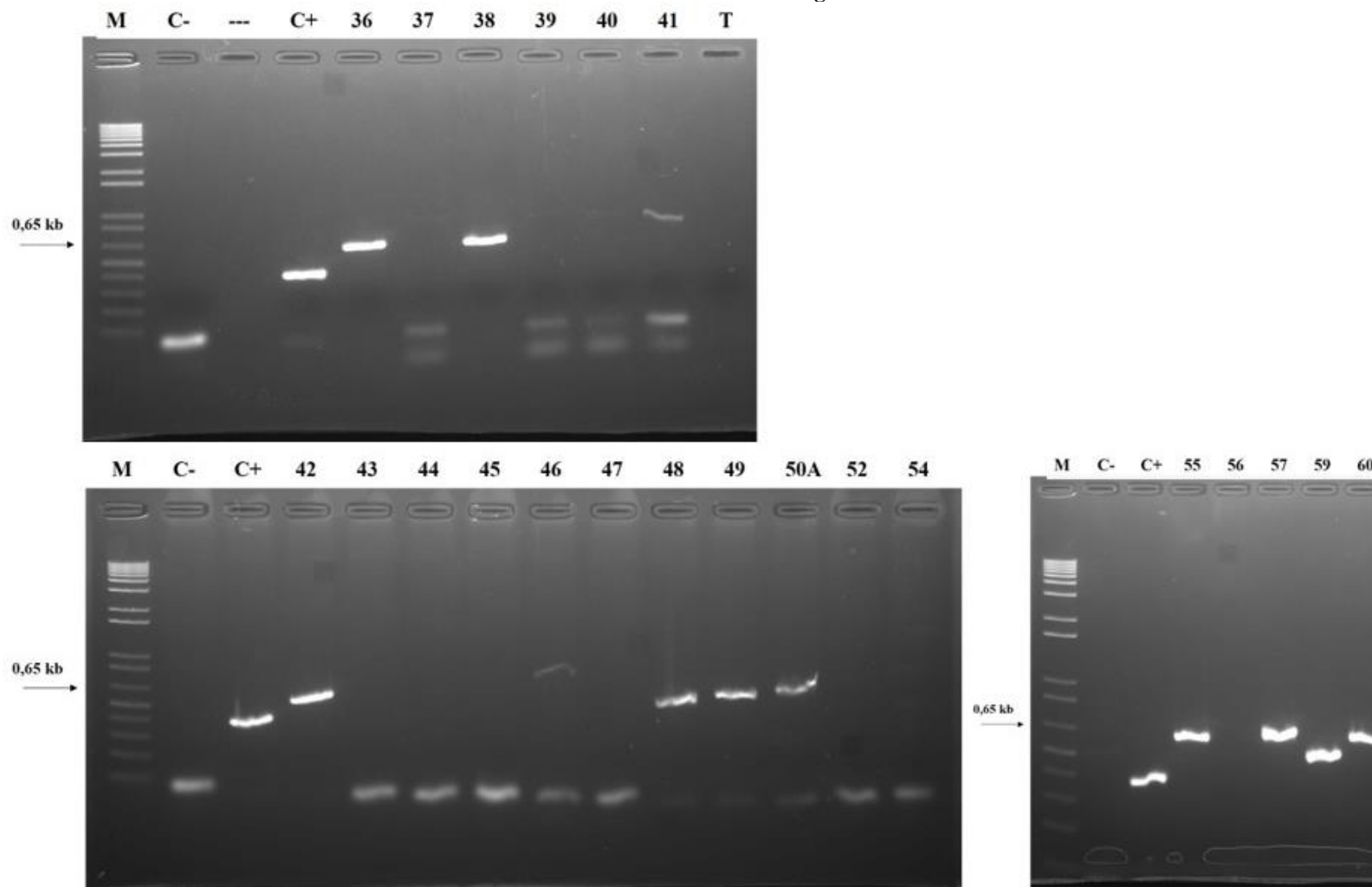
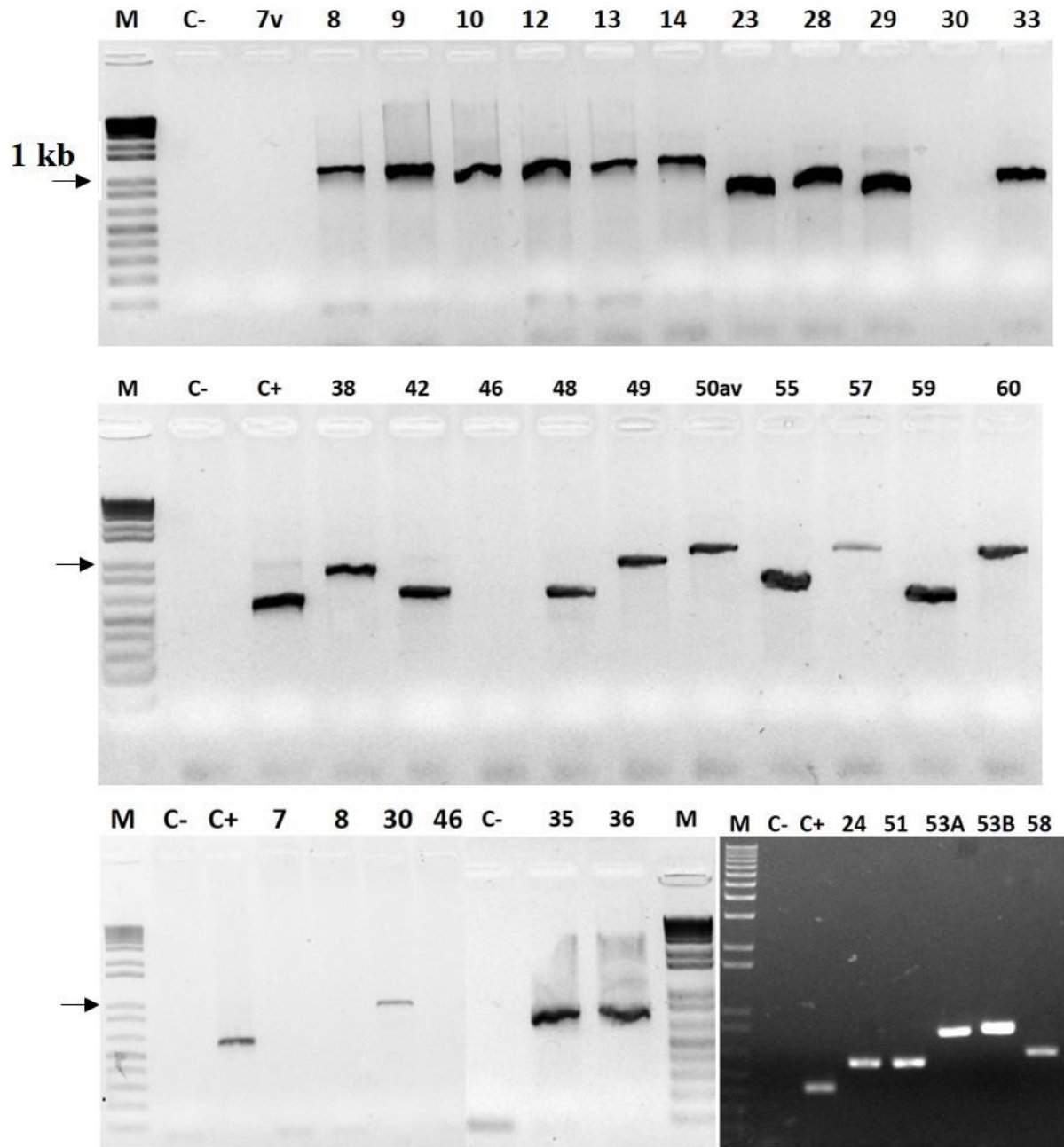


Figura 21- Amplificado da região D1/D2 do 26S rRNA das leveduras de 36 a 60 que foram isoladas a partir das fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* selvagens



M- Marcador 1KB Plus da Invitrogen. Gel de agarose 1,5%. T – Tampão de amostra.

Figura 22 - Amplificados da região ITS do rRNA das leveduras de 7 a 60 que foram isoladas a partir das fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* selvagens



M- Marcador 1KB Plus da Invitrogen. A seta indica banda referente a 1Kb. Gel de agarose 1,5%.

**Tabela 6- Leveduras identificadas utilizando sequência D1/D2 do 26S rRNA e ITS. As leveduras foram isoladas a partir das fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* selvagens oriundas de Porto Velho, RO.**

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

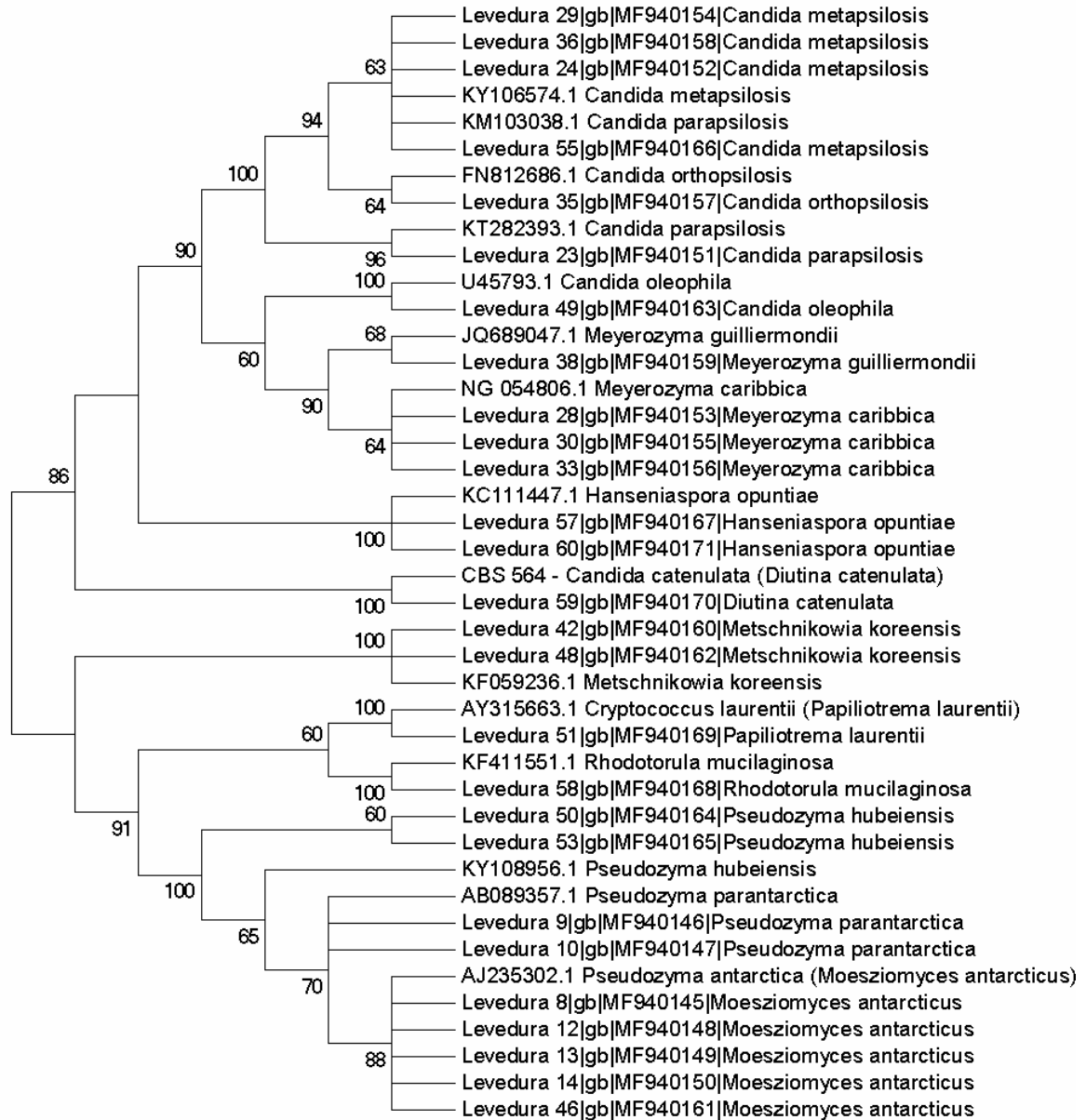
	59	<i>Diutina catenulata</i> = <i>Candida catenulata</i>	<b>MF940170</b>	100	<b>CBS 564</b>	<b>MF940135</b>	100	<b>AY493436</b>
Metschnikowiaceae	42**	<i>Metschnikowia koreensis</i>	<b>MF940160</b>	100	<b>KF059236.1</b>	<b>MF940126</b>	96,3	<b>KF059236</b>
	48**	<i>Metschnikowia koreensis</i>	<b>MF940162</b>	100	<b>KF059236.1</b>	<b>MF940127</b>	97,33	<b>KF059236</b>
Saccharomycodaceae	57	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	<b>MF940167</b>	100	<b>KC111447.1</b>	<b>MF940132</b>	100	<b>FM199951</b>
	60	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	<b>MF940171</b>	99,8	<b>KC111447.1</b>	<b>MF940136</b>	100	<b>FM199951</b>
<b>BASIDIOMYCOTA</b>								
<b>Microbotryomycetes</b>								
Sporidiobolaceae	58	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<b>MF940168</b>	100	<b>KF411551.1</b>	<b>MF940133</b>	100	<b>KP132585.1</b>
<b>Tremellomycetes</b>								
Tremellaceae	51	<i>Papiliotrema laurentii</i> = <i>Cryptococcus_laurentii</i>	<b>MF940169</b>	100	<b>AY315663.1</b>	<b>MF940134</b>	100	<b>FN428903</b>
<b>Ustilaginomycetes</b>								
Ustilaginaceae	8	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	<b>MF940145</b>	99,8	<b>AJ235302.1</b>	<b>MF940111</b>	97,11	<b>AY641557</b>
	12	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	<b>MF940148</b>	99,8	<b>AJ235302.1</b>	<b>MF940114</b>	97,17	<b>AY641557</b>
	13	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	<b>MF940149</b>	99,8	<b>AJ235302.1</b>	<b>MF940115</b>	97,19	<b>AY641557</b>
	14	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	<b>MF940150</b>	99,8	<b>AJ235302.1</b>	<b>MF940116</b>	97,25	<b>AY641557</b>
	46***	<i>Moesziomyces antarcticus</i> = <i>Pseudozyma antarctica</i>	<b>MF940161</b>	99	<b>AJ235302.1</b>	–	–	–
	9	<i>Pseudozyma parantarctica</i>	<b>MF940146</b>	100	<b>AB089357.1</b>	<b>MF940112</b>	99,86	<b>JN942671</b>
	10	<i>Pseudozyma parantarctica</i>	<b>MF940147</b>	100	<b>AB089357.1</b>	<b>MF940113</b>	99,7	<b>JN942671</b>



50	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	<b>MF940164</b>	99,8	<b>KY108956.1</b>	<b>MF940129</b>	97,65	<b>DQ008954</b>
53	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	<b>MF940165</b>	99,8	<b>KY108956.1</b>	<b>MF940130</b>	97,65	<b>DQ008954</b>

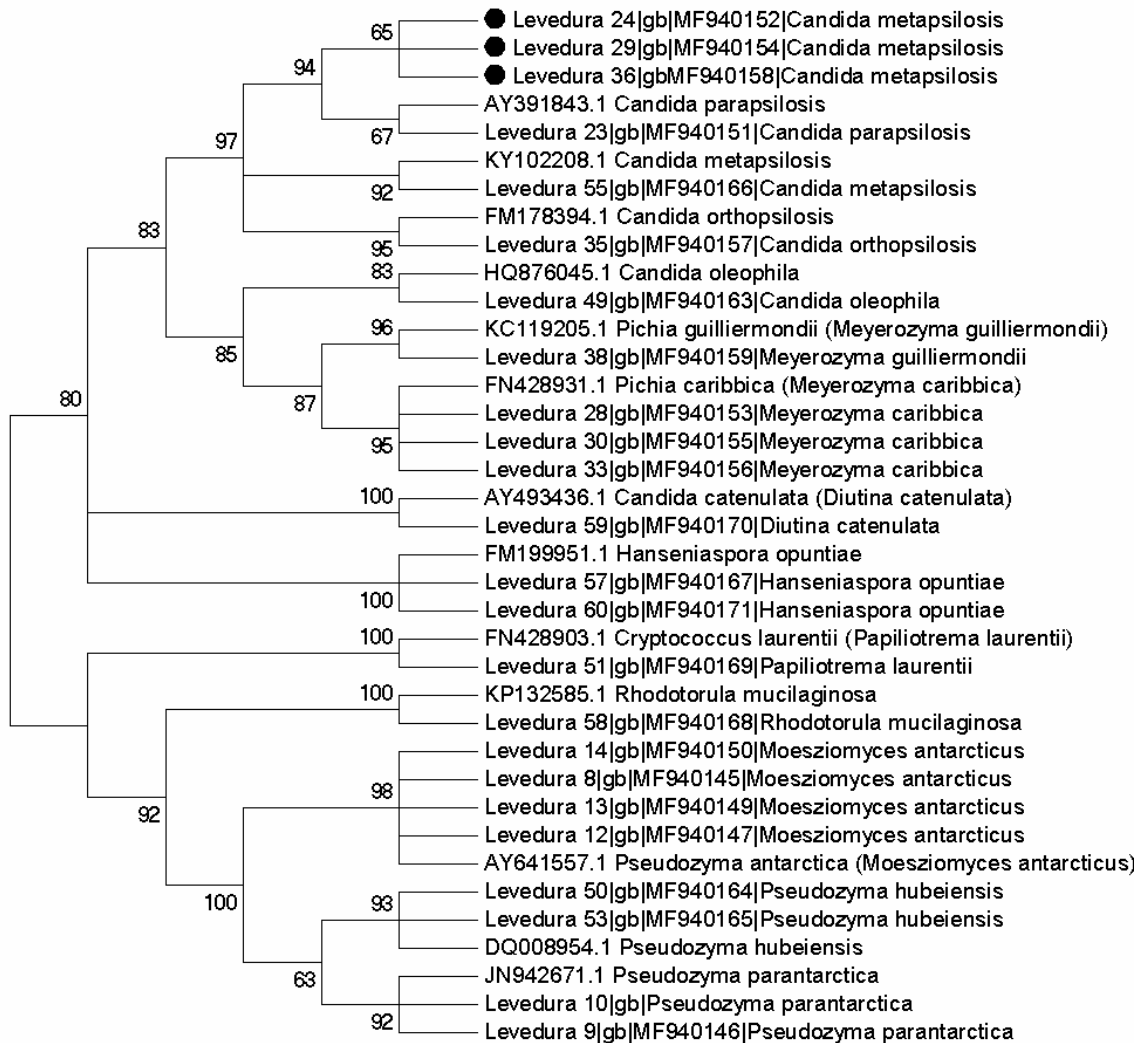
\*Estes números de acesso do GenBank somente estarão disponíveis após 30 de setembro de 2018 ou após a publicação do artigo contendo esta informação, o que vier primeiro. Amostras que não amplificaram: 1, 4, 5, 7, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 31, 32, 34, 37, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 47,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

**Figura 23 –** Árvore filogenética dos taxa das leveduras identificados utilizando a sequência 26S rRNA. As leveduras foram coletadas em fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil.



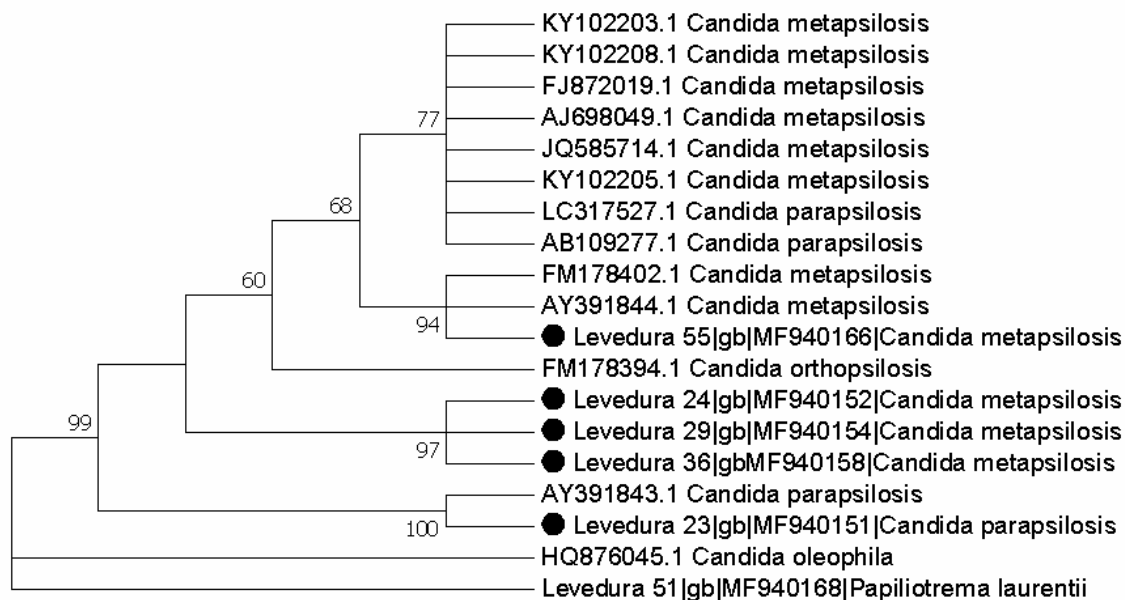
Relações evolutivas dos taxa utilizando sequência 26S rRNA. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. Os números sobre os ramos da árvore indicam o valor de *bootstrap* a partir de 1000 repetições. Para esta análise, foram utilizadas 42 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo gaps e dados faltantes foram eliminadas. Existiram 287 posições no final do dataset. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2-parâmetros. Análises evolutivas foram realizadas no Software Mega 7.0.14.

**Figura 24 –** Árvore filojetética dos taxa das leveduras identificados utilizando a sequência ITS. As leveduras foram coletadas em fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil.



**Relações evolutivas dos taxa utilizando sequência ITS1 e ITS2 rRNA** A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. Os números sobre os ramos da árvore indicam o valor de *bootstrap* a partir de 1000 repetições. Para esta análise, foram utilizadas 37 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo gaps e dados faltantes foram eliminadas. Existiram 211 posições no final do dataset. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2-parâmetros. Análises evolutivas foram realizadas no Software Mega 7.0.14. Os nomes correntes dos taxa são apresentados entre parênteses.

**Figura 25 –** Árvore filogenética do gênero *Candida* referente aos taxa das leveduras 24, 29 e 36 e taxa relacionados utilizando a região ITS rRNA. As leveduras foram coletadas em fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil.



Os números sobre os ramos da árvore indicam o valor de *bootstrap* a partir de 1000 repetições. Para esta análise, foram utilizadas 19 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo gaps e dados faltantes foram eliminadas. Existiram 362 posições no final do dataset. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2-parâmetros. Análises evolutivas foram realizadas no Software Mega 7.0.14. Os nomes correntes dos taxa são apresentados entre parênteses.

Além desse estudo, apenas Ignatova et al (1996) isolaram e identificaram leveduras de *Anopheles*, ao investigarem a flora de leveduras de *Aedes*, *Anopheles* e *Culex* da Ucrânia. O segundo estudo registrou as leveduras *Candida famata*, *C. (=Yarrowia) lipolytica*, *Rhodotorula* sp e *Cryptococcus* sp e concluiu que as linhagens estudadas fazem parte da microflora normal do mosquito (IGNATOVA et al., 1996). Porém, não foi possível determinar na fonte bibliográfica disponível quais espécies de leveduras ocorreram para cada espécie de mosquito investigada. Os outros trabalhos relacionados com leveduras em *Anopheles* são estudos para controle simbiótico e paratransgênese utilizando *W. anomalus* ou citações em artigos de revisão (CAPPELLI et al., 2014; MANCINI et al., 2016; RICCI et al., 2012a, 2012b).

Considerando-se outros mosquitos, alguns gêneros encontrados em *An. darlingi* foram encontrados em outras espécies de mosquito. Muturi et al (2016) coletaram mosquitos *Aedes triseriatus* e *Ae. japonicus* selvagens em Illinois, EUA, e estudaram a microbiota associada a esses insetos com a dissecação do intestino seguida de estudos de metagenômica. Esses autores registraram bactérias, bolores e leveduras no intestino de mosquitos *Aedes*, incluindo a

presença de *Meyerozyma*. Gusmão et al (2010), conduziram o primeiro trabalho de identificação de leveduras no intestino e ovário de mosquitos. Para isto utilizaram colônia de laboratório de *Ae. aegypti* (linhagem Rockefeller) e identificaram leveduras do gênero *Pichia* e *Candida*.

Espécies isoladas dentre os gêneros encontrados no intestino de *An. darlingi*, também foram encontradas por Steyn e colaboradores (2006) associadas a duas espécies do gênero *Culex*, na África do Sul. Os autores registraram, com o emprego da análise dos genes ITS e D1/D2 mais de uma dezena de espécies de leveduras, com destaque para *Meyerozyma guillermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida parapsilosis* (STEYN; ROETS; BOTHA, 2016). Esses autores também relataram que a comunidade de leveduras associada a *Culex pipens* apresentou diferentes composição de espécies conforme o estágio ontogenético de desenvolvimento. Portanto, observa-se que alguns gêneros, ou mesmo espécies, de leveduras são compartilhados entre os mosquitos de diferentes espécies e de diferentes regiões.

A presença de leveduras associadas a mosquitos e a outros insetos tem sido investigada para a descrição da microbiota residente no intestino desses animais e, também, para o desenvolvimento de soluções biotecnológicas diversas, inclusive para paratransgênese (HUGHES et al., 2011; MUTURI et al., 2016). Por exemplo, algumas espécies de *Phlebotomus* sp, coletados em ambiente natural no Irã, foram investigadas com foco na descrição das espécies de bactérias e leveduras que colonizavam o intestino dissecado e a cutícula desses insetos (AKHOUNDI et al., 2012). Esses autores realizaram a identificação das espécies com análise morfológica e testes bioquímicos e relataram apenas uma espécie de levedura no intestino desses insetos, *Candida albicans*. Porém, outros fungos bolores dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Acremonium* foram registrados.

Como as leveduras isoladas neste trabalho podem ser dispersadas pelas fezes de *An. darlingi*, assim como ocorre com outros insetos (ENGEL; MORAN, 2013) como *Drosophila* (CHANDLER; EISEN; KOPP, 2012), isso pode ser vantajoso para uma futura aplicação biotecnológica das espécies isoladas a partir desse material, pois outras leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, são digeridas quando utilizadas para alimentar larvas de mosquitos *Aedes* (SOUZA et al., 2016).

Os 7 gêneros de leveduras identificados neste trabalho estão distribuídos em 6 famílias: dois gêneros pertencem a família **Debaryomycetaceae**: *Candida* e *Meyerozyma*, um pertence a família **Metschnikowiaceae**: *Metschnikowia*, um pertence a família **Saccharomycodaceae**: *Hanseniaspora*, um pertence a família **Sporidiololaceae**:

Rhodotorula, um pertence a família **Tremellaceae**: *Cryptococcus*, e um pertence a família **Ustilaginaceae**: *Pseudozyma*.

#### 5.4.1 Gênero *Candida*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 26S rRNA(D1/D2) das leveduras isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 100 % entre os isolados 23, 24, 29, 35 e 36 com leveduras do gênero *Candida*.

O isolado 23 ficou agrupado com *C. parapsilosis* (CBS2152), o isolado 35 ficou agrupado com *C. orthopsilosis* (gb|FN812686.1) e os isolados 24, 29, 36 e 55 ficaram agrupados com *C. parapsilosis* (gb|KM103038.1) e *C. metapsilosis* (gb|KY106574.1) (Figura 23).

O isolado 49 ficou agrupado em um clado a parte juntamente com *C. oleophila* (U45793.1) e o agrupamento teve um *bootstrap* de 100%.

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de ITS rRNA das leveduras isoladas, o agrupamento dos isolados com espécies do mesmo gênero foi mantido, porém o valor de *bootstrap* foi superior para os agrupamentos das espécies.

O isolado 23 ficou agrupado com *C. parapsilosis* (AY381843.1) com *bootstrap* de 67%. O isolado 55 ficou agrupados com *C. metapsilosis* (KY102208.1) com *bootstrap* de 92%. O isolado 35 ficou agrupado com *C. orthopsilosis* (FM178394.1) com *bootstrap* de 95%. O isolado 49 ficou agrupado com *C. oleophila* (HQ876045.1) com *bootstrap* de 83%. Os isolados 24, 29 e 36 ficaram em um clado que apresentou um *bootstrap* de 65%, mas não ficaram agrupados com nenhuma das sequências testadas. No entanto, no GenBank, foram 98,8% similares a *C. metapsilosis* (Tabela 6). Destaca-se que o isolado 59 ficou agrupado com *Candida (Diutina) catenulata* (AY493436.1) com *bootstrap* de 100 % em um agrupamento filogenético separado dos outros isolados de *Candida*. E esse fato se repetiu com a utilização da outra região gênica analisada. Na árvore filogenética construída a partir das sequências de ITS rRNA a levedura 59 ficou agrupada com *C. catenulata* (AY493436.1) com *bootstrap* de 100 % (Figura 24 e 25).

**Taxonomia:** Domínio Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, Gênero *Candida* (IMA: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION, 2016; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

**Morfologia/características de cultura:** Células são globosas, elipsoidais, cilíndricas ou alongadas, ocasionalmente ogival, triangular, ou lunar. A reprodução é por brotamento holoblástico. Pseudohifas e hifas septadas podem ser formadas. A parede celular é de ascomicetos e de duas camadas. Balistoconídio ou artroconídio não são formados. Compostos starch-like não são produzidos. Reação para Diazoniumblue B é negativa. Xylose, ramnose e fucose não estão presentes nos hidrolizados celulares.

**Ecologia:** No Brasil, *Candida (Pseudozyma) antarctica* foi isolada de flores e nectários extraflorais e de *Drosophila fascicola*, *D. quadrum* e *D. sp* no Rio de Janeiro. *C. parapsilosis* foi encontrada em *D. fascicola* em floresta tropical atlântica e na floresta amazônica associada ao fruto *Parahancornia amapa* (MORAIS; PAGNOCCA; ROSA, 2006). *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* não são patógenos humano obrigatório, tendo sido isolado de fontes não-humanas, como animais domésticos, insetos ou solo. *C. parapsilosis* também é um comensal humano normal e é um dos fungos mais frequentemente isolados das mãos humanas (TROFA; GACSER; NOSANCHUK, 2008). *C. catenulata* foi isolada de humanos, de tripa de frango; de pele, de solo entre outros ambientes (MEYER; PAYNE; YARROW, 1998)

**Patogenicidade:** *C. catenulata* foi isolada de paciente com disenteria (MEYER; PAYNE; YARROW, 1998). *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* são consideradas patógenos a seres humanos.

**Resistência à antimicrobianos:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** Não foram encontrados relatos até o momento.

#### 5.4.2 Gênero *Meyerozyma* (= *Pichia*)

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 26S rRNA(D1/D2) das leveduras isoladas, foi possível observar um agrupamento filogenético entre o isolado 38 com levedura *M. guilliermondii* (gb|JQ689047.1). Além disso, os isolados 28, 30 e 33 ficaram agrupados com *M. caribbica* (Figura 23). Na árvore filogenética construída a partir das sequências de ITS rRNA das leveduras isoladas o isolado 38 se manteve agrupado com a levedura *M. guilliermondii* (gb|KC1192205.1) com *bootstrap* de 95 % e os isolados 28, 30 e 33 se mantiveram agrupados com *M. caribbica* com *bootstrap* de 95 % (Figura 24).

**Taxonomia:** Domínio Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Debaryomycetaceae, gênero *Meyerozyma*. *Pichia guilliermondii* Wick., Journal of Bacteriology 92: 1269 (1966) [MB#337010]≡*Meyerozyma guilliermondii*

(Wick.) Kurtzman & M. Suzuki, *Mycoscience* 51 (1): 7 (2010) [MB#513463]. *Meyerozyma caribbica* (Vaughan-Mart., Kurtzman, S.A. Mey. & E.B. O'Neill) Kurtzman & M. Suzuki, *Mycoscience* 51 (1): 8 (2010) [MB#513462]. Basiônimo: *Pichia caribbica* (IGNATOVA et al., 1996) (IMA: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION, 2016).

**Morfologia/características de cultura:** Reprodução assexuada é por brotamento lateral sobre uma base estreita. Algumas espécies podem também formar artroconídios. Células são esferoidais, elipsoidais ou alongadas e ocasionalmente podem ser oblongas, mas elas não têm formas de ogivas. Hifas e pseudohifas podem ser produzidas por algumas espécies. Asco produz de 1 a 4 (raramente mais) ascoporos que podem ter forma de chapéu (galeate), hemiesferoidal ou esferoidal com uma saliência. Geralmente os ascos são deliquescentes, mas ocasionalmente eles são persistentes. Ascos são não conjugados, ou se conjugados, eles podem mostrar conjugação entre o broto e o parental ou entre células independentes. Hifas ou pseudohifas podem servir como asco, mas eles não tornam-se turgidos ou fusiforme. Ascos não são nascidos sobre o ascoforo. As espécies são homotalicas ou heterotáticas. Açúcares podem ser fermentados. Nitrato pode ser assimilado. Reação Diazonium blue B é negativa (KURTZMAN, 1998)

**Ecologia:** *W. anomalus* foram isoladas de diversos habitats e, recentemente, de insetos. *Pichia caribbica* foi isolada de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)(GUSMÃO et al., 2007). Além disso, várias espécies de levedura do gênero *Pichia* foram isoladas em flores de *Ipomea spp* em planícies costeiras arenosas no Rio de Janeiro, e isoladas a partir de *Drosophila* tanto na floresta atlântica, como na floresta amazônica (MORAIS; PAGNOCCA; ROSA, 2006). *Pichia caribbica* (HQ222812) produz xilitol (MUKHERJI; JOSHI-NAVARE; PRABHUNE, 2013).

**Patogenicidade:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Resistência a microbianos:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** No mosquito da malária, *An. stephensi*, essas leveduras foram detectadas no intestino médio e nas gônadas do mosquito. A levedura associada a mosquitos *W. anomalus* WaF17.12 possui uma atividade antimicrobiana, que torna essa levedura um potencial como agente para o controle simbiótico da malária. São capazes de produzir um KT em um meio sem células (*in vitro*) bem como no corpo do mosquito (*in vivo*) (CAPPELLI et al., 2014b).

**Potencial biotecnológico:** *Wickerhamomyces anomalus* tem sido investigada por vários anos por seu amplo potencial biotecnológico, especialmente para aplicações na indústria de alimentos. Especificamente, a atividade antimicrobiana dessa levedura, associada à produção



de Toxinas Killer (KTs). Estas chamadas leveduras "assassinas", mostraram ser altamente competitivas no meio ambiente (GUSMÃO et al., 2007). *Meyerozyma guilliermondii* (sinonímia de *Pichia guilliermondii*) foi relatada na região amazônica em associação com abdômen de térmitas (MATOS et al., 2014). Estas leveduras se destacaram por fermentar D-xilose, fato que favorece o desenvolvimento de novas ferramentas para a bioconversão da biomassa lignocelulósica para combustíveis e outros produtos químicos de valor agregado. O trabalho de Matos et al. (2014) foi o primeiro a relatar espécie *M. guilliermondii* associada com cupins no habitat amazônico. Além disso, esta levedura apresenta outros potenciais biotecnológicos (PAPON et al., 2013).

#### 5.4.3 Gênero *Metschnikowia*

As leveduras 42 e 48 pertencem à espécie *M. koreensis*, pois apresentaram a identidade de 98% contra acessos do GenBank. Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 26S rRNA(D1/D2) das leveduras isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 100 % entre os isolados 42 e 48 com a levedura *M. koreensis* (gb|KF059236.1) (Figura 23). Foi construída uma árvore filogenética separada para os isolados 42 e 48 utilizando os marcadores ITS (Figura 26). Nesta árvore foi possível observar o agrupamento das leveduras 42 e 48 com leveduras *M. koreensis* (gb|KF059236.1 e (gb|KF059237.1) com *bootstrap* de 100%.

**Taxonomia:** Fungi, Filo Ascomycota, Saccharomycotina, Saccharomycetes, Saccharomycetidae, Saccharomycetales, Família Metschnikowiaceae, Gênero *Metschnikowia* (IMA: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION, 2016).

**Morfologia/características de cultura:** Células são esferoidais a elipsoidais, bem como piriforme, cilíndrica ou lunar. Pseudomicelio é rudimentar, raramente faltando. Ascospores são alongados em forma de clava, esferopedunculado ou elipsoidepedunculado. Ascospores são em forma de agulha atenuada em uma ou ambas as extremidades e sem um apêndice em forma de chicote. São formados 1 ou 2 esporos por Asco, dependendo da espécie. reprodução vegetativa é por brotamento lateral. Açúcares são fermentados pela maioria das espécies. Nitrato não é assimilado. O sistema de ubiquinona é coenzima Q-9. Reação de Diazonium blue B é negativa.

**Ecologia:** Esta espécie foi isolada pela primeira vez em flores na Coreia (HONG et al., 2001). Algumas espécies são parasitas em invertebrados, ou tem vida livre em habitats aquáticos; outros são terrestres, de vida livre e frequentemente associadas a flores (MILLER; PHAFF,

1998). São leveduras de néctar obtidas a partir de néctar floral de plantas tropicais (CANTO; HERRERA; RODRIGUEZ, 2017).

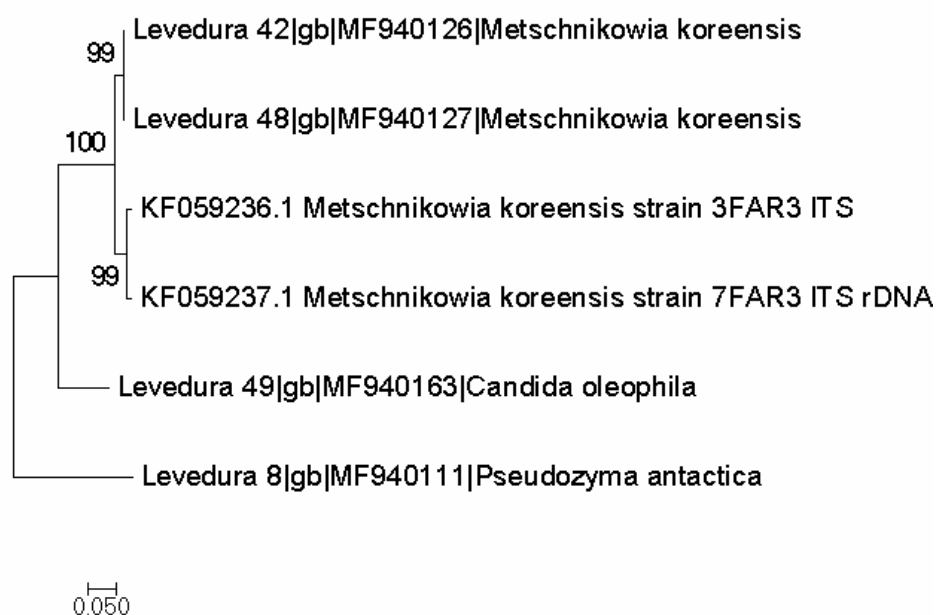
**Patogenicidade:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Resistência à antimicrobianos:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Potencial biotecnológico:** São leveduras utilizadas para a produção de vinhos e outras bebidas fermentadas (PETRUZZI et al., 2017; VARELA et al., 2016). Além disso, possuem potencial redox e por isso tem sido estudada para utilização na indústria de química fina (MEENA et al., 2014; SINGH; CHISTI; BANERJEE, 2011).

**Figura 26 –** Árvore filogetética do gênero *Metschnikowia* referente aos taxa das leveduras 42 e 48, identificados utilizando a região ITS rRNA. As leveduras foram coletadas em fezes de fêmeas de *Anopheles darlingi* na região rural de Porto Velho, Rondônia, Brasil.



Os números sobre os ramos da árvore indicam o valor de *bootstrap* a partir de 1000 repetições. Para esta análise, foram utilizadas 6 sequências nucleotídicas. Todas as posições contendo gaps e dados faltantes foram eliminadas. Existiram 261 posições no final do dataset. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura de 2-parâmetros. Análises evolutivas foram realizadas no Software Mega 7.0.14.

Os nomes correntes dos taxos são apresentados entre parênteses.

#### 5.4.4 Gênero *Hanseniaspora*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 26S rRNA(D1/D2) das leveduras isoladas, foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 100 % entre o isolado 57 e 60 com a levedura *H. opuntiae* (KC111447.1) (Figura 23). Na árvore filogenética construída a partir das sequências de ITS rRNA os isolados 57 e 60 se mantiveram agrupados com *bootstrap* de 100 % com a levedura *H. opuntiae* (FM199951.1) (Figura 24).

**Taxonomia:** Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Família: Saccharomycodaceae, Gênero *Hanseniaspora* (IMA: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION, 2016).

**Morfologia/características de cultura:** Células são apiculadas, ovóides para ovoides longas ou alongadas. Pseudohifas estão ausentes ou presentes, usualmente rudimentares e raramente bem desenvolvidas. Células vegetativas são diploides. Reprodução assexual é por brotamento bipolar com sucessão basípeta em uma base estreita. Ascospores surgem sem conjugação. Exibem de 1-4 ascospores por ascus, em forma de chapéu ou capacete, ou esferoidal com verrugas únicas. Ou suave ou enrugado com borda equatorial. Ascospores são persistentes ou deliquescentes. Glicose é fermentada. Nitrato não é assimilado. Inositol e pantotenato são necessários para o crescimento. Ácido acético não é produzido. Reação com Diazonium blue B é negativa (SMITH, 1998).

**Ecologia:** *H. opuntiae* é encontrada na fermentação de grãos de cacau (MIESCHER SCHWENNINGER; FREIMÜLLER LEISCHTFELD; GANTENBEIN-DEMARCHI, 2016). Espécies de *Hanseniaspora* foram isoladas de flores e nectários extraflorais do Rio de Janeiro e de frutos da floresta Amazônica e floresta tropical atlântica. Também foram identificadas em associação com *Drosophila* (MORAIS et al., 1995; MORAIS; PAGNOCCA; ROSA, 2006).

**Patogenicidade:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Resistência à antimicrobianos:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Potencial biotecnológico:** É associada à produção de bons chocolates (PAPALEXANDRATOU et al., 2013) e utilizada na produção industrial de vinhos (TRISTEZZA et al., 2016).

#### 5.4.5 Gênero *Rhodotorula*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 26S rRNA(D1/D2) das leveduras isoladas, foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 100 % entre o isolado 58 com a levedura *R. mucilaginosa* (gb|KF411551.1) (Figura 23). Na árvore filogenética construída a partir das sequências de ITS rRNA das leveduras isoladas o isolado 58 se manteve agrupado com *bootstrap* de 100 % com a levedura *R. mucilaginosa* (gb|KP132585.1) (Figura 24).

**Taxonomia:** Domínio Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Microbotryomycetes, Ordem Sporidiobolales, Família: Sporidiobolaceae, gênero: *Rhodotorula* (IMA: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION, 2016; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

**Morfologia/características de cultura:** células são esferoidais, ovais ou alongadas. A reprodução é por brotamento polar ou multilateral. Podem desenvolver pseudohifas ou hifas verdadeiras. Balistoconídios não são formados. Algumas linhagens sintetizam pigmentos, vermelhos ou amarelos em culturas de Ágar Malte. A maioria, mas não todas, as espécies não são hábeis em assimilar inositol. Quando o inositol é utilizado, D-glucoronato não é assimilado. Substâncias como o amido não são sintetizadas por nenhuma das espécies. Não são fermentativas. A reação de Diazonium blue B e presença de uréase são positivas. Coenzimas Q-9 e Q-10 estão presentes. A xilose é perdida em hidrolizados de células. Algumas espécies podem representar estágios anamórficos de *Rhodosporidium*, *Leucosporidium* e outros gêneros com simples poros septados (FELL; STATZELL-TALLMAN, 1998).

**Ecologia:** *Rhodotorula* é um habitante ambiental comum. Pode ser cultivada a partir de solo, água, leite, suco de frutas e amostras de ar. É capaz de eliminar os compostos nitrogenados do seu ambiente. *R. mucilaginosa* é também comumente isolado em alimentos e bebidas. Vários estudos relataram a presença de *R. mucilaginosa* em amendoim, cidra de maçã, cerejas, frutas frescas, suco de frutas, queijos, salsichas, moluscos comestíveis e crustáceos (WIRTH; GOLDANI, 2012). Trindade et al. (2002) relatou que *Rhodotorula* sp foi uma das leveduras isoladas em frutas coletadas em pequenas fazendas no Nordeste do Brasil (TRINDADE et al., 2002).

**Patogenicidade:** Anteriormente considerados não patogênicos, as espécies de *Rhodotorula* emergiram como agentes patogênicos oportunistas que têm a capacidade de colonizar e infectar pacientes suscetíveis. Entre as poucas referências à patogenicidade de *Rhodotorula* spp. em animais, há vários relatos de surtos de infecções cutâneas em frangos e animais

marinhos e infecções pulmonares e otite em ovelhas e bovinos. A maioria dos casos de infecção devido a *Rhodotorula* em humanos foram infecções associada ao uso de catéter venoso central (WIRTH; GOLDANI, 2012).

**Resistência à antimicrobianos:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Potencial biotecnológico:** Não foram encontrados relatos até o momento.

#### 5.4.6 Gênero *Papiliotrema* (*Cryptococcus*)

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 26S rRNA(D1/D2) das leveduras isoladas, foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 100 % entre o isolado 51 com levedura *Papiliotrema* (*Cryptococcus*) *laurentii* (gb|AY315663.1) (Figura 23). Na árvore filogenética construída a partir das sequências de ITS rRNA das leveduras isoladas o isolado 51 se manteve agrupado com a levedura *Papiliotrema* (*Cryptococcus*) *laurentii* (gb|FN428903.1) (Figura 24).

**Taxonomia:** Domínio Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Tremellomycetes, Ordem Tremellales, Família Tremellaceae, Gênero *Cryptococcus* (BOLD, 2017).

**Morfologia e características de cultura:** As células são esferoidais, ovais ou alongadas. A reprodução é por brotamento polar ou multilateral. Podem desenvolver hifas verdadeiras ou pseudohifas. Não são formados ascósporos, balistosporos e balistoconídio. A cor da colônia em meio sólido pode ser branca ou creme e algumas linhagens produzem pigmentos vermelho, amarelo ou marrom. Todas as espécies produzem D-glucoronato e a maioria das espécies sintetizam amido. As espécies que não sintetizam amido, utilizam inositol, uma combinação que as distingue de *Rhodotorula* sp. Não possui habilidade fermentativa. Xilose está presente em hidrolisados de células. Reações de Diazonium Blue B e urease são positivas. Coenzimas Q-9 e Q-10 estão presentes. Algumas espécies são estados anamórficos de *Filobasidium*, *Filobasidiella*, *Cystofilobasidium*, e gêneros telemórficos em Tremellales e Filobasidiales (J.W. FELL; STATZELL-TALLMAN, 1998).

**Ecologia:** A maioria das espécies de *Cryptococcus* vive no solo e não é prejudicial para os seres humanos. Entre as espécies muito comuns incluem *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus*. Trindade et al (2002) relatou que *Cr. laurentii* foi uma das leveduras mais isoladas em frutas (pitanga (*Eugenia uniflora*), mangaba (*Hancornia speciosa*), umbu (*Spondia tuberosa*) e acerola (*Malpighia glaba*) coletadas em pequenas fazendas no Nordeste

do Brasil (TRINDADE et al., 2002). Além disso, *Cryptococcus humicola* possui atividade antibiótica por seus glicolípidos extracelulares (ROSA; GÁBOR, 2006). *Cr. laurentii* também foi isolada de flores e nectários extraflorais em floresta tropical atlântica (MORAIS; PAGNOCCA; ROSA, 2006).

**Patogenicidade:** De todas as espécies, *Cryptococcus neoformans* é o principal agente patógeno humano e animal. No entanto, *Cryptococcus laurentii* e *Cryptococcus albidus* têm sido ocasionalmente relatadas em doenças moderadas a graves, como meningite específica em pacientes humanos com imunidade comprometida (CHENG et al., 2001; RAGUPATHI; REYNA, 2015).

**Resistência à antimicrobianos:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** Não foram encontrados relatos até o momento.

**Potencial biotecnológico:** Não foram encontrados relatos até o momento.

#### 5.4.7 Gênero *Pseudozyma*

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de 26S rRNA(D1/D2) das leveduras isoladas foi possível observar um agrupamento filogenético com *bootstrap* de 100 % entre os isolados 8, 9, 10, 12, 13, 14, 46, 50 e 53 com leveduras *P. hubeiensis* (gb|DQ008953.1), *P. parantarctica* (gb|AB089357.1) e *P. antarctica* (gb|AHJ235302.1) (Figura 23). Na árvore filogenética construída a partir das sequências de ITS rRNA das leveduras isoladas o agrupamento citado para 26S rRNA foi mantido. Além disso, estes isolados ficaram agrupados por espécie com *bootstrap* de 98 % para os isolados 8, 12, 12 e 14 com *P. antarctica* (gb|AY641557.1), com *bootstrap* de 93 % para os isolados 50 e 53 com *P. hubeiensis* (gb|DQ008954.1) e com *bootstrap* de 92 % para os isolados 9 e 10 com *P. parantarctica* (gb|JN942471.1) (Figura 24).

**Taxonomia:** Domínio Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Ustilaginomycetes, Ordem Ustilaginales, Família: Ustilaginaceae, gênero: *Pseudozyma* (IMA: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION, 2016; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

**Morfologia/características de cultura:** As células dessas leveduras têm forma variável, ovóide, elipsoidal ou cilíndrica. Ocorrem hifas geralmente com retração do septo e com o citoplasma de células separadas por células lisadas; blastoconídios fusiforme ocorrem em denticles semelhantes a esterigma e podem formar um micélio aéreo constituído por cadeias ramificadas, acropetal de conídios; chlamidiosporo podem estar presentes, mas ballistoconidia

estão ausentes. As colônias são esbranquiçadas, rosadas, laranjadas ou amarelo amarronzadas. Usualmente dimórficas com parte central leveduriforme com margem de franjas com hifas. Um micélio aéreo fino está geralmente presente, o qual vai em direção às margens e pode se tornar agrupado (BOEKHOUT; FELL, 1998).

**Ecologia:** As espécies do gênero são frequentemente isoladas a partir de materiais vegetais ou secreções de insetos. Além disso, *Pseudozyma flocculosa* (CHENG et al., 2003), *P. fusiformata* (GOLUBEV et al., 2001) possuem atividade antibiótica por seus glicolípidos extracelulares (ROSA; GÁBOR, 2006). Trindade et al. (2002) relatou que *Pseudozyma antarctica* foi uma das leveduras mais isoladas em frutas (pitanga (*Eugenia uniflora*), mangaba (*Hancornia speciosa*), umbu (*Spondia tuberosa*) e acerola (*Malpighia glaba*)) coletadas em pequenas fazendas no Nordeste do Brasil (TRINDADE et al., 2002). *P. brasiliensis* foi isolada do trato intestinal de uma praga de insetos de raízes de cana-de-açúcar em Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Brasil e representa uma nova espécie do gênero *Pseudozyma* com base em análises moleculares do rDNA D1 / D2 e as regiões ITS1 + ITS2 (OLIVEIRA et al., 2014). *P. brasiliensis* produz uma endo-1,4-xilanase que tem uma atividade específica mais elevada em comparação com outras xilanases eucarióticas.

**Patogenicidade:** Não foram encontrados registros até o momento.

**Resistência à antimicrobianos:** Foram isoladas três cepas de *Pseudozyma* a partir de sangue de pacientes na Tailândia . Enquanto um isolado foi identificado como *P. antarctica* por análise de sequência de rDNA, os outros dois foram considerados novas espécies e foram denominados *P. parantarctica* e *P. thailandica*. Ambos isolados são resistentes à 5-flucitosina e *P. thailandica* também foi resistente ao fluconazol e itraconazol. Segundo os autores foi o primeiro isolamento de cepas *Pseudozyma* de seres humanos (SUGITA et al., 2003).

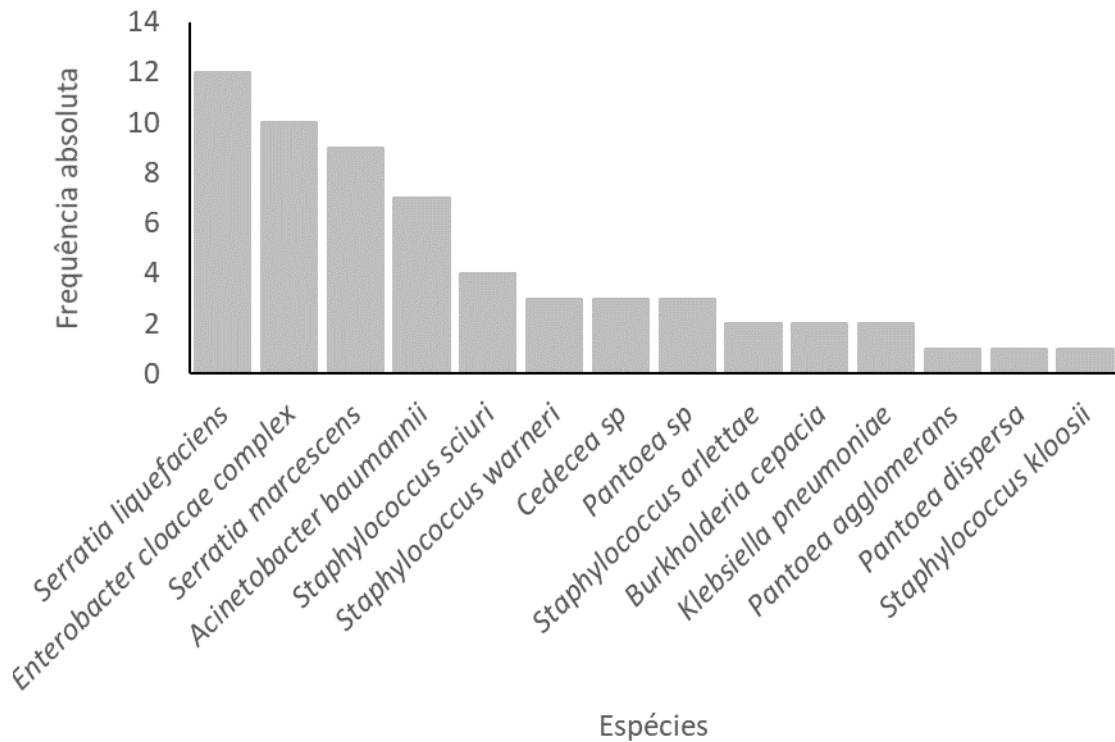
**Caracterização do gênero para o controle de malária por paratransgênese:** Não foram encontrados registros até o momento.

**Potencial biotecnológico:** Esta enzima possui uma variedade de aplicações industriais, indicando o grande potencial biotecnológico de *P. brasiliensis*. *P. hubeiensis* produz uma lipase e foi sugerida para biocatalise de biodiesel (ROSA, 2015). *P. parantarctica* CHC28 foi utilizada para produção de biodiesel (AREESIRISUK et al., 2015)

## 5.5 ESTIMATIVA DE RIQUEZA E DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS CULTIVÁVEIS COLETADAS NAS FEZES DE *Anopheles darlingi*

A distribuição das espécies identificadas em função da frequência das bactérias sugere a existência de três grupos: um grupo frequente, composto por *Enterobacter cloacae* complex e *Serratia marcescens*; um grupo intermediário, composto por *Acinetobacter* sp e *Serratia liquefaciens* e, enfim, um grupo pouco frequente, com as demais espécies (Figura 27).

**Figura 27- Distribuição de frequência das espécies de bactérias coletadas em fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* oriundos de Porto Velho,**



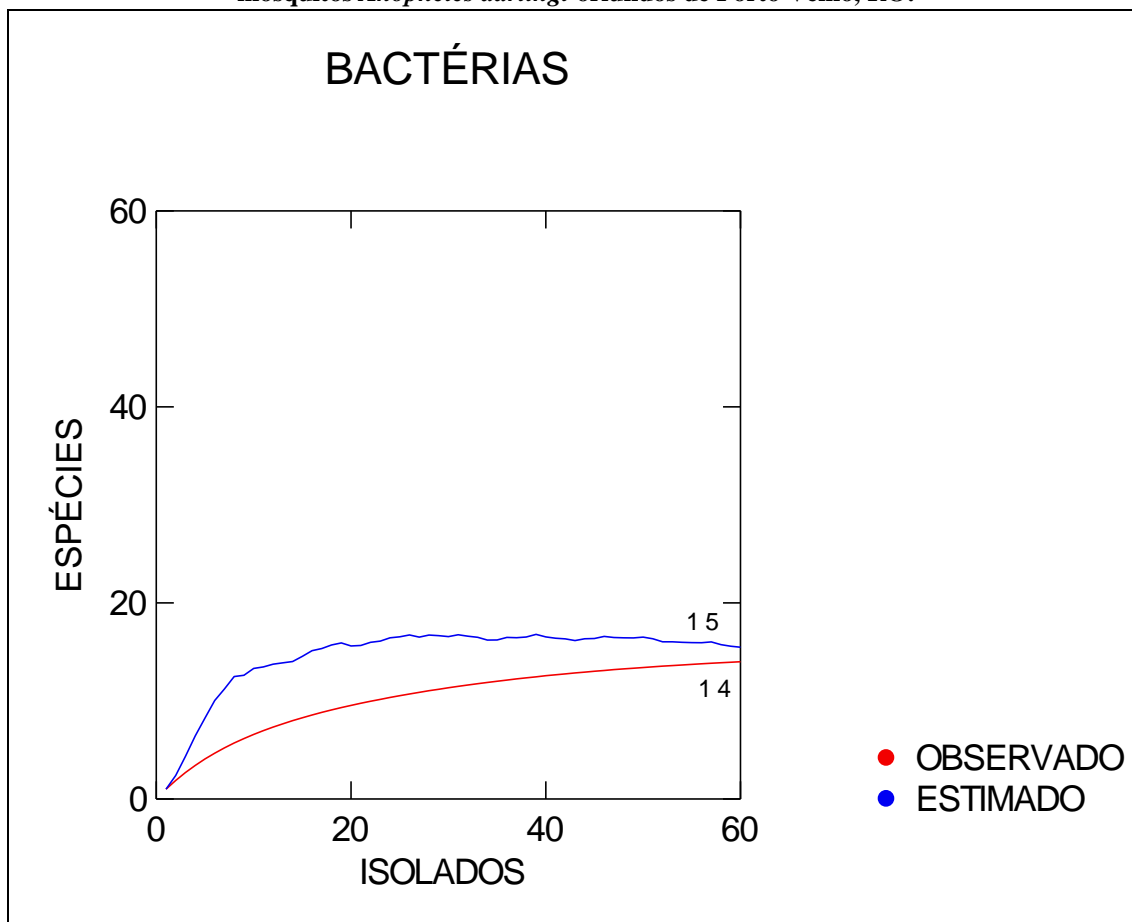
**RO.**

**Conjunto de colônias amostrado (N=60).**

Para bactérias, foram identificadas 14 espécies em 60 colônias de bactérias amostradas. A riqueza de bactérias estimada para o esforço amostral empregado neste trabalho foi de 15 espécies e a riqueza observada foi de 14 espécies. Com base nos resultados da curva de rarefação Chao 2 (Figura 28) é possível afirmar que as bactérias mais frequentes e que sobrevivem dentro do intervalo de nicho ecológico observado foram amostradas.



**Figura 28- Curva de rarefação para estimativa da riqueza de espécies de bactérias coletadas em fezes de mosquitos *Anopheles darlingi* oriundos de Porto Velho, RO.**



Foram empregadas 1000 rondonizações e a função Chao 2. N=60 colônias analisadas. Em azul, espécies estimadas. Em vermelho, espécies observadas. As análises foram realizadas no programa Estimate S (COLWELL, R., 2013).

A comparação entre as estimativas da riqueza de bactérias deste trabalho com as apresentadas por Rani et al (2009), desenvolvida para *An. stephensi*, e de Chandler et al. (2012), para *Drosophila* sp, não atende a todas as premissas exigidas pelo método (CHANDLER; EISEN; KOPP, 2012; RANI et al., 2009). Cada estudo focou-se num hospedeiro diferente, os métodos de identificação de espécies não são compartilhados e, também, as técnicas de amostragem são diferentes. Mesmo assim, na tentativa de ilustrar o potencial uso do método desenvolvido, fizemos a comparação entre os resultados dos estudos.

Ao observarmos as três curvas de rarefação citadas, para o intervalo aproximado de 50 a 55 amostras analisadas (indivíduos ou colônias ou OTUs), observa-se que os valores de riqueza de espécies de bactérias estão dispostos em um intervalo de 15 a 30 espécies para Rani et al (2009) (Figura 29); três a 25 para Chandler et al (2012 e 2013) (Figura 30) e de 14 espécies para o estudo aqui reportado. Logo, os valores estimados para a riqueza de bactérias

associadas a *An. darlingi* na Amazônia são intermediários aos observados para *Drosophila* sp e *An. stephensi*.

Figura 29- Curva de rarefação mostrando a riqueza de bactérias encontradas por Rani et al (2009) para *An. stephensi*.

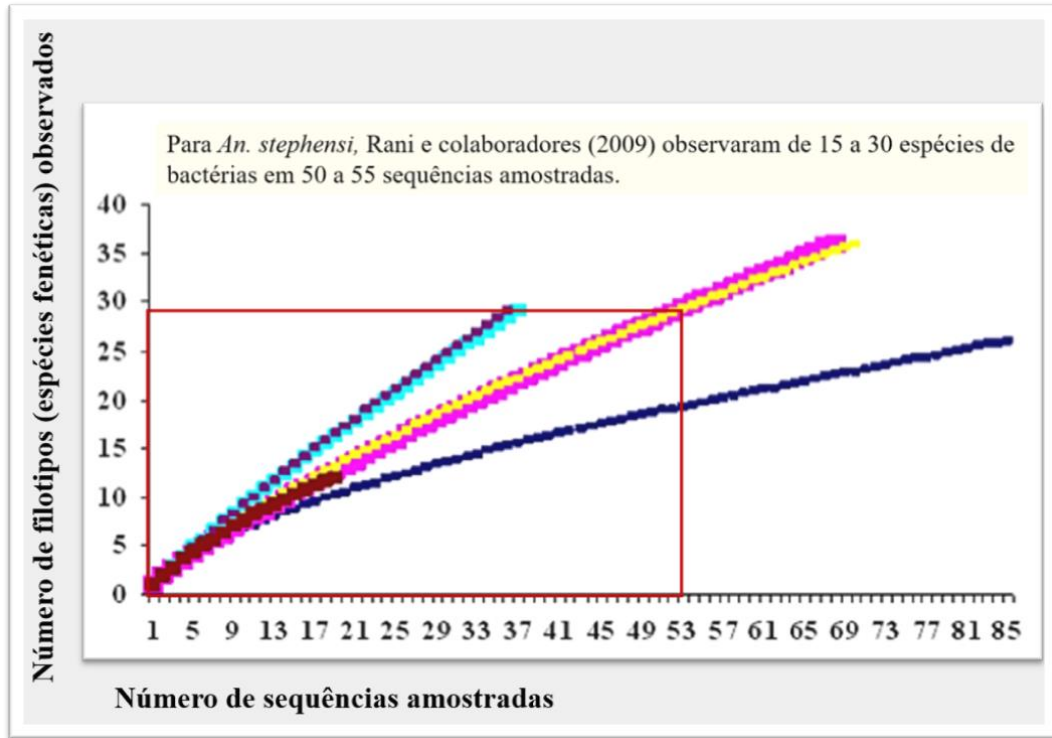


Figura adaptada de Rani et al (2009).

Figura 30- Curva de rarefação mostrando a riqueza de bactérias encontradas por Chandler et al (2012) para *Drosophila* sp.

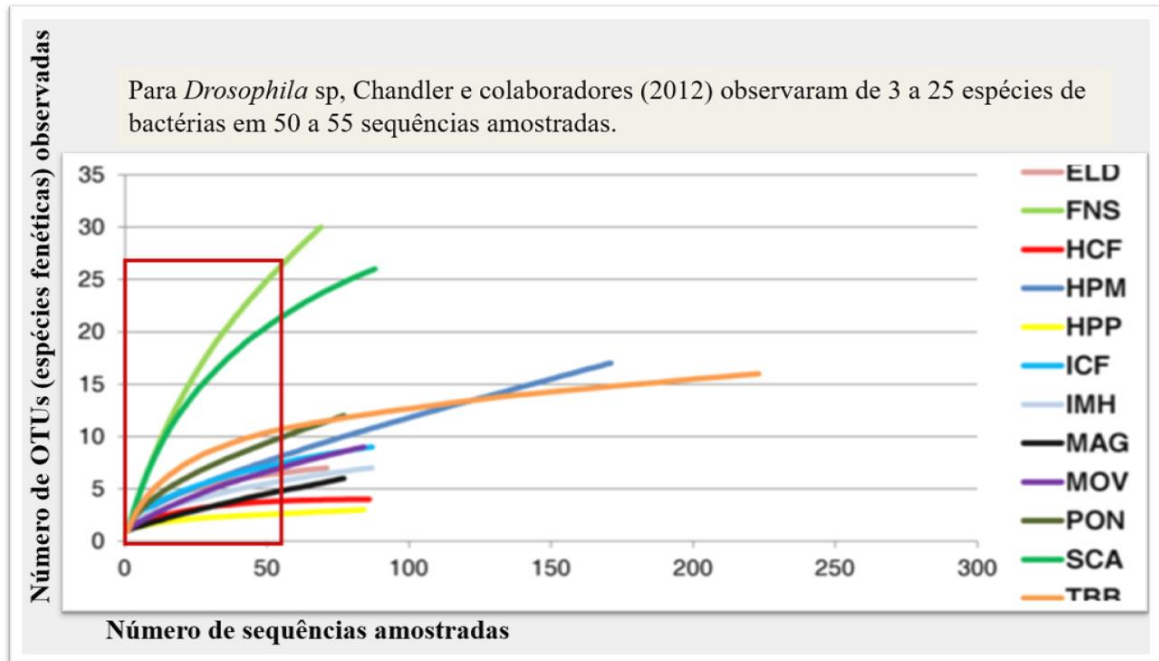
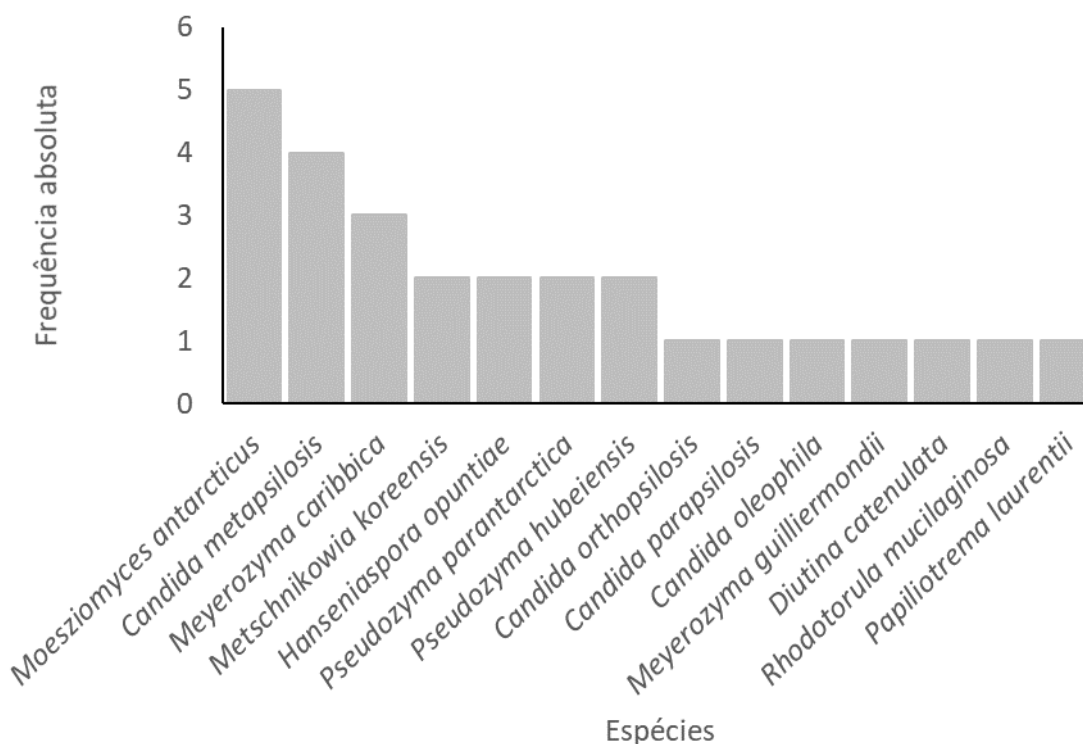


Figura adaptada de Chandlet et al (2012).

Destaca-se que os dois estudos empregaram a técnica usual de dissecação de intestino, enquanto neste trabalho optou-se por amostrar as fezes dos mosquitos. Também é importante enfatizar que para isolar as bactérias, Rani e colaboradores (2009) utilizaram o mesmo meio de cultura e a mesma temperatura utilizada no presente trabalho.

Para leveduras, foram identificadas 14 espécies em 27 colônias de levedura amostradas. As espécies mais frequentes foram *Moesziomyces antarcticus*, *Candida metapsilosis* e *Meyerozyma caribbica* (Figura 31).

**Figura 31 - Distribuição de frequência das espécies de leveduras coletadas em fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* coletadas em de Porto Velho, RO.**

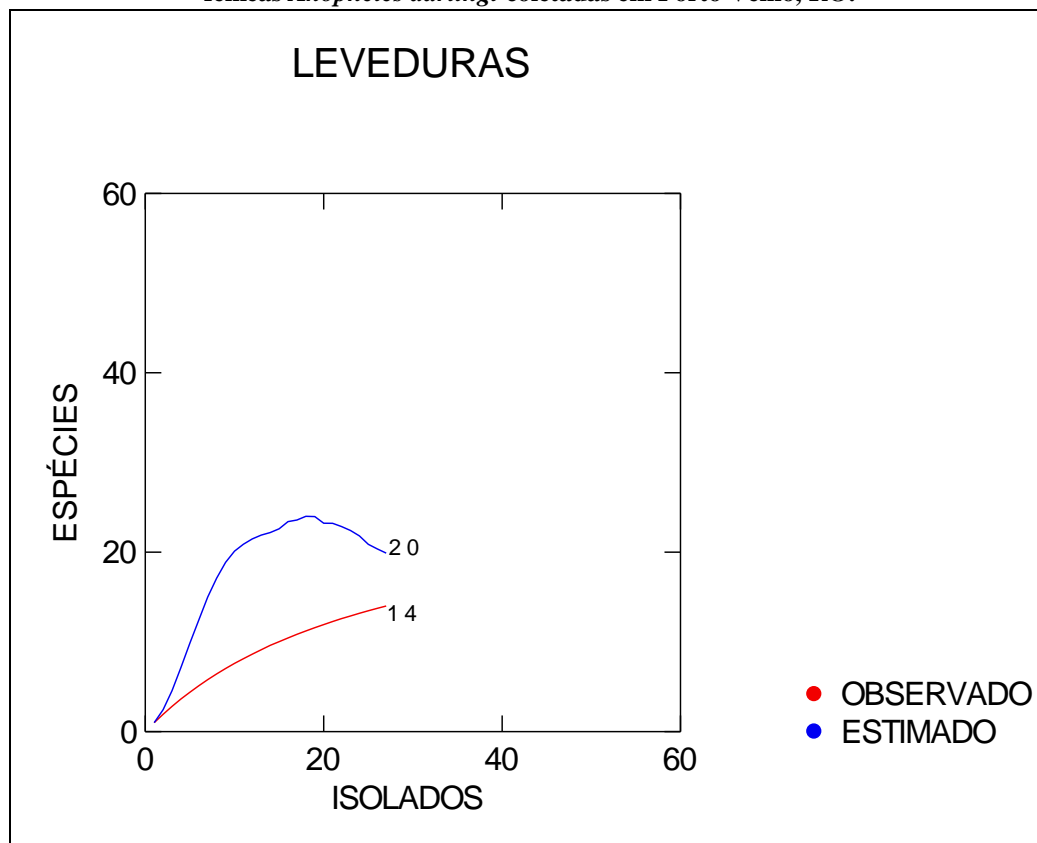


**Conjunto de colônias amostradas (N=60).**

A distribuição das espécies identificadas, até o momento, em função da frequência, sugere a ausência de espécies frequentes, pois entre as registradas nenhuma apresentou uma frequência superior a 10% dentro das amostras estudadas. Foi triado efetivamente menos de 50% das amostras coletadas. Portanto, é razoável esperar o registro de outras espécies conforme o processo de identificação avançar.

A riqueza de leveduras estimada para o esforço amostral empregado neste trabalho foi de 20 espécies e a riqueza observada foi de 14 espécies (Figura 32).

**Figura 32 - Curva de rarefação para estimativa da riqueza de espécies de leveduras coletadas em fezes de fêmeas *Anopheles darlingi* coletadas em Porto Velho, RO.**



Foram empregadas 1000 randomizações e a função Chao 2. N=27 colônias analisadas. Em azul, espécies estimadas. Em vermelho, espécies observadas. A análise foi realizada no programa EstimateS (COLWELL, R., 2013).

Considerando a riqueza de espécies identificadas no conjunto de dados (N=14 espécies), o modelo de estimativa de riqueza indicou uma menor diversidade de espécies observadas, pois o modelo matemático sugere a observação de 20 espécies em 27 colônias de leveduras (Figura 32). Isso aconteceu porque a maioria das espécies registradas apresentarem pouca frequência (*uniques* e *duplicates*) (Figura 31).

O problema em relação à identificação das leveduras foi que 33 isolados não amplificaram a PCR para as regiões 26S e ITS. As reações de PCR foram repetidas para todos os isolados utilizando enzima polimerase de alta fidelidade com ambos marcadores e não houve amplificação nas repetições. A não amplificação dos produtos de PCRs para mais da metade dos isolados pode estar relacionada a algum erro de execução nos protocolos iniciais de processamento das amostras, possivelmente durante a extração de DNA com fenol-clorofórmio. Esta hipótese foi levantada por três motivos: 1) Quando não ocorreu a

amplificação para a sequência 26S rRNA, também não ocorreu para a sequência ITS; 2) Todas as PCRs foram repetidas utilizando enzima polimerase de alta fidelidade e não amplificaram novamente; 3) Utilizando um mesmo mix para PCRs alguns isolados amplificaram e outros não. Logo, as reações de PCR falharam para os mesmos isolados, e estes podem apresentar um DNA de baixa qualidade.

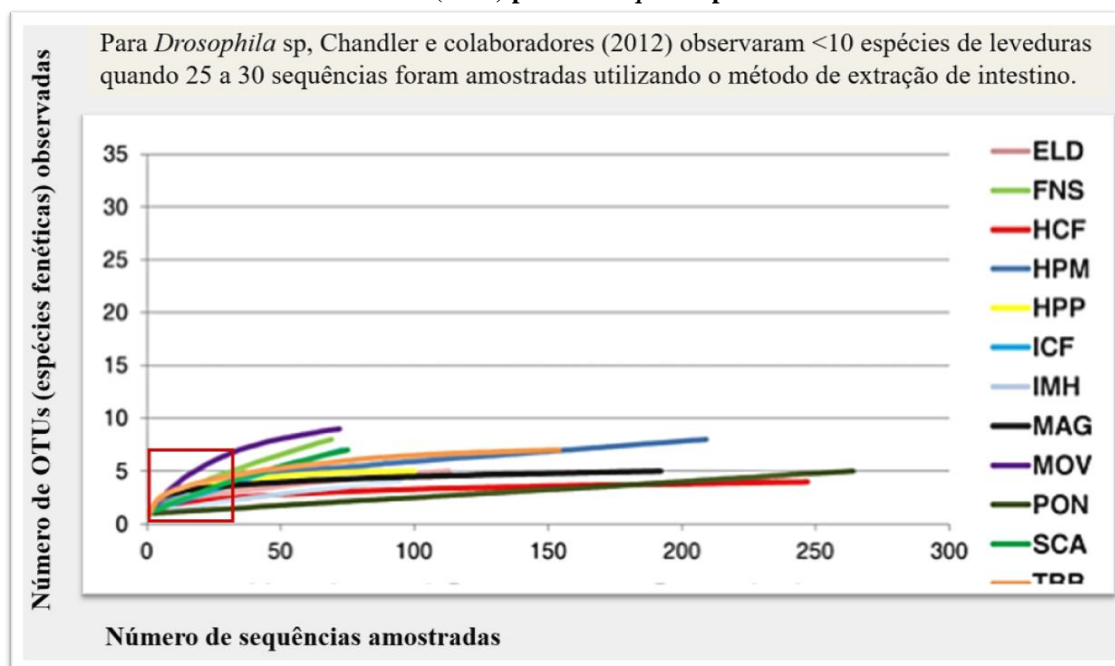
Como a extração de DNA é feita individualmente para cada isolado considera-se ter ocorrido erros neste processamento. Poderá ser realizada nova extração de DNA para os isolados que não amplificaram na PCR utilizando Kits comerciais para extração de DNA genômico. E posteriormente, com as novas amostras de DNA, repetir as PCRs para ambas regiões do rDNA das leveduras. Talvez componentes presentes nos DNAs extraídos tenham atrapalhado as reações de PCR. Destaca-se que todas as 60 extrações de DNA genômico foram quantificadas detectando altas concentrações de DNA.

Quando se compara a diversidade de leveduras encontrada nesse estudo com a diversidade de leveduras apresentada por Chandler et al (2012), para *Drosophila* sp, constata-se que a riqueza de leveduras descrita aqui, para *An. darlingi*, é maior que a observada no estudo equivalente. Pois, no presente trabalho, para 27 amostras analisadas, observou-se que uma riqueza de 14 espécies. Isso é superior ao relatado no modelo desenvolvido por Chandler et al (2012), que para o número de amostras equivalente, indica uma riqueza menor que 10 espécies (Figura 33) (CHANDLER; EISEN; KOPP, 2012).

O desafio ao desenvolvimento desse estudo reside justamente na identificação das espécies. Assim, o número de espécies registradas deve ser valorizado. Microrganismos são majoritariamente descritos e conhecidos por serem patogênicos. No entanto, aqui, estamos descrevendo a biodiversidade de microrganismos ambientais de insetos coletados na Amazônia, um componente inegavelmente pouco conhecido desse ecossistema.

Mensurar a riqueza em espécies de um determinado grupo taxonômico em um determinado local não é simples, pois resultados de diferentes estudos dificilmente podem ser comparados devido aos diferentes métodos de coleta e diferentes esforços de amostragem. Para sanar este problema é indicado o uso de métodos de estimativa de riqueza a partir de dados amostrais. Porém, é fundamental que diferentes protocolos de coleta e de análises de dados sejam desenvolvidos e testados. Um dos métodos adequados para obtenção de informação acerca da riqueza de espécies de uma dada comunidade são as curvas de rarefação (SANTOS, 2003). Essa abordagem, na última década, tem sido recentemente replicada por pesquisadores interessados na riqueza de espécies de microrganismos associados à insetos (CHANDLER; EISEN; KOPP, 2012; HUGHES et al., 2001; RANI et al., 2009).

**Figura 33- Curva de rarefação mostrando a riqueza de espécies de leveduras encontradas por Chandler et al (2012) para *Drosophila* sp.**



**Figura adaptada de Chandler et al (2012). A análise foi realizada utilizando Chao 1.**

Para se analisar quanto os resultados se aproximam da riqueza real da comunidade, é importante delimitar o universo amostral do inventário. Estimativas calculadas se referem apenas a informações do habitat amostrado, e não se referem ao ambiente como um todo. Portanto, o universo amostral do inventario inclui apenas os indivíduos dessas categorias, presentes no local durante a amostragem. É difícil avaliar se a riqueza estimada por um método é igual a riqueza real, uma vez que é muito difícil, senão impossível, coletar todas as espécies de um determinado grupo em um local. Se isso fosse simples, os métodos de estimativa não seriam necessários (SANTOS, 2003).

Hughes e colaboradores (2001) sugeriram quatro diferentes métodos para a estimar a riqueza de espécies de microrganismos ambientais para um conjunto de amostras de um ecossistema ou habitat (HUGHES et al., 2001). Eles indicaram que as curvas de rarefação são adequadas para esse objetivo e, ainda, sugerem a adoção da Função Chao 1 para o desenvolvimento de curvas de rarefação para a determinação de suficiência amostral. E, de fato, esse método tem sido empregado no estudo de bactérias e leveduras ambientais (CHANDLER; EISEN; KOPP, 2012; RANI et al., 2009). Contudo, com base nos argumentos apresentados por GOTELLI & COLWELL (2010), optou-se pelo uso da Função Chao 2, desenvolvida para um conjunto de dados que traga exclusivamente dados de ocorrência (GOTELLI; COLWELL, 2010).

É importante observar que o método de coleta de colônias de bactérias e de leveduras previamente descrito informa apenas a presença das espécies de microrganismos associados ao trato digestório de *An. darlingi* e, ainda, a frequência com a qual ela foi registrada em placas de Petri. Assim, o método de coleta de colônias não permite estimar a abundância (nº de microrganismo no trato digestório de *An. darlingi*) ou densidade (UFC/ $\mu$ L) de microrganismos no trato digestório do mosquito.

A utilização de Chao 2 visou tornar os resultados obtidos comparáveis aos demais, observando o delineamento e esforço amostral, além de indicar se o aumento do esforço amostral significa necessariamente o incremento de novas espécies. Destaca-se que existem provavelmente outras espécies raras (densidade populacional muito pequena), infrequentes (eventualmente colonizam o trato digestório dos mosquitos, por estarem limitadas no espaço - habitat) ou de difícil recuperação pelo método de coleta empregado (as condições e recursos utilizados são limitantes à sobrevivência). Ou seja, mostrou-se um retrato da comunidade de bactérias associadas a *An. darlingi* para as regiões de coleta dos mosquitos em Porto Velho, considerando o meio de cultura empregado. Contudo indicamos que estudos futuros devem ser realizados para entender melhor a relação do mosquito com o microbioma.

## **5.6 SOBRE A UTILIZAÇÃO DOS BANCOS DE DADOS E CLASSIFICADORES TAXONÔMICOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO**

Tendo em vista que a classificação molecular é baseada na comparação da sequência de interesse com sequências disponíveis em bancos de dados é importante que as sequências comparativas sejam confiáveis. Segundo Prosdocimi e colaboradores (2007), para a obtenção de uma boa sequência consenso a etapa de curadoria das sequências é mais importante que réplicas de sequenciamento. Muitas réplicas têm alto custo e pouco resultado na resolução da montagem da sequência consenso. A qualidade das bases das sequências mostradas, por exemplo, pelos cromatogramas é mais importante (PROSDOCIMI et al., 2007).

Considerando os erros de *base-calling* como eventos raros, o re-sequenciamento da mesma molécula e a montagem dos *reads* produzidos são frequentemente consideradas como uma boa maneira de gerar sequências confiáveis. Prosdocimi e colaboradores (2007) examinaram como o número de *reads* re-sequenciados e os parâmetros de corte PHRED afetam a precisão e o tamanho das sequências consenso final. Parâmetros de corte de PHRED rigorosos mostraram-se eficientes para a redução de erros, no entanto, esse procedimento também diminuiu o tamanho das sequências consenso. Além disso, o re-sequenciamento não

teve um efeito claro na remoção de erros de consenso, embora tenha sido capaz de aumentar ligeiramente o consenso (PROSDOCIMI et al., 2007).

Neste trabalho foi utilizado PHRED de 30 e de quatro a seis *reads* para a montagem da sequência consenso, fato que gerou sequências consenso de alta qualidade, mas que acarretou na diminuição do tamanho da extensão das sequências consenso. Quando tratamos da identificação de organismos a diminuição das sequências consenso pode representar uma perda de informação sobre a variabilidade genética do organismo. Por outro lado, para identificação taxonômica de organismos não é interessante ter sequências maiores, logo com maior possibilidade de apresentar uma maior variabilidade genética (fato que seria favorável para a distinção entre espécies), se estas sequências variáveis não forem confiáveis. Sequências incorretas podem induzir a identificações incorretas.

É importante ressaltar que o re-sequenciamento das mesmas sequências nas mesmas regiões, pouco influenciam o aumento do tamanho das sequências consenso, pois levando em consideração o fato que todas as leituras começam a alguma distância do iniciador (PROSDOCIMI; ORTEGA, 2005) e, progressivamente, perdem qualidade à medida que se afastam da posição inicial, isso resultaria situações em que uma borda de baixa qualidade de um único *read* representa a qualidade do consenso, mesmo que 10 sequências tenham sido montadas. No entanto, a produção de um maior número de *reads* da mesma molécula em uma única direção, pode não eliminar erros de consenso, mas é eficiente para ampliar ligeiramente o tamanho da sequência montada resultante. Para a obtenção de sequências consenso maiores com alta qualidade ao invés de re-sequenciar a mesma sequência poderiam ser desenhados iniciadores para regiões adjacentes e assim enriquecer a montagem da sequência consenso final. A escolha dos processamentos dos *reads* para a montagem da sequência consenso deve ser avaliada com cautela pois afetam o tamanho e a qualidade das sequências consenso.

Segundo Prosdocimi e colaboradores (2007) em geral, sequências de alta qualidade podem ser obtidas com dois *reads* (PHRED 20) quando o tamanho não é uma restrição e o objetivo é fornecer ao operador informações seguras sobre uma parte específica da leitura (PROSDOCIMI et al., 2007).

Em relação aos bancos de dados é possível haver sequências similares à sequência de estudo, pode não haver sequências similares e ainda pode existir sequências similares que foram classificadas equivocadamente, isto é, sem curadoria, e mesmo assim estar disponíveis nos bancos de dados. Portanto, os agrupamentos realizados utilizando técnicas de filogenética molecular podem ser decisivos para uma inferência taxonômica mais robusta e podem, por exemplo, ser utilizadas para detectar sequências que foram depositadas em bancos de dados



com classificações taxonômicas erradas. Sequências discrepantes podem ser reveladas por inconsistências nas análises dos agrupamentos das árvores filogenéticas. Este é um dos cuidados necessários quando fazemos a identificação molecular, pois ainda há muitas informações de sequências depositadas em bancos de dados sem curadoria.

Uma árvore filogenética pode ser utilizada como um modelo de representação de uma hipótese. Deve ser utilizada para fortalecer os argumentos de sua hipótese, seja ela de caráter evolutivo ou simplesmente de agrupamentos por similaridades de sequências. Embora as sequências consenso obtidas tiveram similaridade superiores a 97% quando comparadas a sequências disponíveis em bancos de dados, foram selecionadas várias sequências do GenBank e outros banco de dados para confirmar a posição de cada isolado utilizando filogenia. Foram então realizadas construções de árvores filogenéticas utilizando o Software MEGA7. Conforme mostrado nas figuras 17 e 23, 24, 25 e 26, as árvores filogenéticas das sequências de rRNA de 16S, ITS e rRNA de 26S respectivamente, indicam que os isolados compartilham um agrupamento no ramo terminal de cada árvore (clado). Portanto, os isolados foram identificados conforme ficaram agrupados nos ramos terminais das árvores apresentadas.

É importante relatar que para classificadores automatizados como o “RDP classifier” diferentes montagens das sequências consenso foram relevantes, tanto na alteração do táxon resultante da comparação, quanto na porcentagem de confiança da classificação. Sequências curadas com eliminação das sequências dos iniciadores, que são inseridos durante a PCR e remoção das bases nucleotídicas com baixa qualidade (foram removidas bases nas extremidades 3’ e 5’ com qualidade phred inferior a 30) influenciam notavelmente a taxonomia obtida. Porém, neste estudo, dezenas de árvores foram construídas (dados não mostrados) e diferentes sequências de referência foram utilizadas. E independente das sequências consenso utilizadas estarem curadas ou não, e das sequências de referência pertencentes a bancos de dados curados ou não, a estrutura dos agrupamentos nos ramos terminais das árvores foi mantida.

Enfim, utilizar softwares de classificadores taxonômicos automatizados como RDP e refseq\_rna do BLASTN, juntamente com análises filogenéticas foi uma combinação de sucesso para identificar e classificar microrganismos a partir de sequências nucleotídicas.

Os bancos de dados contendo sequências curadas são atualizados em tempos diferentes. O RDP, por exemplo, é um banco de dados que atualizou suas sequências para 16S rRNA de bactérias pela última vez em 30 de setembro de 2016. Disponibilizando 3,4 milhões de sequências de 16S rRNAs de bactérias e 125 mil sequências de 28S rRNAs de fungos,

quase 9 mil sequências de ITS de fungos no Warcup v2 (atualizado em junho de 2016) (DESHPANDE et al., 2016) e 20 mil sequências no UNITE. É importante destacar que entre os banco de dados de ITS do RDP, apesar do UNITE ter mais sequências disponíveis, WARCUP mostrou-se mais preciso (WANG, QIONG; COLE, 2014).

Porém, para sequências ITS de fungos a última atualização foi em 01 de julho de 2014, com a incorporação no banco de dados do "*New Warcup Fungal ITS training set*". Porém, de 2014 até a presente data, em 2017, são três anos sem atualização. E neste período, outros bancos de dados estão mais atualizados para sequências de ITS

O banco de dados BOLDSYSTEM para ITS utiliza o algoritmo BLAST para a identificação. Apesar de haver poucos registros de ITS em BOLDSYSTEM, a forma de organização dos dados disponíveis facilita a utilização pelo usuário.

Apesar do NCBI-BLAST não ser um banco de dados integralmente curado, o fato de ser constantemente atualizado é o principal atrativo para sua utilização. Mas, é imprescindível ter critérios para a seleção das sequências que serão utilizadas para a comparação com as sequências em estudo. E aos poucos, BLAST implementa ferramentas com banco de dados curados como o NCBI *reference sequences* (RefSeq) (PRUITT; TATUSOVA; MAGLOTT, 2007). Apesar desses bancos de dados curados serem muito menores, são relevantes para a realização de comparações para classificações taxonômicas.

O MycoBank é uma base de dados on-line, de propriedade da *International Mycological Association* e é destinada a servir a comunidade micológica e científica, documentando novidades de nomenclatura (novos nomes e combinações) e dados associados, por exemplo, descrições e ilustrações. São propostos os alinhamentos de sequências parciais e as identificações polifásicas de fungos e leveduras contra bases de dados de referências com curadoria. A base de dados MycoBank utiliza o software BioMICSNet, produto da BIOAWARE, que facilitou o desempenho das identificações polifásicas on-line desde a primeira versão produzida em 1999. A última atualização do banco de dados foi em 16 de abril de 2017 com 365.920 espécies de fungos. A atual versão on-line do software também facilita a produção de árvores fenéticas (<http://www.mycobank.org/defaultinfo.aspx?Page=Stats>), acessado em 07 de setembro de 2017). Outros bancos de dados consultados neste trabalho também utilizam o software BioMICSNet, tais como INSTITUT PASTEUR FUNGIBANK e CBS.

São necessárias iniciativas para alimentar e interligar os bancos de dados, pois a falta de informações e a ocorrência de informações divergentes dificulta o trabalho do usuário (HIRAOKA; YANG; IWASAKI, 2016). Assim, foram depositadas no GenBank as

sequências produzidas neste trabalho que apresentaram similaridades superiores a 97% quando comparadas com sequências depositadas em banco de dados de referência.

Por fim, é fundamental pesquisar em diferentes bancos de dados para procurar sequências mais similares às de interesse, utilizar critérios para a seleção de sequências, observar atentamente indícios de taxonomias erradas e utilizar ferramentas que auxiliem avaliar as similaridades dos agrupamentos taxonômicos, utilizando a filogenia molecular por exemplo.

## 5.7 SELEÇÃO DE CANDIDATOS A PARATRANSGÊNESE E ENSAIOS PARA MANIPULAÇÃO GENÉTICA

Dois gêneros de bactéria foram selecionadas como candidatas a paratransgênese: *Pantoea* e *Serratia* (Tabela 7). As outras bactérias foram descartadas por terem relatos de patogenicidade bem estabelecido e de resistência intrínseca a antimicrobianos ((CLSI), 2017), conforme citado neste trabalho no item caracterização dos gêneros bacterianos. Estas bactérias tiveram fácil crescimento fora do trato digestório dos mosquitos em condições laboratoriais aeróbicas a 37°C em meio LB ágar e meio Ágar Nutriente, fato que facilita manipulações futuras que exijam cultivo. É importante que um candidato a paratransgênese cresça bem em aerobiose pelo fato do propósito em disseminar o paratransgênico no meio ambiente, que é aeróbico. Além disso, outros autores já sugeriram bactérias desses gêneros para realizar paratransgênese, inclusive mostrando modelos de paratransgênese como provas de conceito (WANG et al., 2012, 2017).

A utilização de bactérias para o uso em paratransgênese em *Anopheles* apresenta como vantagem o fato de comunidades de bactérias aumentarem após ingestão de alimentação sanguínea, fato que pode ser vantajoso para a utilização de bactérias para expor ou secretar moléculas anti-*Plasmodium* (PUMPUNI C. B., BEIER M.S., NATARO J.P., GUERS L.D., 1993). Além disso, foi relatado que bactérias Gram-negativas reduzem a infecção de *An. stephensi* por *P. falciparum* (PUMPUNI C. B., BEIER M.S., NATARO J.P., GUERS L.D., 1993). Em *Culex pipiens*, bactérias Gram-negativas são aumentadas significativamente após a alimentação com sangue quando comparadas às bacterias detectadas durante a alimentação com açúcar (ZAYED; BREAM, 2004).

Dentre os 8 gêneros de bactérias isoladas neste trabalho apenas *Staphylococcus* é Gram-positiva. Bactérias Gram-negativas do gênero *Pantoea* e *Serratia*, como as isoladas

neste trabalho, foram isoladas de outros *Anopheles* e foram consideradas para realização de paratransgênese no controle da malária (BISI; LAMPE, 2011; DJADID et al., 2011; WANG et al., 2012). *Pantoea* é considerada um simbiote natural de mosquitos. Podem colonizar várias espécies de mosquitos e é facilmente transformada e cultivada. Assim, *Pantoea* tem sido proposta para aplicações em paratransgênese (BISI; LAMPE, 2011; DJADID et al., 2011). *Serratia marcescens* HB3 inibe o desenvolvimento do *Plasmodium* dentro do intestino médio do mosquito *An. stephensi* interrompendo a invasão do oocineto através das células epiteliais do intestino médio. Os autores do estudo observaram que *S. marcescens* cepa HB3 deve ser introduzida de maneira contínua ao vetor para exercer esta ação. Isso indica que podem existir fatores de estresse ativos, tais como imunidade inata, que modulam a dinâmica das populações de *Serratia* dentro do ambiente fechado do intestino médio do mosquito (BANDO et al., 2013).

Quanto as leveduras, cinco espécies foram selecionadas como candidatas a paratransgênese: *Meyerozyma* (= *Pichia*) *caribbica*, *Metschnikowia koreensis*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida oleophila* e *Pseudozyma hubeiensis* (Tabela 7). Estas leveduras não são patogênicas e são amplamente encontradas associadas a néctar e frutos. *Metschnikowia* e *Hanseniaspora* são utilizadas na produção de bebidas e chocolates. *Meyerozyma* (*Pichia*) vem sendo sugerida para utilização em paratransgênese e *Pseudozyma* está sendo estudada para a produção de biodiesel. Não foram selecionadas outras leveduras dos gêneros *Candida*, *Papiliotrema* (= *Cryptococcus*) e *Rhodotorula* pelo risco de sua utilização uma vez que há relatos de patogenicidade na literatura, conforme citado neste trabalho no item caracterização dos gêneros de leveduras.

A utilização de leveduras para o uso em paratransgênese em *Anopheles* apresenta como vantagem o fato de ser um eucarioto e, portanto, pode facilitar a expressão de peptídeos heterólogos oriundos de outros eucariotos, por exemplo de *Plasmodium* ou *Anopheles*, que podem ser alvos ou competidores por sítios de reconhecimento celular dentro do intestino do mosquito. Estes peptídeos, expressos dentro do intestino do mosquito, poderiam impedir a passagem do oocineto de *Plasmodium* pela parede do intestino do mosquito *Anopheles* interrompendo a formação de oocistos. Estabelecendo assim a realização de paratransgênese no controle da malária. Um sistema eucariótico de expressão favorece o correto dobramento de proteínas eucarióticas e modificações pós traducionais que podem ser úteis para expressar estes peptídeos. Além disso, existem plataformas comerciais para expressão heteróloga utilizando a levedura *Pichia pastoris*, que apresentam a vantagem da utilização de vetores integrativos no genoma, tornando esta recombinação mais estável quando comparadas

plasmídeos episomais. Esses vetores utilizam regiões de genes homólogos, como locus de genes da via glicolítica para promover a integração no genoma. Por serem loci altamente conservados é possível idealizar a integração desses vetores para outras leveduras, como *M. caribbica* ou *M. guilliermondii*, encontradas neste trabalho.

Ademais, a identificação de *W. anomalus* no intestino de *Anopheles*, abre a possibilidade de manipular esta levedura com chance de expressar moléculas efetoras em um organismo eucarioto e tornar *W. anomalus* um bom potencial candidato para paratransgênese (FAVIA et al., 2012). *W. anomalus* (sin: *Pichia anomala*; *Hansenula anomala*) em *An. gambiae* foi sugerida como candidata à paratransgênese (RICCI et al., 2014). No entanto *W. anomalus* também tem sido investigada por apresentar grande potencial biotecnológico, especialmente para aplicações na indústria alimentar. A atividade antimicrobiana dessa levedura, associada com a produção de toxinas assassinas (Killer Toxins - KTs), tem atraído atenção e possui um potencial para ser agente para o controle simbiótico de malária. Leveduras *killer* como *W. anomalus* tem um papel de proteção aos mosquitos (CAPPELLI et al., 2014; VALZANO et al., 2016).

No presente trabalho foi verificada a expressão do gene repórter no organismo modelo procaríoto *E. coli*. O vetor pSB1C3 – Bba\_E1010 (Figura 13) foi transformado em células de *E. coli* TG1. O gene RFP foi expresso em *E. coli* cepa TG1. Após a transformação, todas as colônias cresceram da cor rosa/vermelha em meio LB ágar contendo 25 µg/mL de Canamicina, gene de resistência contido no vetor. Apesar de ser uma proteína vermelho fluorescente, o comprimento de onda emitido é visível a olho nú, fato que facilita a visualização/detecção da expressão, dispensando a utilização de filtros para comprimentos de ondas. A próxima etapa será transformar *Pantoea agglomerans*, isolada a partir de fezes de *An. darlingi* e identificada neste trabalho, utilizando o vetor pSB1C3 – Bba\_E1010 utilizando o protocolo de transformação testado para *E. coli* (CHOI; KUMAR; SCHWEIZER, 2006).

Para construção do vetor para expressão de RFP em leveduras foi necessário inserir o gene repórter RFP1 em um vetor para expressão de leveduras. Após a reação de PCR com iniciadores específicos, e utilizando como molde o DNA plasmidial do vetor pSB1C3 – Bba (Figura 13), foi obtido um *amplicon* de aproximadamente 0,7 Kb (Figura 34) correspondente ao tamanho teórico do gene RFP.

O *amplicon* foi purificado do gel e digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. A digestão foi purificada e em seguida realizada a ligação no vetor pGAPZalfaB, (Figura 14) previamente digerido com as mesmas enzimas e também purificado. Os DNAs foram ligados utilizando uma enzima T4DNA ligase.

Tabela 7 - Lista de microrganismos isolados neste trabalho com potencial para realização de paratransgênese no controle da malária transmitida por *Anopheles darlingi*

MICRORGANISMOS CANDIDATOS À PARATRANSGENESE	JUSTIFICATIVA
<b>BACTÉRIAS CANDIDATAS À PARATRANSGENESE</b>	
<i>Pantoea</i> sp <i>Pantoea dispersa</i>	<p>Não possui resistência intrínseca à antibióticos((CLSI), 2017). <i>P. agglomerans</i> foi indicada como candidata a paratransgênese, pois não é patogênica a humanos, sobrevive a várias passagens no trato digestório de <i>Anopheles</i> e, esta colonização persiste, por até 2 semanas após ingestão da bactéria. Ainda, ela é naturalmente encontrada em diversas espécies de mosquito, incluindo <i>Anopheles</i> sp (RIEHLE et al., 2007). Wang e colaboradores (2012) relataram que o número de bactérias <i>P. agglomerans</i> aumentou mais de 200 vezes durante os 2 primeiros dias após a alimentação sanguínea (WANG et al., 2012), fato que é vantajoso, pois aumentando a quantidade de bactérias, conseqüentemente é possível aumentar a expressão de peptídeos anti-<i>Plasmodium</i>. Além disso, bactérias Gram-negativas, como <i>P. Agglomerans</i> reduzem a infecção por <i>P. falciparum</i> de <i>An. stephensi</i> (PUMPUNI et al., 1996; PUMPUNI C. B., BEIER M.S., NATARO J.P., GUERS L.D., 1993)</p>
<i>Serratia marcescens</i>	<p>Não possui resistência intrínseca a antimicrobianos ((CLSI), 2017) e é indicada como um patógeno oportunista. Foi considerada para realização de paratransgênese por outros autores (BANDO et al., 2013; GONZALEZ-CERON et al., 2003; WANG et al., 2017).</p> <p>Também foi relatado que um isolado de <i>Serratia marcescens</i>, espécie que também foi isolada neste trabalho, colonizou o trato digestório de <i>Anopheles</i> comprometendo a sobrevivência do mosquito e o desenvolvimento do <i>Plasmodium</i>, tornando-a assim, uma candidata potencial para o desenvolvimento de uma estratégia de intervenção contra a transmissão da malária (BAHIA et al., 2014a).</p>
<b>LEVEDURAS CANDIDATAS À PARATRANSGENESE</b>	
<i>Meyerozyma caribbica</i> <i>M. guilliermondi</i>	<p>A levedura do gênero <i>Meyerozyma</i> (= <i>Pichia</i>) foi considerada para realização de paratransgênese no</p>

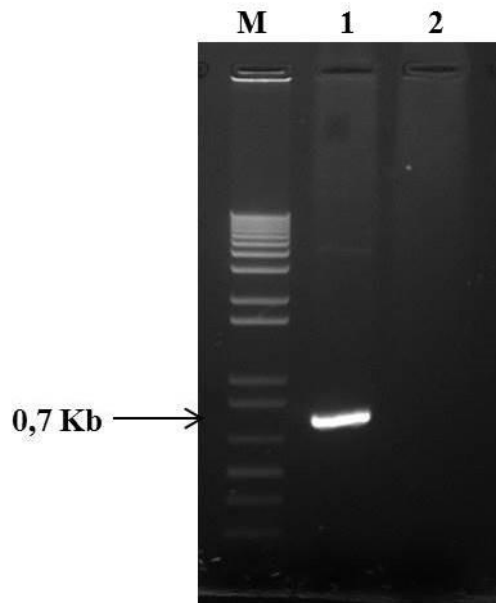
---

controle da malária vetorizada por *An. stephensi* e *An. gambiae* (RICCI et al., 2011, 2014; VALZANO et al., 2016). Além disso, leveduras killer como *Wickerhamomyces (=Pichia) anomalus* tem um papel de proteção aos mosquitos (CAPPELLI et al., 2014; VALZANO et al., 2016).

---

<i>Metschkwia</i>	É utilizada na indústria de alimento. Colonizam frutos e flores.
<i>Pseudozyma</i>	É utilizada na indústria de biodiesel. Colonizam frutos e flores.
<i>Hanseniaspora</i>	É utilizada na indústria de alimento. Colonizam frutos e flores.

---

**Figura 34 - Amplicom de RFP**

**M: marcador 1Kb Plus Invitrogen, 1: Amplicom RFP, 2: Controle negativo.**

O vetor construído foi nomeado pGAPZ $\alpha$ \_RFP1 e transformado em *E. coli* Top10 para amplificação do novo plasmídeo. Após a transformação, colônias de bactérias transformadas com o vetor cresceram na placa de LB ágar contendo zeocina 25 $\mu$ g/mL. Quatro clones resistentes à zeocina, marca de seleção do vetor, foram selecionados para realização de extração do DNA plasmidial do vetor pGAPZ $\alpha$ \_RFP1. Será realizada análise de restrição dos quatro clones selecionados utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* para verificar a liberação do inserto, o gene RFP1. Após esta verificação, o vetor estará pronto para ser linearizado e então realizar os ensaios de transformação no organismo modelo *Pichia pastoris*. Posteriormente o vetor pGAPZ $\alpha$ \_RFP1 será linearizado e transformado por eletroporação nas leveduras candidatas à paratransgênese propostas nesse trabalho, inicialmente *M. caribbica* e *M. guilliermondii*.



## 6 CONCLUSÕES

È possível isolar e cultivar bactérias e fungos a partir das fezes de *An. darlingi*.

Sessenta bactérias foram isoladas e identificadas, e então caracterizadas em oito gêneros.

Vinte e sete leveduras foram isoladas e identificadas, e então caracterizadas em nove gêneros.

Para bactérias, foi registrada a riqueza de 14 espécies e as mais frequentes foram *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter cloacae complex*, *S. marcescens*, e *Acinetobacter baumannii*.

Para leveduras, foi registrada a riqueza de 14 espécies e as mais frequentes foram *Moesziomyces antarcticus*, *Candida metapsilosis* e *Meyerozyma caribbica*.

Segundo os critérios para a seleção dos microrganismos candidatos à paratransgênese estabelecido neste trabalho, as bactérias pertencentes ao gênero *Pantoea* e *Serratia* e as leveduras *Meyerozyma* (= *Pichia*) *caribbica*, *Metschnikowia koreensis*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida oleophila* e *Pseudozyma hubeiensis* são apresentadas como candidatas à paratransgênese para o controle da malária no mosquito *An. darlingi*.

O vetor pSB1C3 – Bba\_E1010 foi selecionado para expressão do gene repórter RFP nas bactérias candidatas à paratransgênese selecionadas no presente trabalho, assim como foi selecionado o vetor pGAPZα\_RFP1, para expressão do gene repórter RFP nas leveduras candidatas a paratransgênese selecionadas no presente trabalho, possibilitando assim, o início das manipulações genética dos candidatos à paratransgênese.

Bactérias isoladas a partir das fezes de *An. darlingi* foram encontradas em outros *Anopheles*, destas, *Pantoea* e *Serratia* foram previamente consideradas para realização de paratransgênese no controle da malária, conforme outros autores.

Leveduras *Candida*, *Hanseniaspora* e *Wickerhamomyces*, isoladas a partir das fezes de *An. darlingi*, foram encontradas anteriormente em *An. stephensi*.

Foi desenvolvida uma estratégia para o isolamento de microrganismos a partir das fezes de mosquitos que pode ser utilizada para o estudo da microbiota fecal dos *Anopheles* da Amazônia ou para a investigação da microbiota fecal de outros insetos com importância na saúde pública e na agropecuária.

Houve cinco novos registros de bactérias para *Anopheles* no continente americano: *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Cedecea*, *Klebsiella* e *Acinetobacter*.

Houve três novos registros de gêneros de leveduras para Culicídeos: *Metschnikowia*, *Pseudozyma* e *Moesziomyces*.

As leveduras *P. parantarctica*, *P. hubeiensis*, *H. opuntiae*, *W. anomalus*, *M. guilliermondii*, isoladas e identificadas no presente trabalho, apresentam potencial biotecnológico, conforme descrito na literatura. Logo, a viabilidade de suas aplicações biotecnológicas pode ser explorada, uma vez que estão isoladas e preservadas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É apropriado destacar neste momento que, entre os critérios para a realização de paratransgênese, está a idealização de uma maneira eficiente de introduzir o simbiote engenheirado a campo (WANG; JACOBS-LORENA, 2013). Porém, a implementação deve ser moldada pelo equilíbrio entre risco e necessidade de novas estratégias de controle (ARORA; DOUGLAS, 2017).

Para a disseminação dos microrganismos modificados geneticamente defende-se a utilização de “*Attractive target sugar baits (ATSB)*”(KHALLAAYOUNE et al., 2013) associado a auto-disseminação dos microrganismos a partir das fezes. Em outros modelos de controle biológico, microrganismos foram introduzidos e disseminados utilizando iscas açucaradas (SCHLEIN; PENER, 1990).

Uma vez que isolamos os microrganismos a partir das fezes é dedutível que esses microrganismos, que são eliminados nas fezes de *An. darlingi*, são também eliminados em ambientes naturais de alimentação açucarada do mosquito, como néctar e exudato. Por sua vez, esses locais de alimentação, ricos em nutrientes e açúcares, são propícios para o desenvolvimento de microrganismos como bactérias e leveduras. Neste contexto, esses locais de alimentação são visitados por diversas espécies de insetos, que provavelmente compartilham uma microbiota que é adquirida pela alimentação e contato corporal, assim como enriquecida/incrementada por microrganismos previamente eliminados nas fezes de outros insetos. E sabe-se que muitos insetos fazem sua excreção durante o repouso após a alimentação. Logo, o ambiente alimentar natural do mosquito pode funcionar para incrementar uma auto-disseminação de microrganismos paratransgênicos ingeridos pelos mosquitos.

Após delinear uma ATSB contendo o microrganismo desejado, que pode ser geneticamente modificado (paratransgênese) ou não (controle simbiótico), é necessário fazer a dispersão do composto em questão. Além disso, é crucial realizar monitoramento desse sistema para avaliar se a estratégia é eficaz para auxiliar no controle da malária (pode ser adaptado para outras doenças transmitidas por insetos).

O monitoramento deverá ser capaz de seguir o desenvolvimento do modelo conceitual descrito em nove passos, a seguir. 1) O mosquito visitará a ATSB para alimentação. 2) Ao pousar sobre a isca para alimentação ele irá ingerir os microrganismos (engenheirados ou não). 3) Esses microrganismos serão dispersados para as fontes naturais de

alimentação açucarada. 4) As fontes naturais de alimentação açucaradas fornecem as condições e recursos requeridos pelos microrganismos da ATSB. 5) As fontes naturais de alimentação serão colonizadas por microrganismos da ATSB, os quais foram selecionados e/ou geneticamente modificados para o controle da malária. 6) Outros mosquitos, ao visitarem as fonte de alimentação natural previamente colonizadas pelos microrganismos oriundos da ATSB serão, também, contaminados pelos novos microrganismos. 7) Esse segundo grupo de mosquitos, novamente, dispersarão os clones dos microrganismos oriundos da ATSB para novas fontes de alimentação natural açucaradas. 8) Um sistema de disseminação será estabelecido e os microrganismos da ATSB serão parte da microbiota de mosquitos. 9) Enfim, os microrganismos da ATSB estarão disseminados no ecossistema e combateriam o *Plasmodium* ainda dentro do intestino, evitando a transmissão da doença para humanos.

Além disso, este trabalho ampliou o conhecimento sobre a biodiversidade da Amazônia brasileira, especificamente de bactérias e de leveduras ambientais, contribuiu para a formação de recurso humano na região amazônica nas técnicas para a identificação molecular taxonômica de microrganismos de interesse biotecnológico, contribui para o desenvolvimento da autonomia nacional para planejamento de soluções biotecnológicas para o controle da malária e, potencialmente, de outras doenças transmitidas por artrópodes.

Conhecer os microrganismos contido nas fezes dos anofelinos é uma estratégia que pode facilitar a investigação da microbiota que passou pelo intestino, e talvez esse método possa ser utilizado também como uma estratégia de auto-disseminação, na qual mosquitos inoculados com os microrganismos de interesse, dispersariam suas fezes repletas do agente paratransgênico no ambiente.

Nesta tese foi ampliado o conhecimento acerca da microbiota associada a *An. darlingi*, o principal vetor de malária no Brasil; foram sugeridos potenciais candidatos à paratransgênese e foi idealizado um modelo da estratégia para o controle da malária no Brasil. Logo, foi criada uma base de conhecimentos necessários para o desenvolvimento de soluções biotecnológicas, como a paratrânsngênese, que utiliza a biodiversidade amazônica. Talvez, o desenvolvimento de paratransgênese para o controle da malária no Brasil contribua para a erradicação da malária no globo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIS. **The Great Bacteria Book: ABIS online Encyclopedia**. Disponível em: <<http://www.tgw1916.net/Enterobacteria/Cedecea.html>>. Acesso em: 3 out. 2017.
- ABRAHAM, E. G.; JACOBS-LORENA, M. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 667–671, 2004.
- AHARON, Y. et al. Phylogenetic, metabolic, and taxonomic diversities shape mediterranean fruit fly microbiotas during ontogeny. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 303–313, 2013.
- AKHOUNDI, M. et al. Diversity of the Bacterial and Fungal Microflora from the Midgut and Cuticle of Phlebotomine Sand Flies Collected in North-Western Iran. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50259, 30 nov. 2012.
- ALDHEBIANI, A. Y. Species concept and speciation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017.
- AMIR, A. et al. Invasion characteristics of a *Plasmodium knowlesi* line newly isolated from a human. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 24623, 2016.
- ANVISA. **Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica**. Ministério da Saúde. **Anais**. 2004.
- ARAMA, C.; TROYE-BLOMBERG, M. The path of malaria vaccine development: Challenges and perspectives. **Journal of Internal Medicine**, v. 275, n. 5, p. 456–466, 2014.
- AREESIRISUK, A. et al. A NOVEL OLEAGINOUS YEAST STRAIN WITH HIGH LIPID PRODUCTIVITY AND ITS APPLICATION TO ALTERNATIVE BIODIESEL PRODUCTION. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 51, n. 4, p. 387–94, 2015.
- ARORA, A. K.; DOUGLAS, A. E. Hype or Opportunity? Using Microbial Symbionts in Novel Strategies for Insect Pest Control. **Journal of Insect Physiology**, 2017.
- ARRUDA, A. et al. A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Microbiological Methods**, v. 141, n. Oct. 2017, p. 115–117, 2017.
- BAHIA, A. C. et al. Exploring Anopheles gut bacteria for Plasmodium blocking activity. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2980–2994, 2014.
- BANDO, H. et al. Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in Anopheles mosquito midgut defines Plasmodium transmission capacity. **Scientific reports**, v. 3, p. 1641, 2013.
- BARROS, F. S. M.; HONÓRIO, N. A. Deforestation and malaria on the amazon frontier: Larval clustering of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) determines focal distribution of malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 939–953, 2015.

- BEARD, C. BEN; CORDON-ROSALES, C.; DURVASULA, R. V. Bacterial Symbionts of the Triatominae and Their Potential Use in Control of Chagas Disease Transmission. 2002.
- BEECK, O. D. M. et al. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.
- BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. **Ecology: Individuals, Populations and Communities**. 4. ed. 2006.
- BENDA, N. D. Detection and characterization of *Kodamaea ohmeri* associated with small hive beetle *Aethina tumida* infesting honey bee hives. **Journal of Apicultural Research**, v. 47, n. 3, p. 194–201, 2008.
- BERGEY. Systematic Bacteriology vol 2 part B. **BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology**, 2010.
- BERGEY, D. H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria vol 2 Part A - Introductory Essays. **Springer-Verlag New York Inc.**, v. 2, p. 1–304, 2005.
- 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, n. 13, p. 4669–4675, 2011.
- BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. 103. *Pseudozyma bandoni* emend. Boekhout and a comparison with the yeast state of *Ustilago maydis* (De Candolle) Corda. In: KURTZMAN, C. P. (Ed.). . **The Yeasts, a taxonomic study**. ELSEVIER, 1998. p. 790–792.
- BOISSIÈRE, A. et al. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2012.
- BOLD, C. FOR B. G. IN C. **Taxonomy Browser | BOLDSYSTEMS**. Disponível em: <[http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser\\_Taxonpage?taxon=candida&searchTax=Search+Taxonomy](http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxon=candida&searchTax=Search+Taxonomy)>. Acesso em: 10 out. 2017.
- BONGIO, N. J.; LAMPE, D. J. Inhibition of *Plasmodium berghei* Development in Mosquitoes by Effector Proteins Secreted from *Asaia* sp. Bacteria Using a Novel Native Secretion Signal. p. 1–17, 2015.
- BRENNER, D. J. .; KRIEG, N. R. .; STALEY, J. T. . Volume Two\_The Proteobacteria, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. In: KRIEG, D. J. B. N. R.; STALEY, J. T.; GARRIT, G. M. (Eds.). . **BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology**. 2. ed. Springer Scienc, 2005. p. 1414.
- BRODERICK, N. A. et al. Census of the Bacterial Community of the Gypsy Moth Larval Midgut by Using Culturing and Culture-Independent Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 293–300, 2004.
- BRUCE, T. et al. Microbial Diversity of Brazilian Biomes. In: NELSON, K. E. (Ed.). . **Advances in Microbial Ecology**. New York: Springer, 2012. p. 217–248.
- BUSH, D. R.; WYSOCKI, V. H.; SCARAFFIA, P. Y. Study of the fragmentation of arginine

isobutyl ester applied to arginine quantification in *Aedes aegypti* mosquito excreta. **Journal Mass Spectrom**, v. 10, 2012.

CANTO, A.; HERRERA, C. M.; RODRIGUEZ, R. Nectar-living yeasts of a tropical host plant community: diversity and effects on community-wide floral nectar traits. **PeerJ**, v. 5, p. e3517, 2017.

CAPPELLI, A. et al. A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

CHANDLER, J. A. et al. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: Ecological context of a host-microbe model system. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 9, 2011.

CHANDLER, J. A.; EISEN, J. A.; KOPP, A. Yeast communities of diverse *Drosophila* species: Comparison of two symbiont groups in the same hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 20, p. 7327–7336, 2012a.

CHARLWOOD, J. D. Observations on The bionomics of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, v. 70, n. 4, p. 685–692, 1980.

CHARLWOOD, J. D. Biological variation in *Anopheles darlingi* root. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 391–398, 1996.

CHAVSHIN, A. R. et al. 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 Tropica**, v. 121, n. 2, p. 129–134, 2012.

CHAVSHIN, A. R. et al. Isolation and identification of culturable bacteria from wild *Anopheles* culicifacies, a first step in a paratransgenesis approach. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 419, 2014.

CHEN, S. et al. Persistent infection by *Wolbachia* wAlbB has no effect on composition of the gut microbiota in adult female *Anopheles stephensi*. **Frontiers in Microbiology**, 2016.

CHEN, S.; BLOM, J.; WALKER, E. D. Genomic, physiologic, and symbiotic characterization of *Serratia marcescens* strains isolated from the mosquito *Anopheles stephensi*. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

CHEN, X. et al. *Microbacterium gilvum* sp. nov., isolated from civet faeces. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2016.

CHENG, M.-F. et al. *Cryptococcus laurentii* Fungemia in a Premature Neonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1608–1611, 1 abr. 2001.

CHOI, K. H.; KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 3, p. 391–397, 2006.

CHOUAIA, B. et al. Molecular evidence for multiple infections as revealed by typing of asaiia bacterial symbionts of four mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 22, p. 7444–7450, 2010.

CIARDO, D. E. et al. Systematic internal transcribed spacer sequence analysis for identification of clinical mold isolates in diagnostic mycology: A 5-year study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2809–2813, 2010.

CIRIMOTICH, C. M. et al. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. v. 332, n. 6031, p. 855–858, 2011.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 141–145, 2009.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 633–642, 2014.

COLWELL, R., K. **EstimateS: Statistical Estimation of species richness and shared species from samples**, 2013. Disponível em: <<http://viceroy.colorado.edu/estimates/>>

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994.

CREGG, J. M. et al. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000.

CREGG, J. M. *Pichia* Protocols, Second Edition. v. 389, 2007.

CROTTI, E. C. et al. Asaia, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. **Environ Microbiol**, v. 11, p. 3252–3264, 2009.

DA SILVA-VASCONCELOS, A. et al. Biting indices, host-seeking activity and natural infection rates of anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 151–161, 2002.

DAMIANI, C. et al. **Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors** *Current Biology*, 2008.

DATASUS-MINISTÉRIO DA SAÚDE. **TabNet Win32 3.0: Mortalidade - Brasil**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 18 out. 2017.

DE ARRUDA, M. et al. Potential Vectors of Malaria and their Different Susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Northern Brazil Identified by Immunoassay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 5, p. 873–881, 1 set. 1986.

DE ARRUDA, M. et al. Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 41, n. 4, p. 379–85, out. 1989.

DEANE, L. M. **Malaria vectors in Brazil** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1986.



DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879–886, 2007.

DE VOS, P. . et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 3. The Firmicutes**. 2. ed. 2009.

DELÉTOILE, A. et al. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 2, p. 300–10, fev. 2009.

DENTINI, P. et al. Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis in a Brazilian reference center. **Medical Microbiology and Immunology**, 30 set. 2017.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 2006.

DESHPANDE, V. et al. Fungal identification using a Bayesian classifier and the Warcup training set of internal transcribed spacer sequences. **Mycologia**, 2016.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 811–818, 2007.

DIEME, C. et al. Transmission potential of *Rickettsia felis* infection by *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 1413835112-, 2015.

DILLON, R.; DILLON, V. The gut Bacteria of Insects: Nonpathogenic Interactions. **Annual Reviews in Entomology**, n. 98, p. 71–92, 2004.

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

DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, 2009.

DOUGHARI, H. J. et al. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. **Microbes and environments**, v. 26, n. 2, p. 101–12, 2011.

DOUGLAS, A. E. Lessons from studying insect symbioses. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 4, p. 359–367, 2011.

DREXLER, A. L.; VODOVOTZ, Y.; LUCKHART, S. Plasmodium development in the mosquito: biology bottlenecks and opportunities for mathematical modeling. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 333–336, 2008.

DURVASULA, R. V et al. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3274–3278, 1997.

- DURVASULA, R. V et al. Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodnius rhodnii*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, p. 115–119, 1999.
- EAPPEN, A. G.; SMITH, R. C.; JACOBS-LORENA, M. Enterobacter-activated mosquito immune responses to Plasmodium involve activation of SRPN6 in *Anopheles stephensi*. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. 62937, 3 maio 2013.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792–7, 8 mar. 2004.
- EMERSON, K. J. et al. Brazilian *Anopheles darlingi* root (Diptera: Culicidae) clusters by major biogeographical region. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–15, 2015.
- ENGEL, P.; MORAN, N. A. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 699–735, 2013.
- ENGELBREKTSON, A. et al. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. **The ISME journal**, v. 4, n. 5, p. 642–647, 2010.
- EPIS, S. et al. Do mosquito-associated bacteria of the genus *Asaia* circulate in humans? **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 6, p. 1137–1140, 2012.
- EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175–85, 1 mar. 1998.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 186–94, 1 mar. 1998.
- FAVIA, G. et al. Facing Malaria Parasite with Mosquito Symbionts. In: **Malaria Parasites**. 2012.
- FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 50 Pt 3, n. 3, p. 1351–71, 1 maio 2000.
- FELL, J. W.; STATZELL-TALLMAN, A. 105. *Rhodotorula* EC. Harrison. In: KURTZMAN, C. P. (Ed.). **The Yeasts, a taxonomic study**. Elsevier, 1998. p. 1075.
- FERREIRA, N. et al. Yeast microflora isolated from Brazilian cassava roots: Taxonomical classification based on molecular identification. **Current Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 287–293, 2010.
- FERRER, C. et al. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. **Journal of clinical m**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.
- FORATTINI, O. P. Entomologia Médica - V1. p. 592, 1962.
- FORATTINI, O. P. Comportamento exófilo de *Anopheles darlingi* Root, em região

meridional do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 21, n. 4, p. 291–304, ago. 1987.

FOSTER, A. G. W. Rapid identification of microbes in positive blood cultures by use of the vitek ms matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3717–3719, 2013.

GAFFIGAN, T. V. et al. **Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships**. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0133602>>. Acesso em: 17 out. 2017.

GANTER, P. F. The vectoring of cactophilic yeasts by *Drosophila*. **Oecologia**, v. Volume 75, n. 3, p. 400–404, 1988.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113–118, 1 abr. 1993.

GENDRIN, M.; CHRISTOPHIDES, G. K. The Anopheles Mosquito Microbiota and Their Impact on Pathogen Transmission. **Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors**, p. book chapter 2, 2013.

GIBSON, C. M.; HUNTER, M. S. Negative fitness consequences and transmission dynamics of a heritable fungal symbiont of a parasitic wasp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 10, p. 3115–3119, 2009.

GIGLIOLI, I. Insects and Yeasts. **Nature**, v. 56, n. 1459, p. 575–577, 1897.

GONZALEZ-CERON, L. et al. Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 3, p. 371–4, maio 2003.

GOTELLI, N. J.; COLWELL, R. K. Estimating species richness. In: **Biological Diversity**. 2010.

GÜLLERT, S. et al. Deep metagenome and metatranscriptome analyses of microbial communities affiliated with an industrial biogas fermenter, a cow rumen, and elephant feces reveal major differences in carbohydrate hydrolysis strategies. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 121, 2016.

GUSMÃO, D. S. et al. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): New perspectives for an insect-bacteria association. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 8, p. 919–924, 2007.

GUSMÃO, D. S. et al. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. **Acta Tropica**, v. 115, n. 3, p. 275–281, 2010.

HEINRITZ, S. N. et al. Intestinal microbiota and microbial metabolites are changed in a pig model fed a high-fat/low-fiber or a low-fat/high-fiber diet. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–21, 2016.

HIRAOKA, S.; YANG, C.; IWASAKI, W. Metagenomics and Bioinformatics in Microbial Ecology: Current Status and Beyond. **Microbes and environments**, 2016.

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

HONG, S. G. et al. *Metschnikowia koreensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea. n. 2001, p. 1927–1931, 2001.

HUG, L. A. et al. A new view of the tree of life. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 16048, 2016.

HUGHES, G. L. et al. Identification of Yeast Associated with the Planthopper, *Perkinsiella saccharicida*: Potential Applications for Fiji Leaf Gall Control. **Current Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 392–401, 18 out. 2011.

HUGHES, G. L. et al. Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12498–503, 26 ago. 2014.

HUGHES, J. B. et al. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399–406, out. 2001.

IGNATOVA, E. A. et al. The yeast flora of blood-sucking mosquitoes. **Mikrobiolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993)**, v. 58, n. 2, p. 12–15, 1996.

IMA: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION. **MycoBank Database**. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx>>. Acesso em: 10 out. 2017.

J.W. FELL; STATZELL-TALLMAN, A. 94. *Cryptococcus Vuillemin*. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Eds.). . **The Yeasts, a taxonomic study**. Elsevier, 1998. p. 1075.

JULLIAND, V.; GRIMM, P. HORSE SPECIES SYMPOSIUM: The microbiome of the horse hindgut: History and current knowledge. **Journal of animal science**, v. 94, n. 6, p. 2262–74, jun. 2016.

KAMPFER, P. et al. Proposal of *Thorsellia kenyensis* sp. nov. and *Thorsellia kandunguensis* sp. nov., isolated from larvae of *Anopheles arabiensis*, as members of the family Thorselliaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. May, p. 444–451, 2014.

KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 11, p. 1356–1362, 2011.

KHALLAAYOUNE, K. et al. Attractive toxic sugar baits: control of mosquitoes with the low-risk active ingredient dinotefuran and potential impacts on nontarget organisms in Morocco. **Environmental entomology**, v. 42, n. 5, p. 1040–5, out. 2013.

KIKUCHI, Y. Endosymbiotic Bacteria in Insects: Their Diversity and Culturability. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 3, p. 195–204, 2009.

- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–20, dez. 1980.
- KIRCHMAN, D. **Processes in microbial ecology**. 2012.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 504–509, 2007.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, jul. 2016.
- KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study (2011)**. 5. ed. Elsevier Science, 2011.
- KURTZMAN, C. P. 42. *Pichia* E.G. Hansen emend. Kurtzman. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W. (Eds.). **The Yeasts, a taxonomic study**. [s.l.] Elsevier, 1998. p. 1075.
- KURTZMAN, C. P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 2, p. 325–332, 2014.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: A taxonomic study**. 1998.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1216–23, maio 1997.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 331–371, 1998.
- LEITÃO, J. H. et al. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 31–40, 14 jun. 2010.
- LI, L. et al. The Effect of *Helicobacter pylori* Eradication on the Gastrointestinal Microbiota in Patients with Duodenal Ulcer. **Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD**, v. 25, n. 2, p. 139–46, jun. 2016.
- LINDH, J. M. et al. 16S rRNA Gene-Based Identification of Midgut Bacteria from Field-Caught. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 71, n. 11, p. 7217–7223, 2005.
- MALERA. The malERA Consultative Group on Basic Science and Enabling Technologies (2011) A research agenda for malaria eradication: Basic Science and Enabling technologies. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 1, 2011.
- MANCINI, M. V. et al. Paratransgenesis to control malaria vectors: a semi-field pilot study.

**Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 140, 2016.

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

MANter, D. K.; VIVANCO, J. M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 1, p. 7–14, 2007.

MARINOTTI, O. et al. The Genome of Anopheles darlingi, the main neotropical malaria vector. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 15, p. 7387–7400, 2013.

MATOS, I. T. S. R. et al. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with amazonian termites able to ferment D-xylose= Isolamento, identificação taxonômica. **Jornal de Biociências de Uberlândia**, v. 30, n. 1, p. 260–266, 2014.

MCARTHUR, J. V. Species Concepts and Speciation. In: **Microbial Ecology**. 2006.

MEENA, V. S. et al. Demonstration of Redox Potential of *Metschnikowia koreensis* for Stereoinversion of Secondary Alcohols/1,2-Diols. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–5, 2014.

MEYER, S. A. .; PAYNE, R. W.; YARROW, D. 64. *Candida Berkhout*. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Eds.). . **The Yeasts, a taxonomic study**. 1998. p. 1075.

MIESCHER SCHWENNINGER, S.; FREIMÜLLER LEISCHTFELD, S.; GANTENBEIN-DEMARCHI, C. High-throughput identification of the microbial biodiversity of cocoa bean fermentation by MALDI-TOF MS. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 347–355, 1 nov. 2016.

MILLER, M. .; PHAFF, H. J. 39. *Metschnikowia Kamienski*. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Eds.). . **The Yeasts, a taxonomic study**. 4. ed. [s.l.] Elsevier, 1998. p. 256.

MINARD, G.; MAVINGUI, P.; MORO, C. V. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 146, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brasil registra menor número de casos de malária nos últimos 35 anos**. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/23368-brasil-registra-menor-numero-de-casos-de-malaria-nos-ultimos-35-anos>>. Acesso em: 2 jul. 2016.

MOLL, R. M. et al. Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 29–32, 2001.

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

MORAIS, P. B.; PAGNOCCA, F.; ROSA, C. Yeast Communities in Tropical Rain Forests in

Brazil and other South American Ecosystems. In: ROSA, C.; GÁBOR, P. (Eds.). . **The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. [s.l.] Springer, 2006.

MORENO, M. et al. Infection of laboratory-colonized *Anopheles darlingi* mosquitoes by *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 612–616, 2014.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009.

MUKHERJI, R.; JOSHI-NAVARE, K.; PRABHUNE, A. Crystalline Xylitol Production by a Novel Yeast, *Pichia caribbica* (HQ222812), and Its Application for Quorum Sensing Inhibition in Gram-Negative Marker Strain *Chromobacterium violaceum* CV026. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 6, p. 1753–1763, 22 mar. 2013.

MUTURI, E. J. et al. Midgut fungal and bacterial microbiota of *Aedes triseriatus* and *Aedes japonicus* shift in response to La??Crosse virus infection. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 16, p. 4075–4090, 2016.

NDIKA, J. MACROGEN\_Full Sequencing 002190. p. 1–3, [s.d.].

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. Atheneu, 2005.

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

OLIVEIRA, J. V. D. C. et al. *Pseudozyma brasiliensis* sp. nov., a xylanolytic, ustilaginomycetous yeast species isolated from an insect pest of sugarcane roots. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 64, n. Pt 6, p. 2159–2168, 1 jun. 2014.

OSEI-POKU, J. et al. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 20, p. 5138–5150, 2012.

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

PAPON, N. et al. **Candida guilliermondii: Biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics** *Current Genetics*, 2013.

PETRUZZI, L. et al. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–13, 2017.

PIDIYAR, V. J. et al. STUDIES ON CULTURED AND UNCULTURED MICROBIOTA OF WILD CULEX QUINQUEFASCIATUS MOSQUITO MIDGUT BASED ON 16S RIBOSOMAL RNA GENE ANALYSIS. v. 70, n. 6, p. 597–603, 2004.

- PILOTTE, N. et al. A Novel Xenomonitoring Technique Using Mosquito Excreta/Feces for the Detection of Filarial Parasites and Malaria. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004641, 2016.
- PINCUS, D. H.; ORENGA, S.; CHATELLIER, S. Yeast identification--past, present, and future methods. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 45, n. 2, p. 97–121, 2007.
- PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, out. 1998.
- PROSDOCIMI, F. et al. Effects of sample re-sequencing and trimming on the quality and size of assembled consensus sequences. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 756–765, 2007.
- PROSDOCIMI, F.; ORTEGA, J. M. Accessing optimal primer distance from insert. **In silico biology**, v. 5, n. 5–6, p. 469–77, 2005.
- PRUESSE, E. et al. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 21, p. 7188–7196, 2007.
- PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T.; MAGLOTT, D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): A curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL. 1, p. 61–65, 2007.
- PUMPUNI, C. B. et al. Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on Plasmodium sporogonic development. **The American journal of tropical medicine and hygiene** v. 54, n. 2, 1 fev. 1996.
- PUMPUNI C. B., BEIER M.S., NATARO J.P., GUERS L.D., D. J. R. **Plasmodium falciparum: Inhibition of Sporogonic Development in Anopheles stephensi by Gram-Negative Bacteria** *Experimental Parasitology*, 1993.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590–596, 2013.
- RAGUPATHI, L.; REYNA, M. Case Report of Cryptococcus Albidus Peritonitis in a Peritoneal Dialysis Patient and a Review of the Literature. **Peritoneal Dialysis International**, v. 35, n. 4, p. 421–427, 1 jul. 2015.
- RAHARIMALALA, F. N. et al. Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes: first step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, p. 1391–1399, 2016.
- RANI, A. et al. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected Anopheles stephensi-an Asian malarial vector. **BMC microbiology**, v. 9, p. 96, 2009.
- RASGON, J. L. Using infections to fight infections: paratransgenic fungi can block malaria transmission in mosquitoes. **Future microbiology**, v. 6, n. 8, p. 851–853, 2011.



- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BARCODING: bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355–364, 24 jan. 2007.
- REN, X.; HOICZYK, E.; RASGON, J. L. Viral paratransgenesis in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 8, p. 4–11, 2008.
- REZZONICO, F. et al. Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. **BMC Microbiology**, 2009.
- REZZONICO, F. et al. Application of Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Identification and Clustering Analysis of *Pantoea* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, 2010.
- REZZONICO, F. et al. *Pantoea* clinical isolates cannot be accurately assigned to species based on metabolic profiling. **Transplant Infectious Disease**, v. 14, n. 2, p. 220–221, 2012.
- RICCI, I. et al. The yeast *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) inhabits the midgut and reproductive system of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 911–921, 2011.
- RICCI, I. et al. **Mosquito/microbiota interactions: From complex relationships to biotechnological perspectives** **Current Opinion in Microbiology**, 2012a.
- RICCI, I. et al. Symbiotic control of mosquito borne disease. **Pathogens and global health**, v. 106, n. 7, p. 380–5, nov. 2012b.
- RICCI, I. et al. Different mosquito species host *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*): Perspectives on vector-borne diseases symbiotic control. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 43–50, 2014.
- RICHARDS, T. A. et al. Molecular diversity and distribution of marine fungi across 130 European environmental samples. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1819, p. 20152243–20152243, 2015.
- RICKLEFS, R. E. **Economia Natureza**. 6. ed. Guanabara Koogan, 2010.
- RIEHLE, M. A. et al. Using bacteria to express and display anti-Plasmodium molecules in the mosquito midgut. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 595–603, maio 2007.
- ROOT, F. M. Studies on Brazilian Mosquitoes. I. The Anophelines of the nyssorhynchus group. **American Journal of Hygiene**, v. 6, n. 5, 1926.
- ROSA, C. A. et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 271–275, 2003.
- ROSA, C.; GÁBOR, P. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. 2006.
- ROSA, S. A. Produção de lipase de *Pseudozyma hubeiensis* e aplicação na biocatalise de biodiesel. 2015.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. Symbiosis and development: the hologenome concept. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 93, n. 1, p. 56–66, mar. 2011.

ROSENBERG ZILBER-ROSENBERG, I., E. **The Hologenome Concept: Human, Animal and Plant Microbiota**. 2013.

ROSSELLÓ-MÓRA, R. Towards a taxonomy of Bacteria and Archaea based on interactive and cumulative data repositories. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 318–334, 2012.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–25, jul. 1987.

SALDAÑA, M. A.; HEGDE, S.; HUGHES, G. L. Microbial control of arthropod-borne disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2017.

SANTOS, A. J. Estimativas de riqueza em espécies. In: JR., L. C.; RUDRAN, R.; VALLADARES-PADUA, C. (Eds.). **Biologia da Conservação e Manejo da vida Silvestre**. Curitiba: UFPR, 2003. p. 665.

SCHAUER, C.; THOMPSON, C. L.; BRUNE, A. The bacterial community in the gut of the cockroach *Shelfordella lateralis* reflects the close evolutionary relatedness of cockroaches and termites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2758–2767, 2012.

SCHLEIN, Y.; PENER, H. Bait-fed adult *Culex pipiens* carry the larvicide *Bacillus sphaericus* to the larval habitat. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 3, p. 283–288, 1990.

SCHWARTZ, L. et al. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. **Malaria journal**, v. 11, n. 1, p. 11, 2012.

SCORZETTI, G. et al. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 4, p. 495–517, dez. 2002.

SHARMA, A. et al. Gut microbes influence fitness and malaria transmission potential of Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 41–47, 2013.

SINGH, A.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production of carbonyl reductase by *Metschnikowia koreensis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10679–10685, 2011.

SINGH, B. et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, v. 363, n. 9414, p. 1017–1024, 2004.

SINKA, M. E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 69, 2012.

SIVEP-MALÁRIA\_MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resumo Epidemiológico por Local de Notificação. MicroStrategy**. Disponível em:

<<http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb;jsessionid=2ED645764E044B4BCBD1A22190912B73?hiddensections=header%2Cpath%2CdockTop%2CdockLeft%2Cfooter&evt=5005&s>

rc=mstrWeb.rwd.5005&evtOrigin=fromWait&mstrWeb=-\*-

1bQI\*\_OuOwA6qlxbavBKXR4s2ZNU%3D.DMMalaria.\*-OMCL>. Acesso em: 18 out. 2017.

SMITH, M. T. 34. *Hanseniaspora* Zikes. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Eds.). . **The Yeasts, a taxonomic study**. Elsevier, 1998. p. 214.

SMITH, R. C.; VEGA-RODRÍGUEZ, J.; JACOBS-LORENA, M. The Plasmodium bottleneck: Malaria parasite losses in the mosquito vector. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 644–661, 2014.

SOUZA, R. S. et al. Digestion of Yeasts and Beta-1,3-Glucanases in Mosquito Larvae: Physiological and Biochemical Considerations. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. e0151403, 2016.

STARMER, W. T.; PERIS, F.; FONTDEVILA, A. The transmission of yeasts by *Drosophila buzzatii* during courtship and mating. **Animal Behaviour**, v. 36, n. 6, p. 1691–1695, 1988.

STEYN, A.; ROETS, F.; BOTHA, A. Yeasts Associated with *Culex pipiens* and *Culex theileri* Mosquito Larvae and the Effect of Selected Yeast Strains on the Ontogeny of *Culex pipiens*. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 3, p. 747–760, 14 abr. 2016.

STRAIF, S. C. et al. Midgut Bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 3, p. 222–226, 1 maio 1998.

SUGITA, T. et al. The first isolation of ustilaginomycetous anamorphic yeasts, *Pseudozyma* species, from patients' blood and a description of two new species: *P. parantarctica* and *P. thailandica*. **Microbiology and immunology**, v. 47, n. 3, p. 183–90, 2003.

SUH, S. O. et al. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 3137–3145, 2003.

TADEI, W. P. et al. Adaptative processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region. **Hydrobiologia**, v. 789, n. 1, p. 179–196, 2017.

TADEI, W. P. . et al. Biologia de Anofelinos Amazônicos . XII . Ocorrência de Espécies de *Anopheles* , Dinâmica da Transmissão e Controle da Malária Na Zona Urbana de Ariquemes ( Rondônia ). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 30, n. 3, p. 221–251, 1988.

TAYLOR, L. H. Infection rates in, and the number of *Plasmodium falciparum* genotypes carried by *Anopheles* mosquitoes in Tanzania. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 93, n. 6, p. 659–62, set. 1999.

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

TOBIAS, N. J. et al. Snapshot fecal survey of domestic animals in rural Ghana for *Mycobacterium ulcerans*. **PeerJ**, v. 4, p. e2065, 2016.

TOFT, C.; ANDERSSON, S. G. E. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial

host adaptation. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 7, p. 465–475, 2010.

TORTO, B. et al. Multitrophic interaction facilitates parasite-host relationship between an invasive beetle and the honey bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 20, p. 8374–8378, 2007.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Tortora funke**. 10. ed. Artmed, 2012.

TRINDADE, R. C. et al. Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps of Brazilian Tropical Fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 294–300, jan. 2002.

TRISTEZZA, M. et al. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 670, 2016.

TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, 1 out. 2008.

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

VALZANO, M. et al. A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 21, 2016.

VARELA, C. et al. Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. **Food Chemistry**, v. 209, p. 57–64, 15 out. 2016.

VEGA-RODRÍGUEZ, J. et al. Multiple pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 4, p. E492-500, 2014.

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

VITTOR, A. Y. et al. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 3–11, 2006.

WANG, QIONG; COLE, R. J. **Comparison of Three Fungal ITS Reference Sets**. 2014. Disponível em: <[https://rdp.cme.msu.edu/download/posters/fungalITSreport\\_062014.pdf](https://rdp.cme.msu.edu/download/posters/fungalITSreport_062014.pdf)>.

WANG, Q. et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WANG, S. et al. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12734–12739, 2012.

WANG, S. et al. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered

symbiotic bacteria. v. 1402, n. September, p. 1399–1402, 2017.

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

WANG, Y. et al. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1–9, 2011.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 172–173, 2008.

WHITE, T. J. et al. **Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics** PCR Protocols, 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123721808500421>>

WHITEHEAD, T. R.; COTTA, M. A. Examination of the Aerobic Microflora of Swine Feces and Stored Swine Manure. **Journal of environmental quality**, v. 45, n. 2, p. 604–8, mar. 2016.

WHITTEN, M. M. A.; SHIAO, S. H.; LEVASHINA, E. A. Mosquito midguts and malaria: Cell biology, compartmentalization and immunology. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 4, p. 121–130, 2006.

WHO. **WHO | WHO welcomes support from Gavi for malaria vaccine pilot programme.** Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/diseases/malaria/malaria-vaccine-pilot/en/#>>. Acesso em: 2 jul. 2016.

WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION). World malaria report 2016. p. 186, 2016.

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

WIRTH, F.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology of Rhodotorula: an emerging pathogen. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2012, p. 465717, 2012.

WOESE, C. R. There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 1, p. 1–9, 1994.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4576–4579, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. World Malaria Report 2015. **World Health**, p. 122, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan on antimicrobial resistance. **WHO Press**, p. 1–28, 2015.

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

YARZA, P. et al. Update of the all-species living tree project based on 16S and 23S rRNA

sequence analyses. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 291–299, 2010.

YUN, J.-H. et al. Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 17, p. 5254–5264, 1 set. 2014.

ZAYED, M. E.; BREAM, A. S. Biodiversity of the microbial flora associated with two strains of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Communications in agricultural and applied biological sciences**, v. 69, n. 3, p. 229–34, 2004.

ZHANG, ZHENG; SCHWARTZ, SCOTT; WAGNER, LUKAS; MILLER, W. “A greedy algorithm for aligning DNA sequences”. **J Comput Biol**, v. 7(1-2):203, 2000.

ZHANG, Z. et al. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 12, p. 203–214, 2000.

## APÊNDICE A

Artigo publicado:

A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae).

### **Journal of Microbiological Methods**

Andrelisse Arruda, Gabriel Sousa Ferreira, Nucia Cristiane da Silva Lima,

Antônio dos Santos Júnior, Márlon Grégori Flores Custódio, Najla Benevides-Matos,

Luiz Shozo Ozaki, Rodrigo G. Stabeli, Alexandre A. Silva.

v. 141, n. Oct. 2017, p. 115–117, 2017.

## Accepted Manuscript

A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)

Andrelisse Arruda, Gabriel Sousa Ferreira, Nucia Cristiane da Silva Lima, Antonio dos Santos Júnior, Márlon Grégori Flores Custódio, Najla Benevides-Matos, Luiz Shozo Ozaki, Rodrigo G. Stabeli, Alexandre A. Silva



PII: S0167-7012(17)30212-9  
DOI: doi: [10.1016/j.mimet.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.08.004)  
Reference: MIMET 5217  
To appear in: *Journal of Microbiological Methods*  
Received date: 5 July 2017  
Revised date: 31 July 2017  
Accepted date: 9 August 2017

Please cite this article as: Andrelisse Arruda, Gabriel Sousa Ferreira, Nucia Cristiane da Silva Lima, Antonio dos Santos Júnior, Márlon Grégori Flores Custódio, Najla Benevides-Matos, Luiz Shozo Ozaki, Rodrigo G. Stabeli, Alexandre A. Silva , A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae), *Journal of Microbiological Methods* (2017), doi: [10.1016/j.mimet.2017.08.004](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.08.004)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



**REVISED VERSION**

A simple methodology to collect culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae)

Andrelisse Arruda<sup>a,b,\*</sup>, Gabriel Sousa Ferreira<sup>a</sup>; Nucia Cristiane da Silva Lima<sup>b</sup>; Antonio dos Santos Júnior<sup>c</sup>; Márlon Grégori Flores Custódio<sup>b</sup>; Najla Benevides-Matos<sup>b</sup>; Luiz Shozo Ozaki<sup>d</sup>; Rodrigo G. Stabeli<sup>b</sup>; Alexandre A. Silva<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

<sup>b</sup>Fundação Oswaldo Cruz- Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

<sup>c</sup>Instituto Federal de Rondônia-IFRO, Porto Velho, RO, Brazil

<sup>d</sup>Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA.

\*Corresponding author at: Laboratório de Bioecologia de Insetos, Depto de Biologia, Universidade Federal de Rondônia, BR 364 (Km 9,5 sentido Acre), Porto Velho, RO, Brazil, CEP 76800-000

*E-mail address:* alealsil@unir.br

**ABSTRACT**

A simple methodology based in a modified mosquito cage with a Petri dish containing culture medium was successfully used as an alternative method to the traditional digestive tract dissection protocol to collect bacteria from the feces of the mosquito *Anopheles darlingi*.

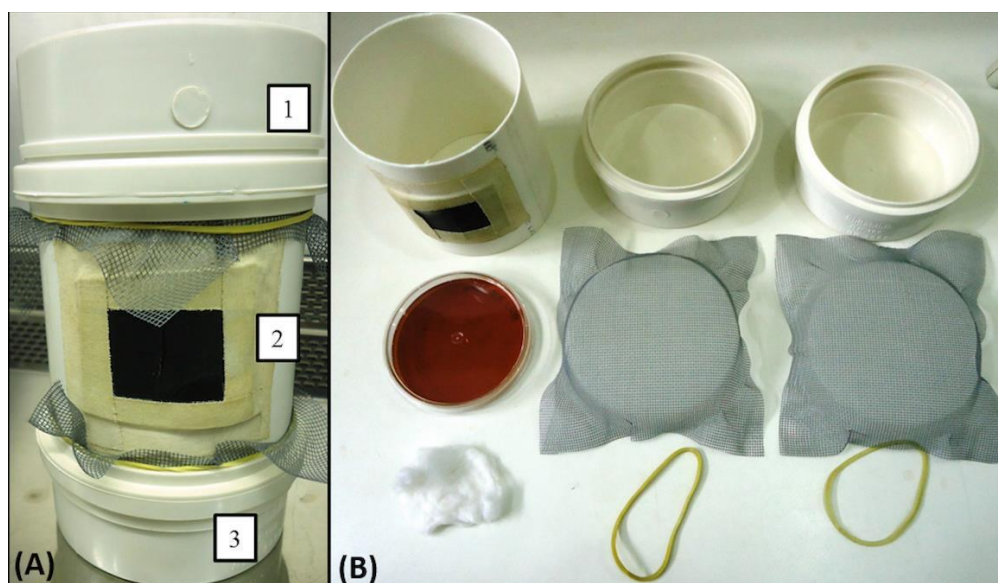
Microbiota from the gut of *Anopheles* mosquitoes interact with *Plasmodium*, the parasite that causes malaria (Manguin et al., 2013; Ngo et al., 2015; Rani et al., 2009) and it may be used to develop biotechnological tools, such as paratransgenic strategies

(Riehle and Jacobs-Lorena, 2005; Wang and Jacobs-Lorena, 2013). However, the lack of information about the mosquito's microbiota in the Americas (Villegas and Pimenta, 2014) still limits this strategy in the region which depends on culturable microorganisms from the intestinal microbiome as prerequisite for studies and future genetic manipulations necessary for the execution of the technique (Wang and Jacobs-Lorena, 2013; Wilke and Marrelli, 2015).

For the isolation of intestinal microorganisms from mosquitoes, the gut is usually dissected by skilled personnel (Consoli and Oliveira, 1994; Djadid et al., 2011; Gusmão et al., 2007) and prepared for classical microbiological techniques (Tortora et al., 2012). However, it is reasonable to hypothesize that mosquito feces contain microorganisms that are and/or were present in the intestine of these insects.

The present device for collecting cultivable intestinal microorganisms from mosquito feces does not require insect dissection to collect material, reducing work and external contamination issues.

The feces collection device is based in a modified PVC mosquito cage with 3 compartments, namely: 1- upper compartment for feeding; 2- middle compartment (body) for maintenance of mosquitoes; 3- lower compartment for collection of feces (Figure 1).



**Fig 1.** Device for collection of feces from mosquitoes. (A) Front view of the mounted device. 1. Upper compartment for food supply; 2. Middle compartment to contain mosquitoes; 3. Lower compartment for collection of mosquito feces. (B) Top view of the disassembled device.

The middle compartment is a 10 x 10 cm (diameter and height) PVC tube, screened on both sides with a mosquito-proof nylon net (1.5 mm mesh) and a side opening covered by a perforated elastic material for mosquito manipulation. The upper side contains cotton soaked with 10% sucrose for mosquito feeding covered by a PVC lid (upper compartment), preventing any external microorganism contamination. A PVC lid containing a removable Petri dish for feces collection is placed in the lower side (lower compartment). Mosquitoes are introduced into the device through the middle compartment side opening, feed in the sucrose solution placed in the upper compartment and then release their feces into the lower compartment, inaccessible to the mosquitoes, that keeps the Petri dishes containing LB agar culture medium (Figure 2).

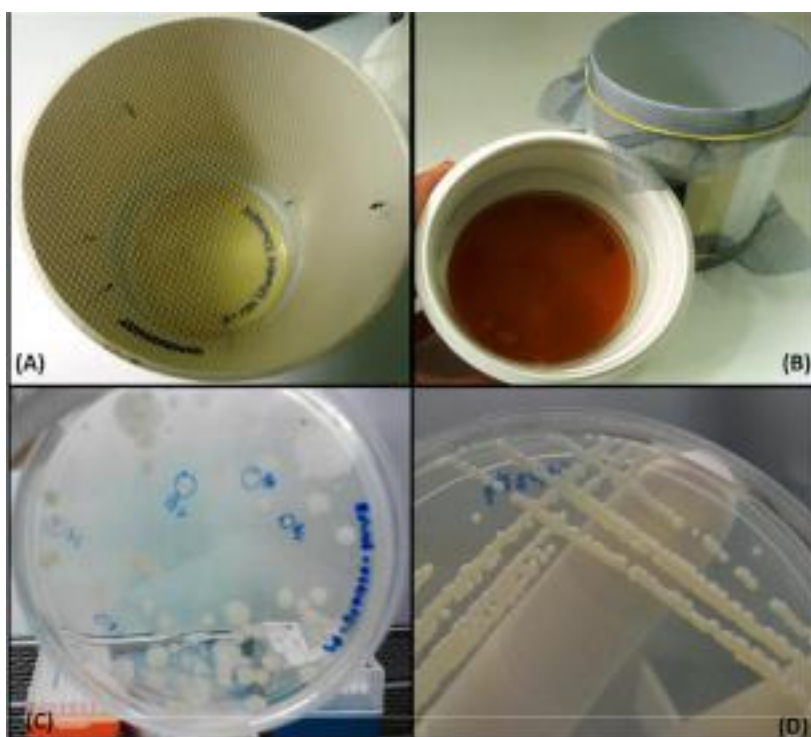


Fig. 2 Procedure for collecting microorganisms contained in mosquito feces (A) Top view of the middle compartment of the device containing mosquitoes. (B) Top view of the lower compartment of the device containing the Petri Dish with culture medium. (C) Front view of Petri Dish containing bacterial colonies that grew from mosquito feces. (D) Partial view of Petri Dish containing specimens of bacterial colonies that were isolated from mosquito feces.

Mosquitoes were captured in Porto Velho, Rondonia State, Brazil using a hand-held aspirator, identified using identification keys (Consoli and Oliveira, 1994).

The Feces collection device was cleaned using water and neutral liquid soap, rinsed with distilled water and then with 70% ethanol for 10 seconds and rotated after 30 minutes while drying under UV light inside a microbiological safety cabinet for 1 hour. The devices were packed in plastic film prior to use. The sterility of internal surface of feces collection device was checked after the cleaning and UV treatment using sterile

cotton swabs. Samples were streaked over the surface of the LB agar petri dishes and incubated aerobically at 37 °C for 24 hours. No microorganism growth was observed after 24 hours.

Batches of five mosquitoes (N=12) were introduced in the devices and fed *ad libitum* using autoclaved cotton soaked in 10% autoclaved sucrose. Three mosquito-free devices were used as negative controls.

Petri dishes containing the mosquito feces in LB agar culture were removed from the lower compartment after 24 hours and incubated at 37 °C for 24 hours (Rani et al., 2009). Isolated bacterial colonies with different morphologies were harvested from the petri dishes, transferred to new dishes to ensure the production of pure cultures (streak plate method) and stored in 15% glycerol at -70 °C.

The phenol/chloroform method was used to extract genomic DNA from the bacteria, (Sambrook and Russel, 2001 adapted). PCR amplifications of the bacterial ribosomal DNA using the primers 16S08F (GYCCADACWCCTACGG) and 16S08R (CACGAGCTGACGAC) were performed for bacteria identification. Briefly, 0.5 µM of each *primer*, 0.25 mM of the dNTP MIX, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X reaction buffer (DNA express Taq DNA Polymerase), 2 units of Taq DNA polymerase and 50 ng of each bacterial genomic DNA isolated were mixed and submitted to an initial extension of 94°C/7 minutes; 30 cycles of 94°C/45 seconds, the annealing temperature was 50°C/30 seconds, 72°C/60 seconds; followed by a final extension of 72°C/10 minutes. Genomic DNA from *Escherichia coli* O42 (50 ng) was used as a positive control for the reactions and, a negative control was prepared using all the reagents except a DNA template. The *amplicons* were purified using the *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAGEN), according to the manufacturer's specifications.

Sequencing was performed using the Sanger method in an ABI 3730 DNA Sequencer from Life Technologies. All samples were sequenced in duplicate. The sequences were treated using the software Phred-Phrap-Consed with the Phred quality score of 30. A consensus sequence was generated for each isolate's *amplicon*. The consensus sequences were uploaded in the Ribosomal Database Project's (RDP) Classifier for taxonomic assignment (Wang et al., 2007). Sequences with 100% confidence were considered using the RDP classifier hosted on the web, calibrated with a threshold of 80%.

Five colonies from each of the 12 Petri dishes were harvested for 60 new dishes, one dish for each bacterial colony to ensure colony isolation. No bacterial colonies were detected in the negative controls, i.e., from collection devices without mosquitoes. To date, 16 bacteria colonies were identified with 100% confidence using the RDP classifier, i.e., *Acinetobacter* (6) (Moraxellaceae); *Staphylococcus* (5) (Staphylococcaceae); *Enterobacter* (1), *Klebsiella* (1), *Serratia* (9) (Enterobacteriaceae) (Supplementary Table 1). Isolates with less than 99% confidence were not presented and will be reevaluated.

The isolation of bacteria from mosquito's feces for microbiological analysis has received little attention. We highlight the pioneering study on the experimental transmission of the yellow fever virus from fecal material present in the legs of infected mosquitoes (Aragão and Costa Lima, 1929) and, recently, the study conducted by Pilotte et al. (2016) using the feces of the mosquito *Anopheles stephensi* for xenomonitoring of the nematode *Brugia malaya* and protozoan *Plasmodium vivax*. The fecal collection methodology employed by both authors was tested for isolation of culturable bacteria and neither was suitable (unpublished data). On the other hand, the

majority of genera retrieved using the feces collection method reported here belonged to the Enterobacteriaceae family as also related from whole bodies of *Anopheles darlingi* (Terenius et al., 2007) and *Enterobacter* and *Serratia* were related to anophelines from the Americas (see Villegas and Pimenta, 2014 for a review). Therefore, our data indicates that the feces collection methodology proposed is a suitable tool for obtaining culturable bacteria from mosquitoes.

Conflicts of interest: None

**Acknowledgments:** We thank Luiz Herman Soares Gil for methodological advice on the feces collection and FIOCRUZ Rondônia and UNIR for the logistic support.

**Funding:** This work was supported by CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa [grant number 400428/2012-1], CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, FIOTEC – Fundação de Amparo à FIOCRUZ, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondonia/Campus Porto Velho Calama.

## References

- Aragão, H.B., Costa Lima, A. 1929. On the contamination of haemolymph in mosquitoes infected by the yellow fever virus. Mem Inst Oswaldo Cruz. 22, 251-255.
- Consoli RAGB, Oliveira RL. 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 228 p.
- Djadid, N., Jazayeri, H., Raz, A., Favia, G., Ricci, I., Zakeri, S. 2011. Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *C. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. PLOS ONE 6, 1-7.
- Gusmão, D., Santos, A., Marini, D., Russo, E., Peixoto, A., Bacci Jr, M., Berbert-Molina, M., Lemos, F. 2007. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of

- Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): New perspectives for an insect-bacteria association. Mem Inst Oswaldo Cruz 102, 919–924.
- Manguin, S., Ngo, C., Tainchum, K., Juntarajumnong, W., Chareonviriyaphap, T., Michon, A., Jumas-Bilak, E. 2013. Bacterial Biodiversity in Midguts of *Anopheles* Mosquitoes, Malaria Vectors in Southeast Asia. In: Manguin S (Ed.), *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Rijeka, InTech. pp. 549-576.
- Ngo, C., Aujoulat, F., Veas, F., Jumas-Bilak, E., Manguin, S. 2015. Bacterial diversity associated with wild caught *Anopheles* mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam using culture and DNA fingerprint. PLOS ONE 10, 1-18.
- Pilotte, N., Zaky, W., Abrams, B., Chadee, D., Williams, S. 2016. A Novel Xenomonitoring Technique Using Mosquito Excreta/Feces for the Detection of Filarial Parasites and Malaria. PLOS Negl Trop Dis. 10, 1-14.
- Rani, A., Sharma, A., Rajagopal, R., Adak, T., Bhatnagar, R. 2009. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. BMC Microbiol. 9, 96.
- Riehle, M., Jacobs-Lorena, M. 2005. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: Current and future strategies. Insect Biochem Mol Biol. 35 699–707.
- Sambrook, J., Russel, D. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual. 4<sup>th</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1886 p.
- Terenius, O., Oliveira, C.D., Pinheiro, W.D., Tadei, W.P., James, A.A., Marinotte, O. 2008. 16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles*



- darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. J. Med. Entomol. 45, 172-175.
- Tortora, G, Funke, B., Case C. 2012. Microbiologia. 10<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, ARTMED, 967 p.
- Valiente Moro, C., Tran, F., Raharimalala, F., Ravelonandro, P., Mavingui, P. 2013  
Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. BMC Microbiology 13, 70.
- Villegas, L., Pimenta, P. 2014. Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. Mem Inst Oswaldo Cruz 109, 672–684.
- Wang, Q., Garrity, G., Tiedje, J., Cole, J. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol. 73, 5261-5267.
- Wang, S., Jacobs-Lorena, M. 2013. Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes. Trends Biotechnol. 31,185–193.
- Wilke, A., Marrelli, M. 2015. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. Parasit Vectors 8, 342.

### Highlights

- 1) The proposed methodology allows surveys of gut microbiota without dissection of the mosquito's gut.
- 2) Five genera of culturable bacteria from feces of *Anopheles darlingi*, the major malaria vector in the Brazilian Amazon, were isolated and identified.
- 3) Species dynamics of intestinal microorganisms can be studied applying this protocol.

Supplementary Table 1 - Identification of bacterial isolates with 100% homology in RDP.

<b>Identification</b>	<b>Family</b>	<b>F%<sup>a</sup></b>	<b>Genus</b>	<b>G%<sup>b</sup></b>
U010786234 Bacteria_10	Moraxellaceae	100%	Acinetobacter	100%
U010786235 Bacteria_11	Moraxellaceae	100%	Acinetobacter	100%
U010786273 Bacteria_9	Moraxellaceae	100%	Acinetobacter	100%
U010786236 Bacteria_13	Moraxellaceae	100%	-	
U010786237 Bacteria_14	Moraxellaceae	100%	-	
U010786239 Bacteria_16	Moraxellaceae	100%	-	
U010786244 Bacteria_31	Enterobacteriaceae	100%	Serratia	100%
U010786245 Bacteria_32	Enterobacteriaceae	100%	Serratia	100%
U010786250 Bacteria_37	Enterobacteriaceae	100%	Serratia	100%
U010786251 Bacteria_38	Enterobacteriaceae	100%	Serratia	100%
U010786259 Bacteria_46	Enterobacteriaceae	100%	Serratia	100%
U010786260 Bacteria_48	Enterobacteriaceae	100%	Serratia	100%
U010786261 Bacteria_49	Enterobacteriaceae	100%	Serratia	100%
U010786254 Bacteria_40	Enterobacteriaceae	100%	Klebsiella	100%
U010786262 Bacteria_4	Enterobacteriaceae	100%	Enterobacter	98%
U010786240 Bacteria1	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786241 Bacteria_22	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786242 Bacteria_24	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786243 Bacteria_2	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786246 Bacteria_33	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786249 Bacteria_36	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786252 Bacteria_39	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786253 Bacteria_3	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786256 Bacteria_42	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786257 Bacteria_43	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786258 Bacteria_44	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786270 Bacteria_6	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786271 Bacteria_7	Enterobacteriaceae	100%	-	
U010786272 Bacteria_8	Enterobacteriaceae	100%	-	

U010786247 Bacteria_34	Staphylococcaceae	100%	Staphylococcus	100%
U010786248 Bacteria_35	Staphylococcaceae	100%	Staphylococcus	100%
U010786263 Bacteria_50	Staphylococcaceae	100%	Staphylococcus	100%
U010786264 Bacteria_51	Staphylococcaceae	100%	Staphylococcus	100%
U010786269 Bacteria_63	Staphylococcaceae	100%	Staphylococcus	100%

Legends: <sup>a</sup>RDP Family confidence level. <sup>b</sup>RDP Genus confidence level. RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.10. Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 14. Confidence threshold (for classification to Root ONLY): 80%.