

**CAMILA APARECIDA PROFETA**

**EFEITO DA VARIAÇÃO DE TEMPERATURA NO BACTERIOMA DO INTESTINO  
MÉDIO DE *Aedes Aegypti* E SEU IMPACTO NA MODULAÇÃO DA DIGESTÃO  
DE SANGUE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

Coorientadores: Gustavo Ferreira Martins  
Priscila Gonçalves Ferreira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

P964e  
2023

Profeta, Camila Aparecida, 1996-

Efeito da variação de temperatura no bacterioma do intestino médio de *Aedes aegypti* e seu impacto na modulação da digestão de sangue / Camila Aparecida Profeta. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (55 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Referências bibliográficas: f. 40-55.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.763>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Intestinos - Efeito da temperatura *Aedes aegypti*.  
2. Digestão. 3. Sangue. I. Mendes, Tiago Antônio de Oliveira, 1986-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 573.37

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523


**CAMILA APARECIDA PROFETA**

**EFEITO DA VARIAÇÃO DE TEMPERATURA NO BACTERIOMA DO INTESTINO  
MÉDIO DE *Aedes Aegypti* E SEU IMPACTO NA MODULAÇÃO DA DIGESTÃO  
DE SANGUE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título *Magister Scientiae*.


Aprovada: 27 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **CAMILA APARECIDA PROFETA**  
Data: 14/12/2023 16:46:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Camila Aparecida Profeta  
Autora

Documento assinado digitalmente  
 **TIAGO ANTONIO DE OLIVEIRA MENDES**  
Data: 12/12/2023 21:21:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Tiago Antônio de Oliveira Mendes  
Orientador

A confiança em si é o primeiro segredo do  
sucesso. (Raph Waldo Emerson).

A todos que diretamente ou indiretamente,  
contribuíram para realização desse sonho.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida,

À minha família, pelo amor gratuito diário,

Aos meus pais, Luiz e Maria Margarida, e aos meus irmãos Rafa, Natálie, Felipe e Aline por todo cuidado e amor,

Ao meu orientador, professor Tiago Mendes por me dar oportunidade de realizar esse projeto e por ser uma das inspirações da vida científica e por me ensinar TANTO,

Ao professor Gustavo Martins por abrir as portas do seu laboratório (Laboratório de Biologia Molecular de Insetos) ao nosso projeto,

A minha coorientadora Priscila por me orientar desde da graduação, por ser sempre solícita e por me inspirar na carreira científica,

Aos professores, Andrea Ribon, Ciro e Luciano Fietto por permitir que meu trabalho fosse realizado no Laboratório de Biologia Molecular (LBM),

À técnica Renata Cristina por me auxiliar na criação e alimentação de mosquitos,

Ao biotério central do DBG, em especial ao Renner, por auxiliar com os camundongos,

À pós-doutoranda Ananda por me ensinar sobre Biologia Molecular, e pela sua amizade,

Aos meus colegas de trabalho do LBM e gestora Michelle, em especial ao grupo do Cafezinho e a Bianca Reis, que me auxiliou em alguns experimentos,

Aos meus amigos e a república Afrodite por todo companheirismo e carinho, em especial Ana Helena, Aline, Gabi, Grazi, Larissa, Letícia, Matheus, Nath e Quézia,

Aos amigos distantes, que apesar do tempo, sempre estão na torcida,

Ao servidor Eduardo Monteiro por sempre me alertar sobre as atividades do programa,

Ao LAPEM e o Biocafé pelas disponibilidades dos equipamentos, em especial ao Professor Raphael e o Professor Mafra.

À UFV, por me acolher desde da graduação,

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Aplicada e todos os professores que o compõe por me permitir chegar até aqui colhendo grandes aprendizados,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Este estudo foi financiado em parte pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-04765-16) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Código de Financiamento 001.

## RESUMO

PROFETA, Camila Aparecida, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Efeito da variação de temperatura no bacterioma do intestino médio de *Aedes aegypti* e seu impacto na modulação da digestão de sangue.** Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes  
Coorientadores: Gustavo Ferreira Martins e Priscila Gonçalves Ferreira.

Sabe-se que a temperatura desempenha um papel na resistência/suscetibilidade dos mosquitos a infecções por patógenos, e em vários sistemas foi verificado um fenótipo resistente a baixas temperaturas. Estudos recentes mostraram que as bactérias do intestino médio parecem estimular o sistema imunológico do mosquito e, indiretamente, aumentar a proteção contra patógenos invasores. Em insetos hematófagos, não está claro como o repasto sanguíneo e a variação da temperatura ambiental afetam o bacterioma do inseto hospedeiro. Esse conhecimento é fundamental para compreender o impacto da temperatura na fisiologia do mosquito, a fim de buscar novas perspectivas de controle. Neste estudo, foram realizados experimentos no bacterioma intacto e reduzido para investigar a contribuição das bactérias intestinais na taxa de digestão do sangue em diferentes temperaturas (20, 28 e 36°C). Primeiramente, um coquetel de antibióticos (300 µg/ml) foi administrado às fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* por 48 horas. Depois os mosquitos foram alimentados com sangue de camundongo e expostos às três temperaturas. O intestino médio foi dissecado 24 horas e 48 horas após a alimentação (ABF). Para obter taxas de digestão de proteínas em cada temperatura, foram determinados o conteúdo total de proteína e albumina, bem como a atividade de tripsina. Finalmente, para analisar as alterações na expressão gênica envolvida na resposta ao bacterioma intacto e reduzido, o RNA total foi extraído do intestino médio, dissecado 24 horas após a alimentação sanguínea, utilizando o RNeasy Mini Kit seguindo as instruções do fabricante. Nossos resultados demonstram que em um ambiente intestinal com carga bacteriana reduzida há menor teor de proteína e atividade enzimática a 28 e 36°C 24 horas após a alimentação sanguínea, demonstrando que o efeito da temperatura na digestão sanguínea depende do bacterioma intestinal. Além disso, a redução da carga bacteriana impactou na expressão dos transcritos, o que acarretou diminuição e aumento na expressão dos genes envolvidos na digestão sanguínea em 24 (ABF) nas três temperaturas. Embora sejam necessárias mais investigações para determinar os mecanismos moleculares destes processos, os nossos resultados indicam que a redução da carga bacteriana combinada com a variação da temperatura afeta a digestão sanguínea, bem como a expressão gênica associada a estes processos, o que por sua vez afeta a competência do vector.

Palavras chaves: *Aedes aegypti*; temperatura; digestão do sangue; bacterioma intestinal; processos fisiológicos.

## ABSTRACT

PROFETA, Camila Aparecida, M.Sc., Federal University of Viçosa, July 2023. **Effect of temperature variation on the bacteriome of *Aedes aegypti* midgut and its impact on the modulation of blood digestion mechanisms.** Advisor: Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Co-advisors: Gustavo Ferreira Martins and Priscila Gonçalves Ferreira.

Temperature is known to play a role in the resistance/susceptibility of mosquitoes to pathogen infections, and in several systems a resistant phenotype has been verified at low temperatures. In hematophagous insects, it is unclear how blood meal and environmental temperature variation affect the bacteriome of the host insect. This knowledge is fundamental to understanding the impact of temperature on mosquito physiology in order to seek new control perspectives. In this study, experiments were conducted on the intact and reduced bacteriome to investigate the contribution of intestinal bacteria to the rate of blood digestion at different temperatures (20, 28 and 36°C). First, an antibiotic cocktail (300 µg/ml) was administered to female *Aedes aegypti* mosquitoes for 48h. After mosquitoes were fed with mice blood and exposed to the three temperatures. The midgut was dissected 24 hours and 48 hours after feeding (hpf). In order to obtain protein digestion rates at each temperature, total protein and albumin content as well trypsin activity were determined. Finally, to analyze the changes in gene expression involved in the response to intact and reduced bacteriome, total RNA was extracted from the midgut, dissected 24 hours after blood feeding, using the RNeasy Mini Kit following the manufacturer's instructions. Our results demonstrate that in an intestinal environment with reduced bacterial load there is a lower protein content and enzymatic activity at 28 and 36°C 24 hours after blood feeding, demonstrating that the effect of temperature on blood digestion depends on the intestinal bacteriome. Furthermore, the reduction in bacterial load impacted the expression of transcripts, there was a decrease and increase in the expression of genes involved in blood digestion at 24 (hpf) at the three temperatures. Although further investigation is needed to determine the molecular mechanisms of these processes, our results indicate that the reduction in bacterial load combined with temperature variation affects blood digestion, as well as the gene expression associated with these processes, which in turn affects the vector's competence.

Keywords: *Aedes aegypti*; temperature; blood digestion; intestinal bacteriome; physiological processes.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 <i>Aedes aegypti</i>: biologia e ecologia .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Digestão do sangue .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Microbiota intestinal de culicídeos.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 <i>Aedes aegypti</i> e a transmissão de arboviroses.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5 <i>Aedes aegypti</i> e a necessidade de controle vetorial.....</b>	<b>19</b>
<b>2.6 Determinantes da competência vetorial .....</b>	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Declaração de ética. ....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Criação dos mosquitos .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3 Tratamento com antibiótico e alimentação dos mosquitos .....</b>	<b>25</b>
<b>4.4 Mensuração da taxa de digestão .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5 Extração de DNA genômico total e quantificação da carga bacteriana por qPCR....</b>	<b>27</b>
<b>4.6 Extração do RNA e quantificação dos transcritos envolvidos na digestão de sangue</b>	<b>28</b>
<b>4.7 Análises estatísticas.....</b>	<b>29</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Efeito do sangue na carga bacteriana .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2 Efeito da redução das bactérias no intestino médio na digestão das proteínas do sangue .....</b>	<b>30</b>
<b>5.3 Quantificação dos transcritos envolvidos na digestão do sangue.....</b>	<b>33</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>

<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Vetores hematófagos como os mosquitos contribuem significativamente para a carga global de doenças por meio da transmissão de parasitas. À medida que a distribuição de espécies de mosquitos continua a se expandir devido às mudanças climáticas (Liu et al., 2020), é preciso buscar novos e mais eficazes métodos de controle vetorial baseados no conhecimento da fisiologia do mosquito.

O hábito de se alimentar de sangue dos mosquitos não só fornece proteínas sanguíneas e nutrientes essenciais para a oviposição e saúde reprodutiva, mas também permite que patógenos se estabeleçam e sejam transmitidos aos humanos através de hospedeiros artrópodes (Clements et al., 1992; Chaves et al., 2010). Como exemplo, o mosquito *Aedes aegypti* atua como vetor de algumas doenças virais, como o vírus da febre amarela (YFV) (Monath, 2001), vírus da dengue (DENV) (Viana et al., 2013), o vírus Zika (ZIKV) (Zanluca et al., 2015) e o alfavírus Chikungunya CHIKV (Lounibos et al., 2016), que causam grande impacto na saúde pública.

O intestino do mosquito é de particular importância para o controle de vetores porque é essencial para o estilo de vida de alimentação sanguínea e é a primeira interface entre o mosquito e os patógenos que ele transmite. O intestino do inseto é um órgão altamente compartimentalizado, com distribuição diferenciada de funções especializadas ao longo de seu comprimento (Benguettat et al., 2018; Buchon e Osman, 2015; Buchon et al., 2013; Dutta et al., 2015; Lemaitre e Miguel -Aliaga et al., 2013).

Estudos têm mostrado que para insetos hematófagos, como *Anopheles stephensi* (Murdock et al., 2012), *Anopheles gambiae* (Suwanchaichinda e Paskewitz, 1998) e *Dicicloidides* (Karl et al., 2011), a capacidade de resistir à infecção pode ser afetada pela temperatura, podendo ser mais ou menos eficiente à medida que a temperatura aumenta.

Turell et al., (1993) encontrou taxas significativamente mais elevadas de infecções disseminadas para vírus da encefalomielite equina venezuelana (*Alphavirus*) após uma ingestão de uma refeição de sangue infectado quando os mosquitos foram alojados a 19°C em comparação com 26°C. E Westbrook et al., (2010) descobriram que a infectividade do Chikungunya para *Ae. albopictus* aumentou com uma diminuição da temperatura de criação (18°C > 24°C > 32°C).

Contrariamente, ao que visto para o *Alphavirus* e CHIKV, em um trabalho anterior Tesla et al., (2018), demonstraram que as temperaturas mais quentes (29 °C) com uma faixa térmica de 22,7 a 34,7 °C, são mais permissivas para a infecção pelo vírus Zika em mosquitos *Ae. Aegypti*,

enquanto as temperaturas mais frias limitam a fuga e a disseminação do vírus no intestino médio (Ferreira et al., 2020).

Para uma transmissão bem-sucedida, os flavivírus são absorvidos pela picada de um mosquito vetor quando ele se alimenta de sangue de um hospedeiro infeccioso. Para que esse processo aconteça, o vírus necessita escapar dos processos fisiológicos de proteção contra patógenos, que ao serem burlados, permitem uma infecção persistente e duradoura no mosquito (Kumar et al., 2018). O vírus infecta principalmente as células do intestino médio do mosquito e, em seguida, se espalha para os outros tecidos, atingindo as glândulas salivares (Franz et al., 2015; Amaral et al., 2012). O epitélio intestinal dos *Ae. aegypti* também possui a capacidade de controlar o crescimento da sua microbiota intestinal por meio das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Oliveira et al., 2011).

A alimentação com sangue desencadeia uma cascata de eventos que controlam negativamente o nível de ROS no intestino, na qual molda a imunidade do inseto e a competência vetorial de mosquito a patógenos (Gandara et al., 2011). Após 24 horas do repasto sanguíneo, inúmeros genes do sistema imunológico são expressos possivelmente para tentar reduzir os danos aos tecidos, desencadeados por bactérias presentes no lúmen intestinal (Oliveira et al., 2011).

Bactérias associadas com o intestino de várias espécies de mosquitos têm sido extensivamente estudadas em populações selvagens e criadas em laboratório (Desiely et al., 2010). Relatórios sugerem que essas bactérias parecem estimular o sistema imunológico dos mosquitos e indiretamente aumentar a proteção contra parasitos causadores de malária (Dong et al., 2009; Rodrigues et al., 2010)

No entanto, pouco se sabe sobre os papéis funcionais desses microrganismos na digestão dos alimentos. Gusmão et al., (2010) sugeriram que as bactérias presentes no divertículo ventral do intestino do *Aedes aegypti* podem desempenhar um papel no metabolismo da glicose. Seu papel na digestão do sangue ainda não foi determinado, mas sabe-se que as populações bacterianas aumentam substancialmente após o repasto sanguíneo, sugerindo um potencial contribuição para o processo digestivo, conforme observado em outros insetos (Cazemier et al., 1997).

Em nosso estudo anterior, Ferreira et al., (2020) verificaram que a infecção produtiva pelo vírus Zika é mais eficaz quando os mosquitos são alojados em temperaturas mais altas. Resultados similares também foram observados para outros flavivírus (Dohm et al., 2002; Reisen et al., 2006). No mesmo estudo, foi observado um notável enriquecimento tardio de transcritos envolvidos no processo de digestão, oxidação e redução do sangue quando os mosquitos foram mantidos a temperaturas mais frias.

Com base nesses resultados, levantamos a hipótese que, uma vez que a variação da temperatura afeta a digestão do sangue e conseqüentemente a respostas imunológicas e produção do estresse oxidativo, nós propomos que esses mecanismos são mediados pela modulação da microbiota.

Para investigar as alterações fisiológicas desencadeadas pela temperatura em mosquitos frente o bacterioma íntegro e reduzido por tratamento com coquetel de antibióticos, quantificamos transcritos de genes que codificam proteínas envolvidas na digestão, mensuramos as taxas de digestão do sangue e o conteúdo de proteínas no intestino médio de mosquitos *Ae. aegypti* expostos a três temperaturas (20, 28 e 36°C) por 24 e 48 horas após a alimentação de sangue (ABF).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Aedes aegypti*: biologia e ecologia

O mosquito *Aedes aegypti* é pertencente à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* (Linnaeus, 1762; Consoli & Oliveira, 1994). Sua origem remonta à África subsaariana, tendo sido introduzido no continente americano durante o período de colonização por meio de ovos depositados em recipientes de água presentes em navios que realizavam a rota África-Europa-América (Powel e Tabachnick, 2013).

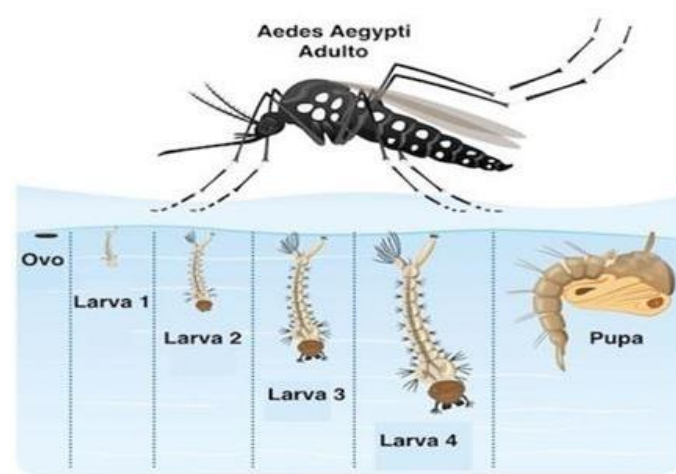
Graças à sua notável capacidade de adaptação a ambientes modificados pelo homem e climas caracterizados por chuvas e altas temperaturas, o *Aedes aegypti* se dispersou amplamente por regiões tropicais e subtropicais (Dye, 1992). Devido às mudanças climáticas e ambientais, já existem registros da presença dessa espécie em territórios antes livres dela, como nos Estados Unidos da América e em alguns países europeus (Schaffner et al., 2013; Fredericks et al., 2014). Essa disseminação é preocupante e destaca a necessidade urgente de controlar a transmissão das arboviroses associadas ao *Aedes aegypti*.

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* inclui quatro fases: ovo, larva (com 4 estádios: L1, L2, L3 e L4), pupa e adultos (Figura 3). A fêmea pode depositar seus ovos em até 10 locais diferentes. A escolha do local para a postura dos ovos é influenciada por fatores como pouca luz, umidade e presença de outras larvas (Rey e O'Connell, 2014). Os locais de postura são recipientes encontrados dentro e ao redor das casas, como vasilhas, caixas d'água e pneus. Os ovos são depositados individualmente em superfícies úmidas próximas à água e podem sobreviver a

períodos de seca por mais de um ano, o que facilita a sobrevivência e dispersão da espécie, dificultando seu controle (Figueiredo e Fonseca, 1966).

O crescimento das larvas até a fase de pupa depende da temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no local de postura (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Após os quatro estágios, a larva se transforma em pupa e passa pela metamorfose para se tornar um adulto (Consoli & Oliveira, 1994; Forattine, 2002). O *Ae. aegypti* é um mosquito escuro com listras brancas pelo corpo e um desenho em forma de lira no dorso que pode ser visto a olho nu. As listras brancas alternam com listras escuras na região posterior da cabeça e nos segmentos abdominais. As patas apresentam anéis brancos contrastando com sua cor escura (Gadelha & Toda, 1985; Rey, 2001), como ilustrado na Figura 3.

**Figura 3 - Ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti*.** Fonte: <https://www.tuasaude.com/ciclo-de-vida-do-aedes-aegypti/> (acessado em 06/06/23).



O mosquito adulto vive em média 30 dias e a fêmea pode colocar entre 50 e 200 ovos por vez (Gadelha & Toda, 1985). Ela copula apenas uma vez e armazena os espermatozoides em sua spermateca para fertilizar os ovos ao longo de sua vida (Consoli & Oliveira, 1994). Tanto os machos quanto as fêmeas de *A. aegypti* se alimentam de soluções açucaradas ou outras substâncias, incluindo néctar das plantas, como fonte de nutrientes. O acúmulo dos metabólitos como glicogênio e triglicérides são determinantes para a produção de energia e longevidade (Nayar & Sauerman, 1973).

No entanto, as fêmeas precisam das proteínas presentes no sangue do hospedeiro para a maturação dos ovos. A digestão do sangue fornece os aminoácidos necessários para o desenvolvimento dos oocistos nos ovários (Clements, 2000). A alimentação de sangue ocorre principalmente durante o dia, nas primeiras horas da manhã e no final da tarde (Eiras, 2005;

Ministério da Saúde, 2007). A maioria dos vertebrados, incluindo humanos, servem como fonte de sangue para as fêmeas de *A. aegypti* (Eiras, 2005).

O intervalo médio entre a alimentação de sangue e a postura é de três dias em condições adequadas de temperatura (25°C) e umidade relativa (75%) (Eiras, 2005). Se a fêmea for perturbada durante a alimentação de sangue, ela foge e ataca outro hospedeiro até ficar completamente saciada. Ela pode ingerir até quatro vezes o seu próprio peso em sangue em poucos minutos para adquirir a proteína necessária para produzir ovos (Clements, 2000). Isso tem implicações epidemiológicas, pois uma fêmea infectada com o vírus da dengue ou da febre amarela pode disseminar os patógenos ao se alimentar de vários hospedeiros (Eiras, 2005).

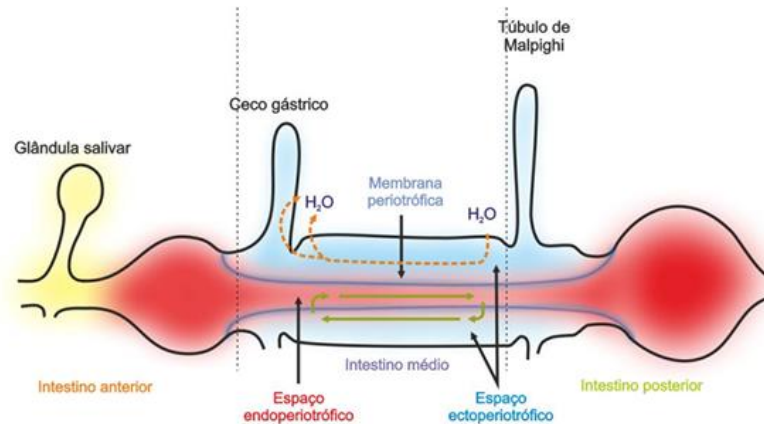
## 2.2 Digestão do sangue

Devido às suas necessidades fisiológicas, os insetos hematófagos consomem grandes quantidades de sangue em uma única refeição. O sangue é rico em proteínas como hemoglobina, albumina e imunoglobulinas e o processo de digestão do sangue libera peptídeos, aminoácidos e o grupo heme no lúmen intestinal desses insetos (Horn et al., 2009). Esses metabólitos são aproveitados em processos anabólicos de mosquitos, como vitelogênese e postura de ovos (Raikhel et al., 1992). O sangue ingerido é armazenado no intestino médio posterior, onde as proteínas são digeridas em aminoácidos (Horn et al., 2009).

A lise dos glóbulos vermelhos, contendo hemoglobina (a principal proteína do sangue), é o primeiro passo na digestão (Horn et al., 2009). A digestão em insetos é mediada por enzimas proteolíticas e ocorre no canal digestivo, que é dividido em três regiões: o intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994), como ilustrado na Figura 4.

- i. O intestino anterior, desempenha um papel crucial na ingestão, transporte e armazenamento de alimentos;
- ii. O intestino médio, é responsável pela síntese de enzimas e componentes da matriz peritrófica (MP), bem como a digestão e absorção de nutrientes;
- iii. E por fim o intestino posterior, controla a composição da hemolinfa e é responsável pela expulsão e eliminação do conteúdo não digerido do intestino médio e dos túbulos de Malpighi.

**Figura 4 - Representação esquemática do trato intestinal de insetos.** Fonte: Da Silva Neto et al., 2013.



As peptidases, incluindo tripsina, desempenham papéis importantes no desenvolvimento de insetos, incluindo digestão de nutrientes, oogênese, metamorfose e defesa (Terra e Ferreira, 1994; Borowsky e Mahmood, 1995; Nakajima et al., 1997).

A indução da biossíntese de tripsina nas células epiteliais do intestino médio é um processo de duas etapas envolvendo a sua produção imediata e tardia.

A primeira etapa, estimulada por proteínas solúveis logo após a alimentação, envolve a tradução de transcritos de mRNA armazenados em células epiteliais para produzir "tripsina precoce" (tripsina imediata) (Borovsky et al., 1988; Borovsky et al., 1995). A segunda fase ocorre aproximadamente 7 a 9 horas após a alimentação e é ativada por um peptídeo digestivo imediato desencadeado por tripsina, que estimula a síntese de novos transcritos de mRNA para "tripsina tardia", otimizando assim a digestão (Felix & Freyvogel, 1991; Noriega & Wells, 1999).

As ações das aminopeptidases, carboxipeptidase A e carboxipeptidase B, são estimuladas pela ingestão de sangue e são mais ativas durante o pico de proteólise da tripsina dentro de 20 a 24 horas após sua ingestão pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (Noriega et al., 1996; Noriega et al., 2002).

As fêmeas são capazes de ingerir grandes quantidades de sangue e passar pelo menos 36 horas convertendo os aminoácidos para a produção de ovos. O hábito do repasto de sangue dos mosquitos não só fornece proteínas sanguíneas e nutrientes essenciais para a oviposição e saúde reprodutiva, mas também permite que patógenos se estabeleçam e se transmitam aos humanos através de hospedeiros artrópodes (Clements et al., 1992; Chaves et al., 2010).

Assim, tanto o comportamento de alimentação de sangue, quanto a preferência por refeição de sangue do hospedeiro são críticos, pois o aumento das taxas de oclusão leva ao aumento da capacidade do vetor e, portanto, os vetores são mais propensos a adquirir e transmitir patógenos (Utrilla et al., 2021).

### 2.3 Microbiota intestinal de culicídeos

Nos culicídeos, as principais estruturas colonizadas por bactérias são o lúmen e meio intracelular do intestino médio (Douglas, 2011), embora outras estruturas como divertículos (Gusmão et al., 2007), glândulas salivares (Sharma et al., 2014), túbulos de Malpighi e ovários (Gusmão et al., 2010) também podem abrigar esses microrganismos. Bactérias associadas ao intestino de várias espécies de mosquitos têm sido extensivamente estudadas em populações selvagens e criadas em laboratório (Desiely et al., 2010).

Pesquisas recentes sugerem que essas bactérias parecem estimular o sistema imunológico dos mosquitos e indiretamente aumentar a proteção contra parasitas (Dong et al., 2009; Rodrigues et al., 2010). O sistema imunológico inato do mosquito está envolvido principalmente na defesa contra microrganismos, incluindo o controle da microbiota natural do mosquito, que também afeta a suscetibilidade do mosquito a patógenos como a malária, e é responsável por fornecer níveis básicos de ativação das vias de sinalização imune (Xi et al., 2008).

A microbiota residente no intestino do mosquito afeta os principais processos físicos associados à transmissão de patógenos (Guégan et al., 2018; Pike et al., 2017). Estudos observaram que a microbiota intestinal reduz significativamente a replicação do DENV em vetores (Xi et al., 2008; Ramirez et al., 2014), enquanto a depleção com antibióticos torna os mosquitos mais susceptíveis à infecção (Xi et al., 2008).

Os simbiossitos mais abundantes são do gênero *Wolbachia*, que é transmitida verticalmente e está presente em cerca de 60% dos insetos (Oliveira et al., 2015). Estirpes específicas de *Wolbachia* reduzem a taxa de sobrevivência de moscas-das-frutas e previnem a infecção por vírus de RNA, possuindo um papel importante no controle de arbovírus como a dengue (Min e Benzer, 1997; Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008).

Estudos mostram que, ao reduzir a diversidade de bactérias intestinais, os mosquitos se tornam mais susceptíveis à infecção, algumas bactérias específicas têm sido associadas a um efeito direto na competência vetorial. Por exemplo, *Enterobacter sp.* (Esp\_Z) em *Anopheles gambiae* e *Chromobacterium* (Csp\_P) em *Ae. aegypti* reduzem significativamente a suscetibilidade às infecções de *Plasmodium falciparum* e DENV, respectivamente (Cirimotich et al., 2011; Ramirez et al., 2014).

A diferença mais marcante entre machos e fêmeas é o suprimento de sangue, que por si só é um fator que altera as comunidades bacterianas presentes no intestino. Após a alimentação

sanguínea (ABF), a microbiota intestinal do mosquito sofre alterações como diminuição da diversidade e aumento da abundância relativa de algumas famílias, como *Enterobactericea* em *An. gambiae* (Wang et al., 2011; Coon et al., 2014). Essa dinâmica ocorre devido à síntese da matriz peritrófica (MP), que confina famílias bacterianas específicas no espaço peritrófico devido a afinidade dessas bactérias com a MP ou até mesmo com as células epiteliais do intestino. Nos dias seguintes à alimentação, a MP é eliminada dos insetos, levando consigo a maior parte das bactérias que originaram essa diversidade do ambiente intestinal (Rodgers et al., 2017).

As propriedades fisiológicas e bioquímicas dos sistemas digestivos de diferentes espécies de insetos, como condições de pH, potencial redox e enzimas digestivas, têm o potencial de influenciar a composição das comunidades microbianas intestinais (Dillon e Dillon, 2004).

Outros fatores, como a ecologia, distribuição geográfica, habitat, criadouro e hospedeiro preferido do mosquito, também são capazes de afetar a comunidade microbiana intestinal, pois determinam a distribuição dos nutrientes disponíveis e presença de bactérias no lúmen intestinal do mosquito em condições naturais (Minard et al., 2013).

Foi demonstrado que a fonte de refeição sanguínea tem um efeito significativo na diversidade microbiana no intestino do artrópode (Kozlova et al., 2021). Muturi e colaboradores et al. (2021) observaram diferenças significativas na diversidade alfa (índice de Shannon) da microbiota intestinal dos mosquitos *Aedes* frente a diferentes fontes de alimentação, como ilustrado na Tabela 1.

**Tabela 1 - Características básicas dos grupos de microrganismos intestinais de *Ae. aegypti* com base em sequências metagenômicas 16S (N = números).** Fonte: Sarma et al., 2022.

Grupos	N, leituras mapeadas	Leituras por amostra, média ± SE	Faixa	N, Espécie	N, Gênero	N, Família	N, Ordem	N, Classe	N, Filo	Riqueza OTU, Média ± SE	Diversidade de Shannon, Média ± SE	Diversidade de Simpson, Média ± SE
alimentados com sangue humano	3.979.749	898.396 ± 515.266	1.533.754–217.166	1729	533	160	57	25	13	358,71 ± 29,25	5,75 ± 0,35	0,93 ± 0,03
Alimentado com sangue não humano	1.052.542	389.026 ± 179.033	723.077–183.328	1232	437	140	49	20	10	257,45 ± 48,75	4,17 ± 0,77	0,76 ± 0,06
Não alimentado	1.292.391	634.137 ± 511.771	1.904.689–98.024	1128	385	131	44	16	6	270,90 ± 35,42	4,23 ± 0,64	0,82 ± 0,05
Total	6.324.682	180.705,2 ± 28.837,21		2228	656	184	63	27	15			

## 2.4 *Aedes aegypti* e a transmissão de arboviroses

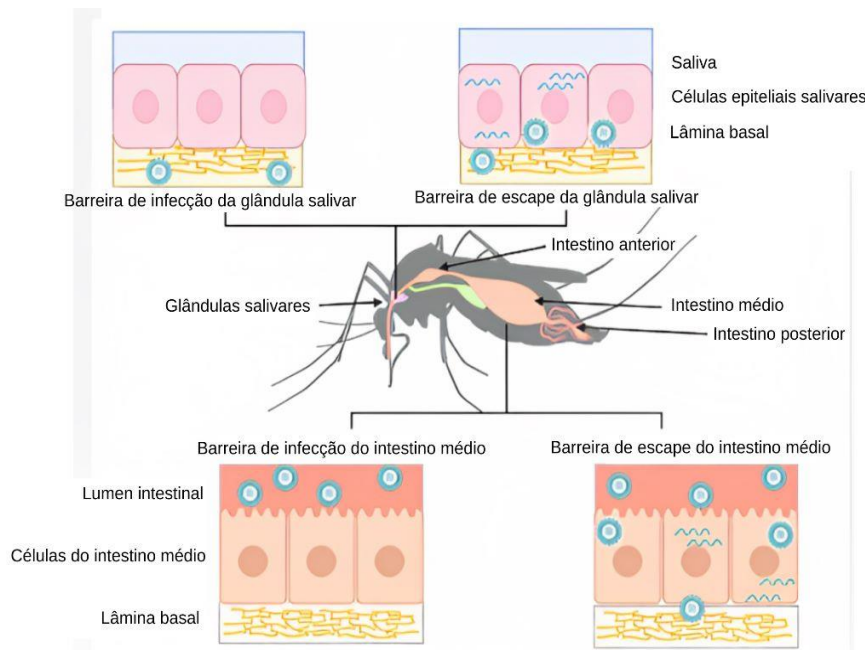
O *Aedes aegypti* desempenha um papel crucial na transmissão de arboviroses, que são doenças virais transmitidas por artrópodes que representam questões importantes de saúde pública. Essas arboviroses são causadas por vírus da família Flaviviridae e gênero *Flavivirus*, como: Dengue (*DENV*) (Viana et al., 2013), Zika vírus (*ZIKV*) (Zanluca et al., 2015) e febre amarela (*YFV*) (Monath, 2001). Outro importante vírus transmitido por *Ae. Aegypti* é o Chikungunya (*CHIKV*) (Lounibos et al., 2016), que pertence à família Togaviridae. Ambas as famílias possuem genoma de RNA de cadeia simples positiva. A forma mais comum de transmissão do vírus é através da picada do mosquito *Ae.aegypti*.

O ciclo de transmissão ocorre quando o mosquito ingere sangue contendo o vírus logo após picar uma pessoa infectada. Para que se tenha uma infecção persistente em insetos, os vírus precisam interagir com tecidos e realizar processos fisiológicos contra a defesa contra patógenos (Araújo et al., 2012). Quando esses processos são burlados, a infecção tem alta probabilidade de ocorrer. Primeiro, o vírus começa a se replicar no epitélio do intestino médio (Cherry & Perrimon, 2004).

O sistema imunológico do mosquito desempenha um papel crucial neste processo, consistindo em respostas celulares e humorais que interagem para o controle da infecção (Schmid-Hempel, 2005), agindo diretamente na relação entre o próprio mosquito e o patógeno que ele transmite. Um dos aspectos mais analisados é a existência de obstáculos teciduais no vetor que o vírus precisa vencer para ser transmitido a um novo hospedeiro.

Esses obstáculos englobam a barreira de infecção do intestino médio, a barreira de fuga do intestino médio, a barreira de infecção das glândulas salivares e a barreira de fuga das glândulas salivares. Para ser bem-sucedido, o vírus deve ultrapassar a barreira de infecção do intestino médio (MIB), possuindo mecanismos para penetrar nas células epiteliais e se replicar. Posteriormente, ele deve vencer a barreira de escape intestinal (MEB), na qual o vírus deve ser capaz de atravessar a camada basal que envolve o epitélio intestinal para infectar e replicar nos tecidos adjacentes. Similarmente, o vírus deve ultrapassar as barreiras das glândulas salivares (TB), pela qual o arbovírus deve passar para infectar, replicar na glândula salivar, invadir o lúmen da glândula salivar e finalmente ser transmitido (Carpenter e Clem, 2023) conforme mostrado na Figura 5.

**Figura -5 Caminho do vírus a ser percorrido para infectar o mosquito *Aedes aegypti*.**  
Crédito da foto: Biorender.com, Fonte: Carpenter e Clem, 2023.



A ocorrência de arboviroses é determinada por vários fatores, incluindo a capacidade vetorial (CV), que é o componente entomológico responsável pela taxa de reprodução básica da infecção viral (Garret-Jones, 1964). Essa taxa representa o número médio de novos casos gerados a partir de um único caso ao longo do tempo. A CV reflete a habilidade de uma população de vetores em transmitir um patógeno específico para uma população de hospedeiros suscetíveis (Klempner et al., 2007). Originalmente, o termo foi usado para descrever o número de infecções por *Plasmodium* que uma população de anofelinos pode espalhar em uma população humana suscetível em um determinado período de tempo e espaço (Garret-Jones, 1964). Mais recentemente, o termo também tem sido utilizado da mesma forma para arbovírus e seus vetores (Anderson e Rico-Hesse, 2006).

## 2.5 *Aedes aegypti* e a necessidade de controle vetorial

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus dengue (*DENV*) e transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, como o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*. É considerada uma doença tropical negligenciada e tem grande impacto global, pois cerca de 3,9 bilhões de pessoas estão em risco de contrair a doença (Brady et al., 2012). Mais de 100 países são endêmicos para a dengue, com cerca de 390 milhões de casos registrados anualmente em todo o mundo (Bhatt et al., 2013).

O controle da transmissão da dengue é baseado na eliminação do mosquito vetor. Isso é feito principalmente através do uso de larvicidas e inseticidas (Kantor, 2016). No entanto, essa prática pode levar ao surgimento de mosquitos resistentes aos inseticidas, tornando necessário o uso de outras estratégias de controle.

Uma dessas estratégias é o controle biológico com a bactéria *Wolbachia*. Essa bactéria intracelular é capaz de bloquear a transmissão da dengue (Aliota et al., 2016). Ela é microinjetada em embriões de *Ae. aegypti* e, uma vez estabelecida, é transmitida para as próximas gerações (Ormaetxe et al., 2011). Outra opção é o controle genético, que envolve a criação de mosquitos geneticamente modificados para reduzir sua população. Isso pode ser feito através da esterilização de machos ou desenvolvendo mosquitos que são resistentes ao parasita (Alphey et al., 2013).

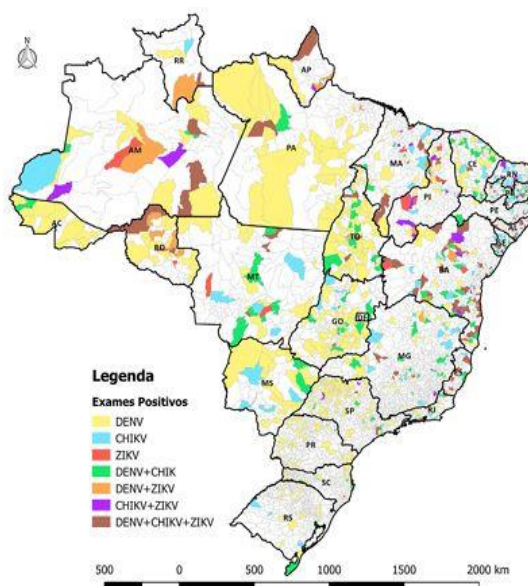
Em 2015, além dos cerca de 1,5 milhões de casos notificados de dengue e 17,5 mil de febre chikungunya, o vírus zika (*ZIKV*) também foi introduzido no país (SVS, 2015). A febre zika tem muitas semelhanças com a dengue, mas ganhou destaque na saúde pública devido às evidências de sua atuação no sistema nervoso (Calvet et al., 2016).

Análises das cepas do vírus isoladas no Brasil mostraram que o *ZIKV* pode atravessar a placenta e causar microcefalia ao infectar células progenitoras do córtex e induzir a morte celular por apoptose e autofagia. Isso prejudica o neurodesenvolvimento do embrião em camundongos (Cugola et al., 2016). Análises dos genomas do vírus zika coletados durante o surto de 2015 mostraram que a introdução do vírus no Brasil ocorreu através das ilhas do Pacífico, onde foram relatadas epidemias entre 2013 e 2014 (Faria et al., 2016; Musso et al., 2014).

Desde o primeiro caso confirmado no Brasil em março de 2015 (Zanluca et al., 2015), outros países da América Latina e Central começaram a confirmar os primeiros casos da doença em seus territórios (Paho, 2016). Em menos de um ano, o vírus zika se espalhou por todo o continente de forma mais agressiva do que a dengue e a Chikungunya

. De acordo com o boletim epidemiológico mais recente, em 2022 já foram confirmados no Brasil 1.450.270 casos de dengue, 174.517 de febre Chikungunya e 9.204 de febre pelo vírus zika (SVS, 2022), como ilustrado na Figura 6.

**Figura 6 - Distribuição dos exames positivos para DENV, CHIKV e ZIKV, por município de residência no Brasil.** Fonte: Sistema GAL-Nacional, atualizado em 20/2/2022.



As consequências frequentes dessas arboviroses no país afetam a economia, devido aos custos envolvidos no controle da transmissão e no atendimento aos pacientes infectados (Martelli et al., 2015); a sociedade, ao causar altas taxas de morbidade e mortalidade na população (Gubler, 2002); e o meio ambiente, pelo uso de químicos no controle vetorial (David et al., 2013). Todas essas evidências enfatizam a necessidade de novas medidas para conter a disseminação dessas doenças através do controle dos vetores.

## 2.6 Determinantes da competência vetorial

Espécies vetores adaptados a ambientes antropogênicos conseguem ser disseminados pela mobilidade e comércio humanos, e assim se tornam graves ameaças para a saúde pública (Lounibos, 2002). Os humanos têm sido essencialmente eficazes na disseminação de mosquitos em distâncias intercontinentais, como evidenciado pela entrada do vetor da malária *Anopheles arabiensis* da África Ocidental no Brasil na década de 1930 e a disseminação cosmopolita dos vetores de doença *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* (Lounibos, 2002).

O *Ae. aegypti* doméstico é capaz de ingerir sangue frequentemente devido ao seu ciclo gonotrófico, que eleva o seu potencial como vetor de arbovírus (Gubler & Duane, 1998). Desta forma, existe uma vetorização de arbovírus em ciclos humanos-mosquitos na falta de

reservatórios zoonóticos (Gubler & Duane, 1998). As grandes manifestações de doenças propagadas por mosquitos são influenciadas por dois fatores:

- i) os intrínsecos (como a genética vetorial, competência do vetor e do hospedeiro e traçados histórico de vida do vetor);
- ii) os extrínsecos (temperatura, precipitação e urbanização do ambiente).

Estes fatores possuem impacto na atividade dos vírus e na biologia dos mosquitos, através de interações complexas e interconectadas entre eles (Kramer et al., 2015). Dentre o leque de fatores extrínsecos que potencialmente afetam a resistência do mosquito, a temperatura desempenha um papel central (Delatte et al., 2009; Padmanabha et al., 2012; Carrington et al., 2013). Os mosquitos são ectotérmicos e a temperatura ambiental afeta profundamente diversas facetas da fisiologia do mosquito e sua história de vida (Adamo et al., 2011; Carrington et al., 2013b).

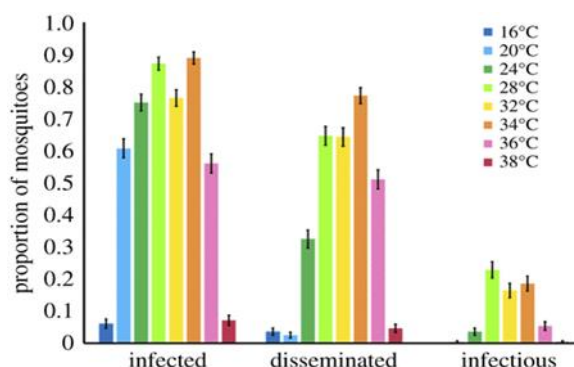
Há evidências abundantes de que pequenas alterações na temperatura ambiente podem moldar significativamente resistência e virulência (Murdock et al., 2012). Da mesma maneira, as taxas de desenvolvimento de alguns patógenos transmitidos por mosquitos, tais como Dengue (Lambrechts et al., 2011; Carrington et al., 2013a), Nilo Ocidental (Kilpatrick et al., 2008) e Malária (Mordecai et al., 2013) são influenciados fortemente pela temperatura.

Tesla et al. (2018) demonstraram que a competência vetorial tem uma relação unimodal com a temperatura, com um ótimo estimado em 30,6°C e um mínimo e máximo térmicos estimados de 22,9°C e 38,4°C. A infecciosidade do ZIKV foi limitada por diferentes mecanismos no mínimo e no máximo térmico.

Temperaturas baixas limitaram a fuga e a disseminação no intestino médio, resultando em uma proporção menor da população de mosquitos infecciosos. Temperaturas mais altas foram muito permissivas para a infecção pelo ZIKV, resultando em 95% e 100% de infecção entre os mosquitos sobreviventes a 36°C e 38°C, respectivamente (Tesla et al., 2018).

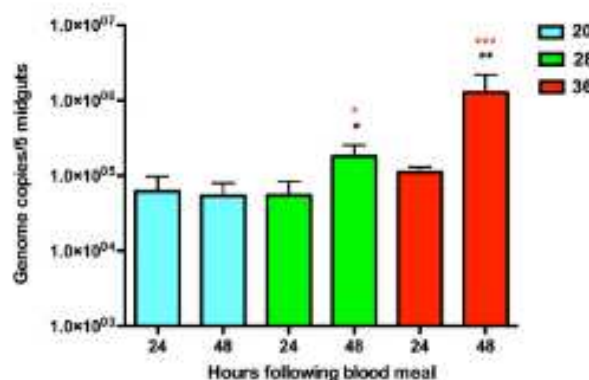
Na figura observa-se três momentos distintos do estabelecimento da infecção por Zika em mosquito *Ae. Aegypti*: primeiro, a probabilidade dos mosquitos se infectarem; segundo a probabilidade de as partículas virais alcançarem a hemolinfa e se espalharem para os órgãos secundários; e terceiro, quando essas partículas chegam à glândula salivar tornando o mosquito infeccioso. Em baixas temperaturas houve uma diminuição nos três processos e em temperaturas altas no intervalo de 24 a 34°C houve uma maximização desses processos (Tesla et al., 2018) (Figura 1), que volta a reduzir em temperaturas acima de 36 °C.

**Figura 1 - Efeito da temperatura na proporção de mosquitos infectados, com infecções disseminadas e infecciosas.** Fonte: Tesla et al., 2018.



No estudo de Ferreira et al. (2020) (Figura ), demonstram que há, um aumento no número de cópias virais encontrados por intestino de mosquito, após a infecção nas temperaturas de 28 e 36°C. Contrariamente, na temperatura de 20°C não há aumento no número de cópias virais, o que indica que em temperaturas maiores há uma maior multiplicação viral.

**Figura 2 - Quantificação do RNA do ZIKV em mosquitos *Aedes aegypti* infectados abrigados a 20, 28 e 36°C em dois momentos, 24 e 48 h.** Fonte: Ferreira et al.,2020.



Há diversos indícios que a temperatura impacta na modulação de importantes vias de resposta imune, tais como melanização (Murdoch et al., 2012), RNA de interferência (RNAi) (Adelman et al., 2013), fagocitose (Murdoch et al., 2012), via da imunodeficiência (IMD) (Muturi et al., 2012) e resposta proporcionada por receptores do tipo *Toll* (Muturi et al., 2012). Porém existem algumas incógnitas sobre como a temperatura modula essas respostas.

Esse efeito da temperatura sobre a transmissão do patógeno pode ter contribuído com a recente emergência do Zika nas Américas em 2015. Neste período, o El Niño criou condições climáticas excepcionais durante o inverno (Paz e Semenza, 2016). Segundo a Administração

Nacional Oceânica e Atmosférica dos EUA, temperaturas mais altas foram registradas no norte e leste da América do Sul, acompanhadas por uma seca intensa, durante o segundo semestre de 2015 (National Oceanic and Atmospheric Administration. Global analysis - annual 2015). A rápida disseminação do vírus Zika pode ter acontecido pelas condições extremas que podem ser uma manifestação da mudança climática.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho é analisar o impacto das bactérias intestinais sobre a retenção de sangue no intestino médio de *Aedes aegypti* e a respostas dos transcritos envolvido no processo de digestão do inseto em diferentes temperaturas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da temperatura na proliferação das bactérias intestinais após a refeição de sangue;
- Analisar as atividades enzimáticas e expressão gênica de genes associados a resposta metabólica em diferentes temperaturas na presença do bacterioma íntegro e modificado por antibiótico.

### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Declaração de ética.**

A aprovação para o uso de camundongos (*Mus musculus*) na alimentação de mosquitos foi obtida do Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa (número de referência 21/2023).

#### **4.2 Criação dos mosquitos**

Mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem PPCampos - Campos dos Goytacazes) foram criados e mantidos em condições controladas temperatura ( $25 \pm 2$  °C), umidade relativa ( $60 \pm 2\%$ ), e fotoperíodo 12 h:12 h (luz:escuro) (Percival Scientific) no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. Os ovos foram eclodidos em bandejas contendo água deionizada e uma vez emergidas, as larvas foram alimentadas com ração de tartaruga (ReptoLife). As pupas foram transferidas para as gaiolas previamente higienizadas com álcool 70% e uma solução de sacarose 10% foi fornecida *and libitum* para os adultos emergentes. A produção de ovos foi estimulada depois de uma refeição de sangue em camundongos anestesiados 0,8 mL (2%) de xilazina e 0,2 mL (10%) de cetamina com a finalidade de manter a colônia.

### 4.3 Tratamento com antibiótico e alimentação dos mosquitos

Estoques de soluções dos antibióticos ampicilina (Sigma®, A0166), enrofloxacin (Sigma®, 17849) e tetraciclina (Sigma®, T3258) foram preparados a uma concentração de 10 mg/mL e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Durante os experimentos, os mosquitos recém emergidos foram mantidos em fotoperíodo controlado 12 h:12 h (luz:escuro) (Percival Scientific) a  $28^{\circ}\text{C}$  e alimentados com 6 mL de solução fresca e estéril de sacarose 10% misturada com o coquetel de antibióticos: ampicilina, tetraciclina e enrofloxacin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) na concentração de 300 µg/mL. Os mosquitos do grupo controle receberam solução de sacarose 10% estéril sem o coquetel de antibióticos. Ambos os grupos foram submetidos a essa refeição por 48 horas.

Após as 48 horas da refeição com e sem o coquetel de antibióticos, os mosquitos com 3-4 dias de idade, foram privados de alimentação por seis horas, e imobilizados com  $\text{CO}_2$ . Duzentos e quarenta fêmeas foram isoladas em banho de gelo e colocadas em gaiolas apropriadas. Seis camundongos (*Mus musculus*) anestesiados foram expostos às fêmeas. O repasto de sangue deu-se por 30 minutos.

Após a alimentação, quarenta mosquitos ingurgitados foram randomicamente dispostos em seis gaiolas e distribuídos em três temperaturas (20, 28 e  $36^{\circ}\text{C}$ ) sob condições de fotoperíodo controlados 12 h:12 h (luz:escuro) (Percival Scientific). A solução de sacarose 10% foi fornecida aos mosquitos no decorrer de toda etapa experimental (48 horas). Três réplicas biológicas foram realizadas.

#### 4.4 Mensuração da taxa de digestão

A quantificação de proteínas totais foi avaliada utilizando o método de Bradford (1976). Para isso, os mosquitos foram expostos a dissecação sob um microscópio estereoscópico, utilizando uma lâmina de vidro e cavidade dupla contendo tampão fosfato salino (0,1 M pH 7,4) (PBS) estéril. Quinze intestinos médios foram dissecados 24 e 48 horas depois do repasto de sangue e transferidos para um tubo de 1,5 mL contendo 35  $\mu$ L de PBS. O conteúdo do tubo foi homogeneizado com um pistilo e centrifugado a 8 000 x g por 5 minutos. O teste foi realizado incubando 3  $\mu$ L do sobrenadante com 140  $\mu$ L de reagente de Bradford (1 X) por dez minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi mensurada a 595 nm em leitor de microplaca (Molecular Devices/VersaMax). A albumina de soro bovino (BSA) foi usada como padrão para construção de uma curva padrão com concentrações de 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 g/L.

Visando uma avaliação mais detalhada, as taxas de proteínas específicas, albumina e tripsina, foram determinadas em cada temperatura. A mensuração da albumina foi realizada através do *kit* Albumina monoreagente (Bioclin, K040), que tem como princípio de ação o verde de bromocresol. Para isso, foi utilizado o sobrenadante preparado como descrito para a mensuração de proteínas totais. O teste foi realizado incubando 5  $\mu$ L do sobrenadante com 500  $\mu$ L de verde de bromocresol por dez minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi mensurada a 630 nm em leitor de microplaca (Molecular Devices/VersaMax). A curva de calibração foi construída com concentrações de albumina de 0, 4,75, 9,5, 19,0 e 38,0 g/L). Os resultados foram expressos em g/dL.

A atividade da tripsina foi determinada utilizando N-alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) como substrato na concentração final de 0,36 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M e CaCl<sub>2</sub> 20 mM (pH 8,0). O teste foi realizado incubando 20  $\mu$ L do sobrenadante com 50  $\mu$ L de Tris-HCl 0,1 M e CaCl<sub>2</sub> 20 mM (pH 8,0) e 30  $\mu$ L de BAPNA 1,2 mM por 10 minutos a 25°C. Após a p-nitroanilina ser formada, a mensuração foi realizada a 410 nm em leitor de microplaca (Molecular Devices/VersaMax).

Dois controles foram preparados, um deles substituindo a amostra e outro a enzima por tampão Tris-HCl 0,1 M e CaCl<sub>2</sub> 20 mM (pH 8,0). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1  $\mu$ mol de BAPNA por minuto sob parâmetros determinados, usando um coeficiente molar de 8,800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

Todos os testes foram conduzidos em triplicata, em três experimentos independentes.

#### 4.5 Extração de DNA genômico total e quantificação da carga bacteriana por qPCR

Para determinar o número de cópias de DNA genômico bacteriano total das amostras nas diferentes temperaturas, o DNA genômico total foi extraído de 30 intestinos dissecados 24 h após a ingestão de sangue usando o *Kit* GenElute Bacterial Genomic - DNA SIGMA® (NA2110-1KT), seguindo as recomendações do fabricante. A pureza e a concentração das amostras foram determinadas pela leitura em Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific®) e as amostras foram armazenadas a -20°C até análises posteriores.

Para a quantificação da carga bacteriana empregou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR). A detecção foi realizada pelo sistema *SYBR Green Master Mix* (Promega®), utilizando o DNA genômico total para amplificar a região gênica bacteriana de interesse. As reações foram realizadas seguindo o protocolo do *kit* GoTaq® qPCR (Promega®) para volume final de reação de 10 µL. Os componentes da reação incluíram: 5 µL de GoTaq qPCR (2X), 1,0 µL (2 mM) do par de primer 16S (R: GACTACHVGGGTATCTAATCC e F: CCTACGGGNGGCWGCAG) (KLINDWORTH et al.,2013), 0,2 µL de CXR Dye (0,015 mM), 1,3 µL de água livre de *nuclease* e 2,5 µL de DNA genômico (concentrações variadas).

O programa da qPCR consistiu nas seguintes etapas: amplificação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Para a curva de dissociação, as amostras foram submetidas à desnaturação gradual com aumento de 1°C a partir de 60°C até 95°C. Todas as reações foram feitas em duplicatas e duas réplicas biológicas.

O cálculo do número de cópias do DNA genômico bacteriano foi realizado pelo método da curva padrão absoluta. Neste método, as quantidades absolutas dos padrões devem ser conhecidas inicialmente por métodos independentes. Para isso, em um tubo de ensaio estéril a bateria *E.coli* (ATCC 35218) foi inoculada em 5 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) e esse inóculo foi deixado *overnight* por 16h a 37°C sob agitação de 180 rpm. Uma alíquota de 20 µL foi transferida para uma placa de 96 poços contendo 180 µL de PBS estéril e o conteúdo foi homogeneizado com pipeta e diluído em série ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ). Uma alíquota de 10 µL das diluições foram transferidas para placa de petri contendo LB sólido e incubadas a 37°C por 16h. As colônias bacterianas foram contadas e registradas como unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Para a extração do DNA genômico bacteriano uma alíquota de 1,5 mL foi transferida para um *ependorf* e centrifugado 12000 x g por 2 minutos, a extração prosseguiu com *Kit* GenElute

Bacterial Genomic - DNA SIGMA® (NA2110-1KT), seguindo as instruções do fabricante. A pureza e a concentração das amostras foram determinadas pela leitura em Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific®) e as amostras foram armazenadas a -20°C. A curva padrão absoluta foi construída por diluição seriada do DNA genômico bacteriano de *E.coli*, iniciando em 3,6 ng/μL e finalizando em 0,00023 ng/μL com um fator de diluição de 1/5. O experimento foi feito em duplicata e em duas metodologias independentes.

#### 4.6 Extração do RNA e quantificação dos transcritos envolvidos na digestão de sangue

Para avaliar as alterações na expressão gênica dos transcritos envolvidos no mecanismo de digestão do sangue frente a microbiota íntegra e reduzida dos mosquitos expostos a diferentes temperaturas, foi isolado o RNA total de 20 intestinos dissecados 24 h após a ingestão de sangue usando RNeasy Mini Kit (QIAGEN®), conforme instruções do fabricante. A qualidade do RNA total foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1% (Sambrook e Russell, 2001). A pureza e a concentração das amostras foram determinadas por leituras em Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific®). Para eliminação de DNA contaminante, foi adicionado ao RNA total 1 U/μL de DNase-RNase Free (Promega®) e a qPCR foi realizada no cDNA sintetizado (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit - Applied Biosystems®), seguindo as orientações do fabricante.

Foram utilizados primers específicos para os genes que foram *up* regulados nos dados de transcriptoma relacionados ao processo metabólico do mosquito *Ae. aegypti*, como apresentado na (Tabela 2) (Ferreira et al., 2020). A detecção foi realizada pelo sistema *SYBR Green Master Mix* (Promega®). As reações foram realizadas seguindo o protocolo do *kit* GoTaq qPCR (Promega®) para volume final de reação de 10 μL. Os componentes da reação incluíram: 5 μL de GoTaq qPCR (2X), 1,0 μL (2mM) do par de primer, 0,2 μL de CXR Dye (0,015 mM), 2,8 μL de água *nuclease free* e 1,0 μL de cDNA (25 ng/μL).

As condições de amplificação consistiram nas seguintes etapas: amplificação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Para a curva de dissociação, as amostras foram submetidas à desnaturação gradual com aumento de 1°C a partir de 60°C até 95°C. O cálculo da abundância relativa de cada transcrito foi realizado pelo método da curva padrão relativa (Mendes et al., 2013; Souza et al., 2019) e construída por diluição seriada de um *pool* de cDNA iniciando em 50 ng/μL e finalizando em 1,68 ng/μL com um fator de diluição de 1/2. Os dados de expressão dos genes em cada amostra foram normalizados em razão

dos níveis de expressão do gene constitutivo (S7 rRNA). Todas as reações foram feitas em duplicatas nas duas réplicas biológicas.

**Tabela 2 - Genes específicos utilizados no experimento de PCR em tempo real.** Fonte: FERREIRA et al., 2020.

GENE	ACESSION N°	PRIMER 5'-3'		SIZE (pb)
		FORWARD	REVERSE	
Ribosomal protein S7	AAEL009496	ACCGCCGTCTACGATGCCA	ATGGTGGTCTGCTGGTTCTT	131
Trypsin	AAEL012852	ACCAGTATGCTACGGGCAAC	CCAGGAAACCACTCCGATAA	192
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	AAEL000080	CGGGTACAACCTTCGGTGACT	CCAATCCATAACTCGGCAGT	169
Alpha-N- acetylgalactosaminidase	AAEL005188	ACATCGACGATTGTTGGTCA	CGGGTATCCAGCACAAAGTTT	170
Beta-galactosidase	AAEL004582	CCACTCGGATCCCTTGACTA	TGATACGGCCTTGATTCTCC	176

#### 4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste *t* de Student não pareado para comparações entre o grupo tratado e não tratado utilizando o *software* GraphPad Prism® v. 7 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, California, USA). Todos os testes foram considerados estatisticamente significativos quando *p-value* foi menor que 0,05.

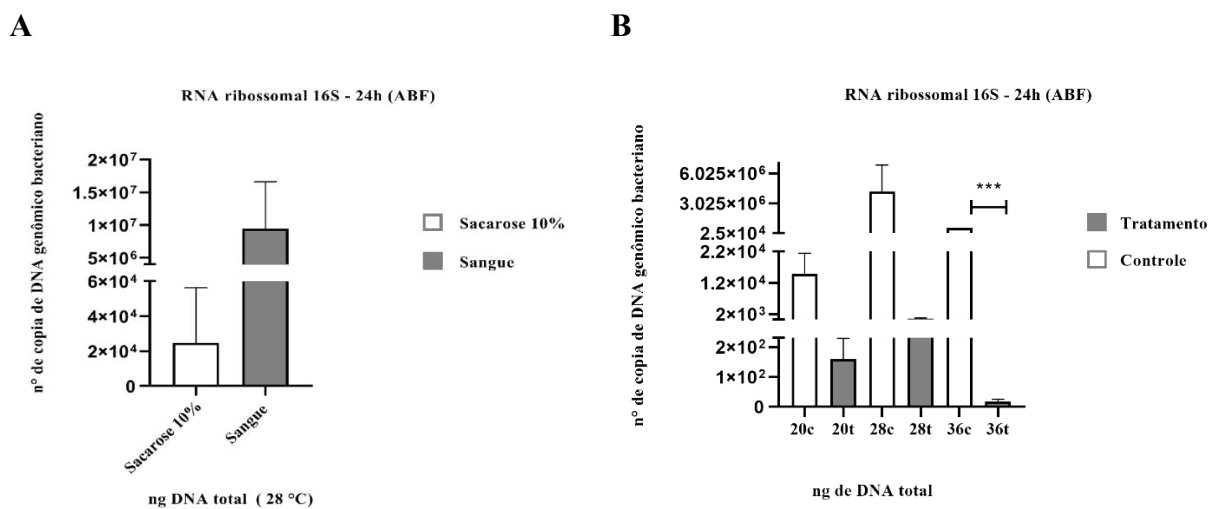
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito do sangue na carga bacteriana

Foi investigado se a carga bacteriana aumenta em intestinos de mosquitos após 24h do repasto de sangue em condições ótimas (28°C). Como mostra a Figura 7A, no tempo de 24h (ABF), a carga bacteriana foi menor quando os mosquitos experimentaram uma refeição de açúcar em relação àquela encontrada após alimentação de sangue (Figura 7A), porém não foi observada diferença significativa entre estes dois grupos experimentais no tempo avaliado ( $p > 0,05$ ).

Adicionalmente, avaliamos a quantificação da carga bacteriana frente a microbiota íntegra e reduzida após 24h (ABF) nas três temperaturas (20,28 e 36°C). Considerando apenas as médias dos grupos experimentais controle não tratados com antibiótico da Figura 7B, notamos que em 28°C há um aumento do número de cópias de DNA genômico bacteriano /ng de DNA total ( $4,175 \times 10^6$ ), comparado a 20°C ( $1,485 \times 10^4$ ) e 36°C ( $5,59 \times 10^5$ ) Avaliando o grupo tratamento da Figura 7B, podemos notar que o fornecimento do coquetel de antibióticos foi efetivo, uma vez que, em todos os tratamentos houve diminuição do número de cópias do DNA genômico bacteriano, com diferenças significativas entre o grupo controle e tratado na temperatura de 36°C ( $p > 0,001$ ).

**Figura 7. Número de cópias de DNA genômico bacteriano/ng de DNA total em intestinos com a carga bacteriana íntegra e reduzida por antibiótico de mosquitos *Ae. aegypti* nas temperaturas de 20, 28 e 36°C por 24 h (ABF). A. Número de cópias de DNA genômico bacteriano/ng total de DNA após alimentação com açúcar e número de cópias de DNA genômico bacteriano/ng total de DNA após alimentação com sangue a 28°C. B. Número de cópias de DNA genômico bacteriano/ng total de DNA após alimentação com sangue a 20, 28 e 36°C. Fonte (Autoria própria).**

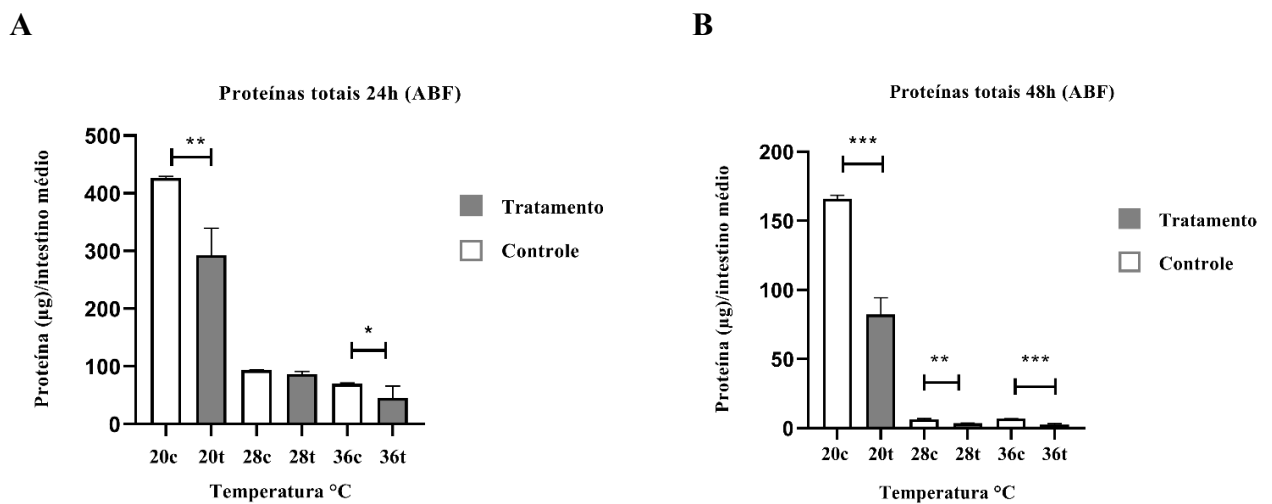


## 5.2 Efeito da redução das bactérias no intestino médio na digestão das proteínas do sangue

Para investigar se a redução da carga bactérias no intestino médio nas diferentes temperaturas testadas (20, 28 e 36°C) poderia afetar a taxa de digestão do sangue, intestinos de mosquitos expostos a cada tratamento nas diferentes temperaturas foram dissecados 24 e 48 horas após refeição de sangue e o conteúdo proteico foi determinado (Figura 8). Em 24h após a alimentação, o conteúdo proteico dos intestinos do grupo controle foi maior do que o conteúdo de proteína total dos grupos com redução de microbiota induzido pelo consumo de antibiótico

em 20°C ( $426,6 \pm 292,7 \mu\text{g/intestino}$ ) e 36°C ( $69,81 \pm 45,02 \mu\text{g/intestino}$ ) (Figura 8A). Considerando que proteína total inclui as proteínas obtidas do sangue somada as proteínas da microbiota do intestino, a redução da carga bacteriana induzida pelo antibiótico pode explicar os menores teores de proteína total no grupo tratado para uma mesma temperatura.

**Figura 8. Efeito da redução da carga bacteriana e da temperatura na quantificação de proteínas totais em mosquitos *Ae. aegypti* alimentados com sangue após 24 e 48 h (ABF). A. Quantificação de proteínas totais 24 h (ABF) B. Quantificação de proteínas totais 48 h (ABF). Fonte (Autoria própria).**

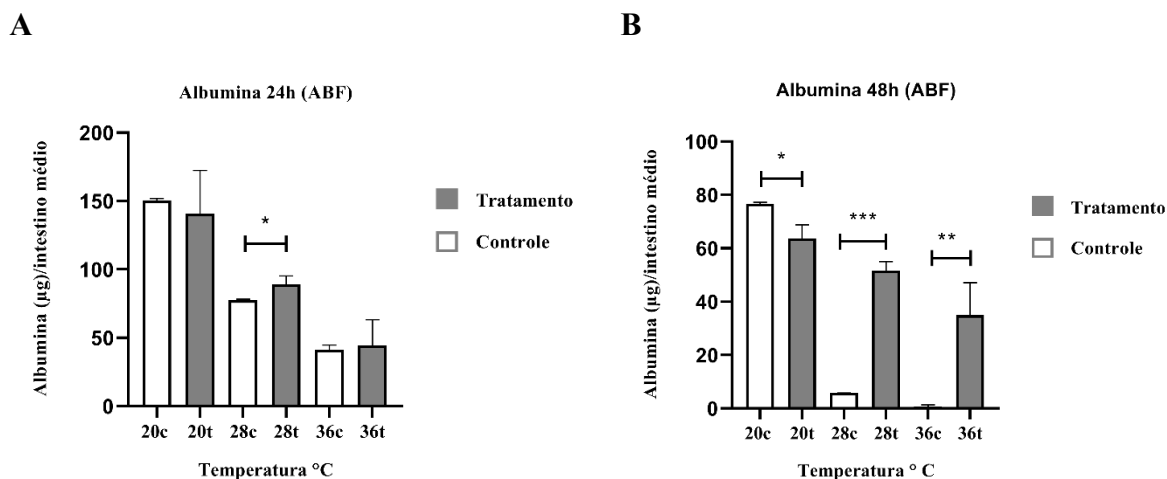


No final da digestão (48h), elevados níveis proteicos ( $166,2 \pm 7,119 \mu\text{g/intestino}$ ) foram encontrados no intestino de mosquitos a 20°C (Figura 8B). Em contraste, baixos níveis de proteínas foram observados nas demais temperaturas ( $6,359 \pm 0,4322 \mu\text{g/intestino}$ , 28°C e  $6,905 \pm 0,3154 \mu\text{g/intestino}$ , 36°C) (Figura 8 B). O grupo tratado seguiu o mesmo perfil, em 48 h (ABF), foram encontrados maiores níveis proteicos na temperatura de 20°C ( $82,29 \pm 7,119$ ) comparada a 28°C ( $3,569 \pm 0,4322 \mu\text{g/intestino}$ ) e 36°C ( $2,827 \pm 0,3154 \mu\text{g/intestino}$ ). Comparando o grupo controle e tratado na mesma temperatura, houve redução significativa mais acentuada em todas as temperaturas.

O sangue é fluido com alto teor proteico. Albumina, um dos principais constituintes do sangue também foi mensurada após repasto sanguíneo como marcador de digestão sanguínea. Em conformidade com a quantificação de proteínas totais, no tempo de 24h foi encontrada uma correlação negativa entre os níveis de albumina das diferentes temperaturas do grupo controle, que variou ( $150,6 \pm 18,3$ ,  $77,37 \pm 3,629$  e  $41,43 \pm 11,11 \mu\text{g/intestino}$ ) para as temperaturas de 20,

28 e 36°C, respectivamente, como ilustrado na Figura 9A. Quando comparado com o tratamento, houve aumento significativo nos níveis dosados de albumina para a temperatura de 28°C.

**Figura 9. Efeito da redução da carga bacteriana e da temperatura na quantificação de albumina sanguínea em mosquitos *Ae. aegypti* alimentados com sangue após 24 e 48 h (ABF). A. Quantificação de albumina 24 h (ABF) B. Quantificação de albumina 48 h (ABF). Fonte: (Autoria própria).**

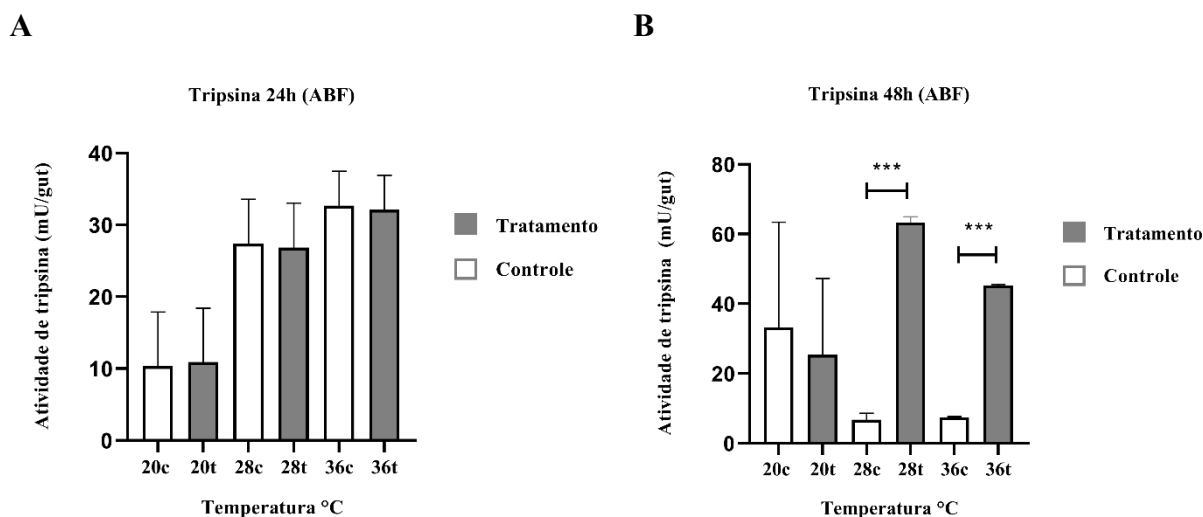


Após 48 h do repasto de sangue, os grupos tratados com antibiótico, apresentaram um nível maior de albumina, com exceção da temperatura de 20°C ( $76,76 \pm 63,68$  µg/intestino). Nesta temperatura, houve uma redução significativa de albumina (Figura 9B). Em geral, o nível de microbiota é menor a 20°C (Figura 7B) provavelmente devido à baixa temperatura que afeta a multiplicação das bactérias. Assim ela é menos afetada na presença de sangue, com menor alteração entre grupo controle e tratamento. Por outro lado, a microbiota se expande rapidamente e auxilia o processo de digestão do sangue em 28 e 36°C ( $5,760 \pm 51,73$ ;  $0,5833 \pm 34,93$  µg/intestino) respectivamente. Assim, o tratamento com antibiótico nesta temperatura reduz a microbiota e conseqüentemente contribuiu para o aumento de albumina detectada.

Serino proteases, incluindo tripsinas são responsáveis por uma grande parte da digestão de proteínas do sangue em *Ae. Aegypti* (Dana et al., 2005). Logo, nós executamos ensaios enzimáticos com a finalidade de mensurar a atividade da tripsina em intestinos de mosquitos frente a microbiota íntegra e reduzida por antibióticos expostos as diferentes temperaturas usando o substrato BApNA. Como demonstrado na Figura 10A, os resultados do grupo controle e tratamento seguem o mesmo perfil e não demonstram nenhuma diferença na atividade enzimática nas diferentes temperaturas, sendo de 20°C ( $10,34 \pm 6,146$  mU/intestino); 28°C ( $27,40 \pm 5,056$  mU/intestino); 36°C ( $32,68 \pm 3,921$  mU/intestino) no grupo controle e 20°C ( $10,90 \pm 6,146$

mU/intestino); 28°C ( $26,84 \pm 5,056$  mU/intestino); 36°C ( $32,12 \pm 3,921$  mU/intestino) no grupo tratamento, depois de 24 h (ABF).

**Figura 10. Efeito da redução da carga bacteriana e da temperatura na atividade de tripsina em mosquitos *Ae. aegypti* alimentados com sangue após 24 e 48 h (ABF). A. Atividade enzimática da tripsina 24 h (ABF) (mU/intestino) F. Atividade enzimática da tripsina 48 h (ABF) (mU/intestino). Fonte: (Autoria própria)**



Como ilustrado na Figura 10B, no grupo tratado, houve um aumento de tripsina tardiamente (48h) em 28 e 36°C ( $6,744 \pm 63,28$ ;  $7,349 \pm 45,23$  mU/intestino) respectivamente, comparado com o controle sem tratamento de antibióticos. Esses resultados proporcionam uma demonstração que a redução da carga bacteriana somada a variação da temperatura afeta a velocidade do processo de digestão de sangue quando os mosquitos são mantidos a 28 e 36°C.

### 5.3 Quantificação dos transcritos envolvidos na digestão do sangue

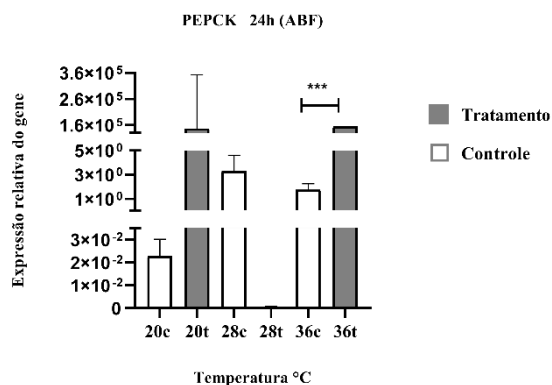
Para investigar se a redução da carga bacteriana impacta os transcritos envolvidos no mecanismo de digestão, os genes que foram *up* regulados na análise do transcriptoma intestinal de *Ae. aegyptis* prévio (Ferreira et al.,2020), foram avaliados: tripsina, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), alfa-N-acetilgalactosaminidase, ( $\alpha$ -NaGalase), beta-galactosidase ( $\beta$ -gal). As expressões dos genes foram quantificadas em cada temperatura (20, 28 e 36°C) após 24 h (ABF) (Figura 11). Como ilustrado na Figura 11A, a redução da carga bacteriana induziu significativamente ( $p < 0,001$ ) a expressão do gene PEPCK a 36°C. Já o gene  $\alpha$ -NaGalase foi

induzido significativamente a 20° ( $p < 0,001$ ) no grupo tratado em relação ao grupo controle (Figura 11B).

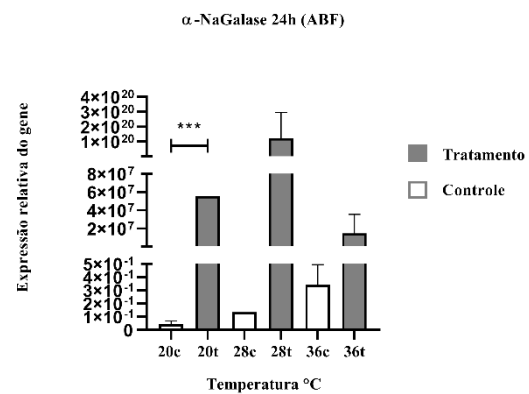
A redução da carga bacteriana induziu significativamente ( $p < 0,001$ ) a expressão do gene  $\beta$ -gal em todas as temperaturas (20,28 e 36°C), como demonstra a Figura 11C. Em contrapartida, a redução da carga bacteriana, diminui significativamente a expressão do gene de tripsina nas temperaturas (28 e 36°C), comparado ao grupo controle, na qual, a contagem do transcrito foi maior a (28 e 36°C) à 24 h ABF (Figura 11D).

**Figura 11: Abundância dos genes envolvidos no processo de digestão** A. Pepck (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) B.  $\alpha$ -NaGalase (Alfa-N-acetilgalactosaminidase) C.  $\beta$ -gal (beta-galactosidase) e D. Tripsina de mosquito *Ae. aegypti* com a carga bacteriana íntegra e reduzida por antibióticos nas temperaturas de 20, 28 e 36°C após 24 h (ABF) em relação ao controle endógeno r7 ribossomal. Os dados são uma média de duas réplicas experimental independentes. Fonte: (Autoria própria).

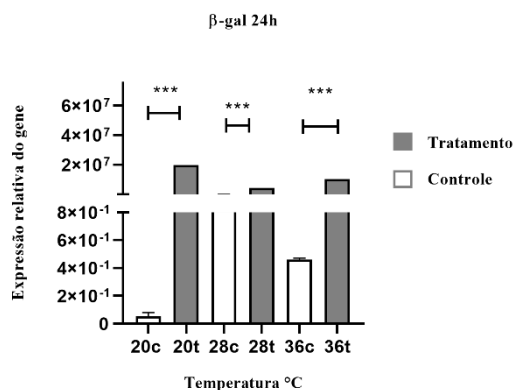
A



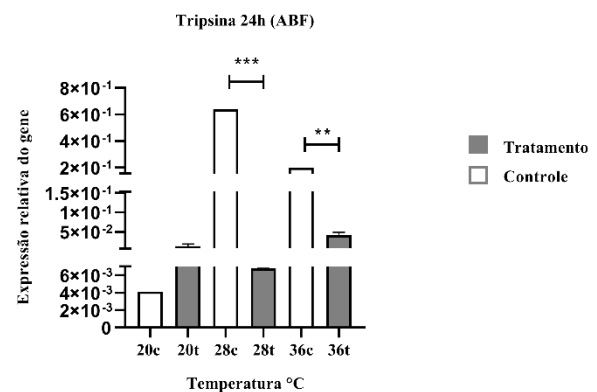
B



C



D



## 6 DISCUSSÃO

As bactérias são o componente mais investigado da microbiota associada a culicídeos. Diversos fatores podem influenciar substancialmente o microbioma intestinal dos insetos como, o pH, a presença de enzimas digestivas e o alimento ingerido pelo hospedeiro (Dillon e Dillon, 2004). A fonte de alimentação de sangue demonstrou ter impacto significativo na composição e diversidade microbiana no intestino dos artrópodes, mas isso mantém-se amplamente inexplorado (Kozlova et al., 2021). Em insetos hematófagos, por exemplo, não está claro como as refeições de sangue de diferentes espécies de hospedeiros vertebrados e a variação da temperatura ambiental, afetam o microbiota do inseto hospedeiro. Esse conhecimento é fundamental para entender o impacto da temperatura na fisiologia do mosquito para buscar novas perspectivas de controle.

Em seu trabalho Gusmão et al. (2010) verificaram que as bactérias intestinais apresentavam uma distribuição diferente ao longo do intestino médio do mosquito *Ae. aegypti* ao decorrer das primeiras 24 h após uma refeição de sangue, sendo dominantes na região posterior do intestino médio, compartimento onde ocorre a atividade proteolítica. Em outros trabalhos, pesquisadores mostraram que as bactérias intestinais de mosquitos crescem em velocidade exponencial, expandindo em cerca de 1 000 vezes 48 h após repasto de sangue (Gusmão et al., 2010), em concordância com o que já foi observado em outras espécies de mosquitos (DeMaioret al., 1996). Por isso, quantificamos a carga bacteriana dos mosquitos após uma refeição de sacarose 10% e verificamos como nos achados de Gusmão et al. (2010), uma maior proliferação da microbiota quando os mosquitos experimentaram uma refeição de sangue 24 h (ABF) em 28°C, (Figura 7 A).

Em nosso trabalho anterior (Ferreira et al., 2020) sobre o estudo do transcriptoma do intestino médio do mosquitos *Ae.aegypti* alojados em diferentes temperaturas (20, 28 e 36°C), observamos que a variação da temperatura afeta o processo de digestão do sangue, modulando a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) no intestino médio. Também observamos que temperaturas frias (20°C) afetam tanto a expressão dos transcritos envolvidos no processo de digestão (Ferreira et al., 2020) quanto a taxa de digestão, retardando esse processo. Esses resultados destacaram a complexidade do ambiente intestinal, demonstrando como a variação nas condições ambientais influenciam os processos fisiológicos que, por sua vez, afetam a competência do vetor. Assim, neste estudo realizamos vários experimentos para testar a importância da microbiota nos resultados obtidos quanto a taxa de digestão do sangue e os transcritos envolvidos nesse processo em diferentes temperaturas.

O sangue é uma refeição nutricionalmente rica, com alto teor de proteína. Uma importante função putativa das bactérias do intestino médio seria auxiliar os mosquitos a digerirem essas proteínas, contribuindo para a síntese de proteases digestivas (Gaio et al., 2011). Administramos oralmente um coquetel de antibióticos para reduzir a microbiota intestinal do mosquito e avaliamos seu papel funcional na digestão sanguínea. Quantificamos a carga bacteriana da microbiota íntegra e tratada em diferentes temperaturas 20, 28 e 36°C (Figura 7B) para validar se a redução da carga bacteriana afeta o processo de digestão do sangue.

Na temperatura de 28°C do grupo controle em 24 h (ABF) há uma maior carga bacteriana comparada ao grupo tratamento, isso está de acordo com dados do nosso trabalho anterior, que demonstrou que a 28°C já se tem um começo de expressão dos genes relacionados a digestão do sangue (Ferreira et al., 2020), e conseqüentemente, devido ao fornecimento de substratos, conseqüentemente aumenta a carga bacteriana. A 36°C, há uma diminuição da carga bacteriana, provavelmente devido ao metabolismo mais acelerado nessa temperatura e o processo de digestão ter ocorrido antecipadamente.

Segundo Oliveira et al. (2011), o epitélio intestinal dos *Ae. aegypti* também possui a capacidade de controlar o crescimento da sua microbiota intestinal por meio das espécies reativas de oxigênio (ROS). A alimentação com sangue desencadeia uma cascata de eventos que controlam negativamente o nível de ROS no intestino, que por sua vez molda a imunidade do inseto e a competência vetorial de mosquito a patógenos (Gandara et al., 2011). Após 24 h do repasto sanguíneo, inúmeros genes do sistema imunológico são expressos possivelmente para tentar reduzir os danos aos tecidos, desencadeados por bactérias presentes no lúmen intestinal (Oliveira et al., 2011), então concluímos que na temperatura de 36°C (Figura 7 B), a proliferação da microbiota que já estava aumentada, induz a produção de (ROS) e conseqüentemente culmina com adiminuição da carga bacteriana (Oliveira et al., 2011), Contrariamente, a 20°C há um menor fornecimento de substratos, devido ao retardo do processo de digestão do sangue (Ferreira et al., 2020) resultando em uma menor carga bacteriana (Figura 7 B).

O sangue é um fluido nutricionalmente rico em que as proteínas representam 20% do peso seco. Hemoglobina, albumina e imunoglobulinas compõem 80% do total de proteínas. A completa digestão de uma alimentação de sangue é normalmente atingida após 48 h em insetos hematófagos em condições de criação insetárias (28°C) (Gaio et al., 2011).

Quando reduzimos a carga bacteriana intestinal, nós verificamos altos teores de albumina nos intestinos de mosquitos mantidos nas temperaturas de (28 e 36°C) por 48 h (Figura 9C). Isso mostra que um impacto na microbiota afeta diretamente a concentração de proteínas presentes no sangue no intestino do vetor. A redução da carga bacteriana retarda o processo de digestão da

albumina em 48 h (ABF), com já demonstrado no trabalho de Gaio et al., (2011), em que a redução da carga bacteriana afetou a lise de hemácias e retardou o processo de digestão. Em relação aos dados das proteínas totais representado na Figura 8 A e B, o perfil de proteína total é o mesmo encontrado em Ferreira et al. (2020), com poucas diferenças significativas em 24 e 48 h (ABF) entre os controles e tratados (Figura 8 A e B).

O papel das tripsinas em uma refeição de sangue tem sido bem estudo (Sanders et al., 2003; Dana et al., 2005; Isoe et al., 2009). Quando os mosquitos são alojados em condições de temperaturas mais alta (36°C) e padrão (28°C), foi observada maior atividade da tripsina 24 h após a alimentação, enquanto na condição mais fria (20°C) maior atividade foi verificada mais tardiamente (Figura 10D).

Já é bem fundamentado que a ingestão de sangue resulta no aumento do estresse oxidativo, consequência do aumento da atividade metabólica no intestino (Souza et al., 1997; Kumar et al., 2003; 283 Molina-Cruz et al., 2008; Herrera-Ortiz et al., 2011). Há um impacto da redução da carga bacteriana sobre a atividade de tripsina a 28°C e 36°C (Figura 10A) corroborando com os dados de albumina a 28 e 36°C após 48 h ABF (Figura 10B) Isso sugere que a taxa de digestão de sangue são menores, de forma que uma atividade enzimática e o processo de digestão do teor de albumina, ocorrem em momentos tardios, esses estão em concordância com a (Figura 11D), uma vez que, a redução da microbiota, impactou a expressão do transcrito, reduzindo a expressão do gene de tripsina a 24 h (ABF) nas temperaturas de 28 e 36°C (Figura 11D). Com esses dados demonstramos que a microbiota tem um papel essencial na digestão do sangue, uma vez que a redução da carga bacteriana retardou esses processos em 28 e 36°C.

Em relação aos outros transcritos (PEPCK,  $\alpha$ -NaGalase e  $\beta$ -gal) outros experimentos precisam ser feitos com recorte de repasto a 48 h, uma vez que os dados apresentados do controle estão em conflitos com os achados de (Ferreira et al., 2020). Em relação ao grupo tratamento, notamos que PEPCK (Figura 11A), uma enzima de gliconeogênese que responde por 3-24 h (ABF) (Sanders et al., 2003), apresenta altos níveis de expressão a 36°C. No mais,  $\beta$ -gal, uma protease digestiva necessária para a digestão de constituintes sanguíneos não proteicos (Dana et al., 2005) foi altamente induzida nas três temperaturas (Figura 11C) e  $\alpha$ -NaGalase, também uma protease digestiva, (Dana et al., 2005) foi altamente induzida em 20°C, 24 h ABF (Figura 11B).

## **7 CONCLUSÃO**

A redução das bactérias do intestino médio afeta a digestão do sangue, resultando na redução da atividade enzimática e proteica (albumina) a 28 e 36°C. Embora seja necessária uma investigação mais aprofundada para determinar os mecanismos moleculares precisos desses processos, os resultados apresentados aqui indicam que a redução da carga bacteriana aliada a variação da temperatura pode afetar a taxa de digestão do sangue, bem como a expressão de genes associados a esses processos.

## REFERÊNCIAS

- ADADI, Roi et al. Prediction of microbial growth rate versus biomass yield by a metabolic network with kinetic parameters. **PLoS Comput Biol**, v. 8, n. 7, p. e1002575, 2012.
- ADELMAN, Zach N. et al. Cooler temperatures destabilize RNA interference and increase susceptibility of disease vector mosquitoes to viral infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. e2239, 2013.
- AKSOY, Serap. Tsetse peritrophic matrix influences for trypanosome transmission. **Journal of insect physiology**, v. 118, p. 103919, 2019.
- ALIAGA, José Cristobal et al. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 277, n. 3, p. G631-G641, 1999.
- ALIOTA, Matthew T. et al. The w Mel strain of *Wolbachia* reduces transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 28792, 2016.
- ALPHEY, L. et al. Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathog Glob Health*. v. 107, p. 170179, 2013.
- ALTO, Barry W.; JULIANO, Steven A. Precipitation and temperature effects on populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): implications for range expansion. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 5, p. 646-656, 2001.
- ALTSCHUL, Stephen F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AMARAL, R. J. V.; DANSA-PETRETSKI, M. Interação patógeno-vetor: dengue. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. INCT-EM**, 2012.
- ATTARDO, Geoffrey M.; HANSEN, Immo A.; RAIKHEL, Alexander S. Regulação nutricional da vitelogênese em mosquitos: implicações para a anautogenia. **Bioquímica e biologia molecular de insetos**, v. 35, n. 7, pág. 661-675, 2005.
- AZEVEDO, Juliana Bruning et al. Análise do ciclo biológico do *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposto a cenários de mudanças climáticas previstas pelo IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change).2015.
- BADER, Gary D. et al. BIND—the biomolecular interaction network database. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 1, p. 242-245, 2001.

- BADER, Gary D.; HOGUE, Christopher WV. BIND a data specification for storing and describing biomolecular interactions, molecular complexes and pathways. **Bioinformatics**, v. 16, n. 5, p. 465-477, 2000.
- BAHTT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504-507, 2013.
- BAIA-DA-SILVA, Djane Clarys et al. The role of the peritrophic matrix and red blood cell concentration in *Plasmodium vivax* infection of *Anopheles aquasalis*. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2018.
- BALLA, József et al. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 12, p. 2119-2138, 2007.
- BARABASI, Albert-Laszlo; OLTVAI, Zoltan N. Network biology: understanding the cell's functional organization. **Nature reviews genetics**, v. 5, n. 2, p. 101-113, 2004.
- BELKIN, John N. et al. The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae), Vol. 2. **The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae), Vol. 2**, 1962.
- BENCHIMOL, JL., and Sá MR., eds. E orgs. **Entomologia**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. Adolf Lutz Obra completa, v. 2, livro 4. ISBN: 978-85-7541-230-5. 2006.
- BENGUETTAT, O., Jneid, R., Soltys, J., Loudhaief, R., Brun-Barale, A., Osman, D., & Gallet, A. The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria. **PLoS Pathogens**, 14(9), e1007279.2018.
- BILLINGSLEY, Peter F.; HECKER, Hermann. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and  $\alpha$ -glucosidase in the midgut. **Journal of medical entomology**, v. 28, n. 6, p. 865-871, 1991.
- BLACK, IV W. C. et al. Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of Medical Research**. v. 33, p. 379–388, 2002
- BOISSIÈRE, Anne et al. Microbiota do intestino médio do vetor do mosquito da malária *Anopheles gambiae* e interações com infecção por *Plasmodium falciparum*. **PLoSPathogens**, v. 8, n. 5, pág. e1002742, 2012.
- BOTTINO-ROJAS, Vanessa et al. Heme signaling impacts global gene expression, immunity and dengue virus infectivity in *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135985, 2015.
- BRADY, O. J. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6, p. 1-15, 2012.

- BRIEGEL, H.; GUT, T.; LEA, AO Deposição sequencial de componentes do vitelo durante a oogênese em um inseto, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of insect physiology**, v. 49, n. 3, pág. 249-260, 2003.
- BRIEGEL, Hans; TIMMERMANN, Susanne E. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): physiological aspects of development and reproduction. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 4, p. 566-571, 2001.
- Broadway, R.M., **Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases.** **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 32, 39-53, 1996.
- Broadway, R.M., 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **J. Insect physiol.** 43, 855-87.
- BROWN, Julia E. et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514-525, 2014.
- BRYANT, Barth; MACDONALD, Warren; RAIKHEL, Alexander S. O microRNA miR-275 é indispensável para a digestão do sangue e desenvolvimento dos ovos do mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 52, pág. 22391-22398, 2010.
- Buchon N, Broderick NA, Lemaitre B. Homeostase intestinal em um mundo microbiano: insights de *Drosophila melanogaster*. **Nature Reviews Microbiology**. 2013 Set;11(9):615-26.
- Buchon N, Osman D. Todos por um e um por todos: regionalização do intestino de *Drosophila*. **Bioquímica e biologia molecular de insetos**. 1 de dezembro de 2015; 67:2-8.
- CALVET, G. et al. Detection and sequencing of *Zika virus* from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis.** v. 16, p. 1-8, 2016.
- CANSADO-UTRILLA, Cintia et al. The microbiome and mosquito vectorial capacity: rich potential for discovery and translation. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 111, 2021.
- CARRINGTON, Lauren B. et al. Fluctuations at a low mean temperature accelerate dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 4, p. e2190, 2013.
- CARRINGTON, Lauren B. et al. Large diurnal temperature fluctuations negatively influence *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) life-history traits. **Journal of medical entomology**, v. 50, n. 1, p. 43-51, 2013.
- CARRINGTON, Lauren B. et al. Reduction of *Aedes aegypti* vector competence for dengue virus under large temperature fluctuations. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 88, n. 4, p. 689-697, 2013.
- CHAVES, Luis F. et al. Padrões de alimentação sanguínea de mosquitos: aleatórios ou estruturados? **Fronteiras em zoologia**, v. 7, p. 1-11, 2010.

- CHERRY, S.; PERRIMON, N. Entry is a rate-limiting step for viral infection in a *Drosophila melanogaster* model of pathogenesis. **Nat. Immunol.** v. 5, p. 81-87, 2004.
- CHOO, Khar Heng; TONG, Joo Chuan; ZHANG, Louxin. Recent applications of hidden Markov models in computational biology. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 2, n. 2, p. 84-96, 2004.
- CIRIMOTICH, Chris M. et al. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 4, p. 387-395, 2010.
- CIRIMOTICH, Chris M. et al. Refratariedade natural mediada por micróbios à infecção por *Plasmodium* em *Anopheles gambiae*. **Ciência**, v. 332, n. 6031, pág. 855-858, 2011.
- CLEMENTS AN. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction. 1st ed. Wallingford: **CABI Publishing**; 1992.
- CLEMENTS, Alan Neville et al. The biology of mosquitoes. Volume 1: development, nutrition and reproduction. **Chapman & Hall**, 1992.
- CONSOLI, Rotraut AGB; OLIVEIRA, Ricardo Lourenço. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. **Editora Fiocruz**, 1994.
- COON, K. L. et al. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. **Mol Ecol.** v. 23, p. 2727-2739, 2014.
- CROSS, Timothy G. et al. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. **Experimental cell research**, v. 256, n. 1, p. 34-41, 2000.
- CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**. v. 534, p. 267-271, 2016.
- DADA, N. et al. Comparative assessment of the bacterial communities associated with *Aedes aegypti* larvae and water from domestic water storage containers. **Parasites & Vectors**. v. 7, p. 391, 2014.
- DANA, Ali N. et al. Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **BMC genomics**, v. 6, n. 1, p. 1-24, 2005.
- DAVID, J. P. et al. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. **Phil Trans R Soc B**. v. 368, p. 1-12, 2013.
- DE O GAIO, Analiz et al. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2011.

- DELATTE, Hélène et al. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 1, p. 33-41, 2009.
- DEMAIO, J., Pumpuni, C.B., Kent, M., Beier, J.C., 1996. The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psophora columbiae* mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 54, 219–223
- DICK, George WA; KITCHEN, Stuart F.; HADDOW, Alexander J. *Zika virus* (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.
- DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 49, p. 71-92, 2004.
- DIUK-WASSER, M. A. et al. Spatiotemporal patterns of host-seeking *Ixodes scapularis* nymphs (Acari: Ixodidae) in the United States. **Journal of medical entomology**, v. 43, n. 2, p. 166-176, 2014.
- selection. **BMC bioinformatics**, v. DOHM, David J.; O'GUINN, Monica L.; TURELL, Michael J. Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*) to transmit West Nile virus. **Journal of medical entomology**, v. 39, n. 1, p. 221-225, 2002.
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLoS Pathog.** 2009; 5(5):e1000423. doi: 10.1371/journal.ppat.1000423.
- DRIGGERS, Rita W. et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142-2151, 2016.
- Dutra HL, Dos Santos LM, Caragata EP, Silva JB, Villela DA, Maciel-de-Freitas R, et al. From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS Negl Trop Dis.** 2015; 9(4):e0003689. doi: 10.1371/journal.pntd.0003689.
- DYE, C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *An. Rev. Entomol.*, v. 37, p. 1-19, 1992.
- ECKMANN, Lars et al. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1478-1487, 2000.
- FARIA, Nuno Rodrigues et al. *Zika virus* in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, 2016.

- Felix, C.R., Betschart, B., Billingsley, P.F., Freyvogel, T.A., 1991. Post-feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* L. (Diptera:Culicidae) is separable into two cellular phases. *Insect Biochem.* 21, 197-203.
- FERREIRA, Priscila Gonçalves et al. Temperature dramatically shapes mosquito gene expression with consequences for mosquito–Zika virus interactions. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 901, 2020.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. Dengue. In: VERONESI, R.; FOCACIA, R. (Orgs.) *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora **Atheneu**, 1966. p.345358.
- FINN, Robert D.; MARSHALL, Mhairi; BATEMAN, Alex. i Pfam: visualization of protein–protein interactions in PDB at domain and amino acid resolutions. **Bioinformatics**, v. 21, n. 3, p. 410-412, 2005.
- FLÓREZ, Andrés F. et al. Protein network prediction and topological analysis in *Leishmania major* as a tool for drug target 11, n. 1, p. 1-9, 2010.
- Forattini, O.P. **Entomologia médica**. São Paulo, Editora da USP, v.1. 1962.
- FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia Vol. 2**. Edusp, 1996.
- FRAGKLOUDIS, Rennos et al. Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. **Journal of general virology**, v. 90, n. 9, p. 2061-2072, 2009.
- FRANZ, Alexander WE et al. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3741-3767, 2015.
- FREDERICKS, A. C. et al. The Burden of dengue and *Chikungunya* Worldwide: Implications for the Southern United States and California. **Annals of Global Health**. v. 80, p. 466-475, 2014.
- GAIO, A.O., Gusmão, D.S., Santos, A.V., Berbert-Molina, M.A., Paulo FP Pimenta, P.F.P, Lemos, F.J.A, 2011. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) **Parasit. Vectors** 2011, 4, 105.
- GENDRIN, Mathilde et al. Os antibióticos no sangue humano ingerido afetam a microbiota do mosquito e a capacidade de transmitir a malária. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, pág. 5921, 2015.
- GLORIA-SORIA, A. et al. Infection rate of *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue virus depends on the interaction between temperature and mosquito genotype. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 284, n. 1864, p. 20171506, 2017.

- GOLDMAN, B. S. et al. Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 41, p. 15200-15205, 2006.
- GREEN, Angela M. et al. Imunidade inata à infecção pelo vírus da dengue e subversão das respostas antivirais. **Journal of molecular biology**, v. 426, n. 6, pág. 1148-1160, 2014.
- GULLAN, Penny J.; CRANSTON, Peter S. **The insects: an outline of entomology**. John Wiley & Sons, 2014.
- GUO, X. X.; WANG, H. W. Research Progress on the Molecular Mechanisms of Mosquito Innate Immunity. **Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi= Chinese journal of parasitology & parasitic diseases**, v. 33, n. 1, p. 52-57, 2015.
- GUSMÃO DS, Santos AV, Marini DC, Russo Ede S, Peixoto AM, Bacci Júnior M, et al. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2007; 102(8): 919-24.
- GUSMÃO, Desiely S. et al. Caracterização dependente e independente de cultura de microrganismos associados a *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) e dinâmica da colonização bacteriana no intestino médio. **Acta tropical**, v. 115, n. 3, pág. 275-281, 2010.
- HAGEDORN, HH et al. O ovário como fonte de alfa-ecdisona em um mosquito adulto. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 8, pág. 3255-3259, 1975.
- HAMEL, Rodolphe et al. Biology of *Zika virus* infection in human skin cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. 8880-8896, 2015.
- Hegde S, Rasgon JL, Hughes GL. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. **Curr Opin Virol**. 2015; 15:97-102. doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.011.
- HERMJAKOB, Henning et al. IntAct: an open-source molecular interaction database. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl\_1, p. D452-D455, 2004.
- HERRERA-ORTIZ, Antonia et al. The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 1, p. 44-50, 2011.
- HEYMANN, David L. et al. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC. **The Lancet**, v. 387, n. 10020, p. 719-721, 2016.
- HOFFMANN, Jules A.; REICHHART, Jean-Marc; HETRU, Charles. Innate immunity in higher insects. **Current opinion in immunology**, v. 8, n. 1, p. 8-13, 1996.

- HORN, Martin e cols. Digestão de hemoglobina em carrapatos hematófagos: mapeamento de uma via multipeptidase por proteômica funcional. **Química e biologia**, v. 16, n. 10, pág. 1053-1063, 2009.
- INOKI, Ken et al. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. **Genes & development**, v. 17, n. 15, p. 1829-1834, 2003.
- ISOE, Jun et al. Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 12, p. 903-912, 2009.
- JARAMILLO-GUTIERREZ, G. et al. A dynamic case definition is warranted for adequate notification in an extended epidemic setting: the Dutch Q fever outbreak 2007–2009 as exemplar. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 41, p. 20606, 2013.
- JOHNSON, Gary L.; LAPADAT, Razvan. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.
- JUMA, Elijah O. et al. Efeito do estágio de vida e exposição a pesticidas na microbiota intestinal de *Aedes albopictus* e *Culex pipiens* L. **Relatórios científicos**, v. 10, n. 1, pág. 9489, 2020.
- KANTOR, I. N. Dengue, Zika Y Chikungunya. **Medicina (B Aires)**. v. 76, 2016.
- KARL, I., Stoks, R., De Block, M., Janowitz, S. A., and Fischer, K. (2011). Temperature extremes and butterfly fitness: Conflicting evidence from life history and immune function. **Glob. Chang. Biol.** 17, 676–687. doi:10.1111/j.1365-2486.2011.02486.x
- KAY, B. H., and Jennings, C. D. (2002). Enhancement or Modulation of the Vector Competence of *Ochlerotatus vigilax* (Diptera: Culicidae) for Ross River Virus by Temperature. **J. Med. Entomol.** 39, 99–105. doi:10.1603/0022-2585-39.1.99.
- KILPATRICK, A. Marm et al. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 6, p. e1000092, 2008.
- KILPATRICK, A. Marm et al. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 6, p. e1000092, 2008.
- KIM, Jeong-Gu et al. Predicting the interactome of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* for target selection and DB service. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2008.
- KNAUP, Petra et al. Towards clinical bioinformatics: advancing genomic medicine with informatics methods and tools. **Methods of information in medicine**, v. 43, n. 03, p. 302-307, 2004.
- KNIGHT, Kenneth L. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: *Culicidae*). Thomas Say Found. **Entomol. Soc. Am.**, v. 6, p. 1-611, 1977.

- KOVÁCS, István A. et al. Community landscapes: an integrative approach to determine overlapping network module hierarchy, identify key nodes and predict network dynamics. **PLoS one**, v. 5, n. 9, p. e12528, 2010.
- KOZLOVA, Elena V. et al. Microbial interactions in the mosquito gut determine *Serratia* colonization and blood-feeding propensity. **The ISME journal**, v. 15, n. 1, p. 93-108, 2021.
- KRAEMER, Moritz UG et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **elife**, v. 4, p. e08347, 2015.
- KUMAR, Ankit et al. Mosquito innate immunity. **Insects**, v. 9, n. 3, p. 95, 2018.
- KUMAR, N. Pradeep et al. A vigilância de vetores de Zika e Dengue em todo o país não indicou a transmissão do vírus Zika pandêmico de linhagem americana na Índia. **Jornal Internacional de Doenças Infecciosas**, v. 113, p. 119-124, 2021.
- KUMAR, Sanjeev et al. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14139-14144, 2003.
- LAMBRECHTS, Louis et al. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 18, p. 7460-7465, 2011.
- LANA, Raquel Martins. **Revisão sistemática para análise de custo e efetividade das estratégias de controle da dengue**. 2012. Monografia (Especialização em Economia e Meio Ambiente) - Departamento de Economia Rural e Extensão, Universidade Federal do Paraná, Paraná, S,2012.
- LEFEVRE, Thierry et al. Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 6, p. e1003365, 2013.
- LEMAITRE B, Miguel-Aliaga I. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. Annual review of genetics. 2013 Nov 23;47:377-404.
- LEMAITRE, Rozenn N. et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: The Cardiovascular Health Study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 2, p. 319-325, 2003.
- LI, Cui et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. **Cell stem cell**, v. 19, n. 1, p. 120-126, 2016.
- LIMA, Maria Carolina Pacheco. **Mecanismo de ação da enzima protease de serina NS2B-NS3 do vírus da Dengue**. 2016. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, NE,2016.

- LOUNIBOS, L. Philip. Invasions by insect vectors of human disease. **Annual review of entomology**, v. 47, n. 1, p. 233-266, 2002.
- LOUNIBOS, Leon Philip; KRAMER, Laura D. Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and vectorial capacity for chikungunya virus. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. suppl\_5, p. S453-S458, 2016.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.
- MAERE, Steven; HEYMANS, Karel; KUIPER, Martin. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3448-3449, 2005.
- MARRS, C. et al. Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. **American Journal of Perinatology**, v. 1, n. 212, p. 625–639, 2016.
- MARTELLI, C. M. T. et al. Economic Impact of Dengue: Multicenter Study across Four Brazilian Regions. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9, p. 1-19, 2015.
- MCBRIDE, William JH; BIELEFELDT-OHMANN, Helle. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and infection**, v. 2, n. 9, p. 1041-1050, 2000.
- MCCARTHY, Fiona M. et al. AgBase: a functional genomics resource for agriculture. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2006.
- MCCRAY JR, E. M. et al. A mechanical device for the rapid sexing of *Aedes aegypti* pupae. **Journal of Economic Entomology**, v. 54, n. 4, 1961.
- MCFARLANE, Melanie et al. Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e2994, 2014.
- MCHALE, Leah K. et al. Structural variants in the soybean genome localize to clusters of biotic stress-response genes. **Plant physiology**, v. 159, n. 4, p. 1295-1308, 2012.
- MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY JR, Charles. Innate immunity. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.
- MOLINA-CRUZ, Alvaro et al. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. **Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3217-3223, 2008.
- MORDECAI, E. A. et al. Ryan SJ, Smith TC, Lafferty KD: Optimal temperature for malaria transmission is lower than previously predicted. **Ecol Lett**, 2012.

- MURDOCK, C. C. et al. Complex effects of temperature on mosquito immune function. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1741, p. 3357-3366, 2012.
- MURDOCK, Courtney C. et al. Rethinking vector immunology: the role of environmental temperature in shaping resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 869-876, 2012.
- MURDOCK, Courtney C. et al. Temperature alters *Plasmodium* blocking by *Wolbachia*. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2014.
- MURDOCK, Courtney C.; MOLLER-JACOBS, Lillian L.; THOMAS, Matthew B. Complex environmental drivers of immunity and resistance in malaria mosquitoes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1770, p. 20132030, 2013.
- MUSSO, D. et al. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin Microbiol Infect.** v. 20, p. O595-O596, 2014.
- MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.
- MUTURI, E. J. et al. Comparative Analysis of Gut Microbiota of *Culex restuans* (Diptera: Culicidae) Females From Different Parents. **Journal of Medical Entomology**. v. 55, p. 163-171, 2017.
- MUTURI, Ephantus J. et al. A fonte de refeição sanguínea do hospedeiro tem um forte impacto na microbiota intestinal do *Aedes aegypti*. **FEMS Microbiology ecology**, v. 95, n. 1, p. 213 de maio de 2019.
- MUTURI, Ephantus J.; NYAKERIGA, Alice; BLACKSHEAR, Millon. Temperature-mediated differential expression of immune and stress-related genes in *Aedes aegypti* larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 28, n. 2, p. 79-83, 2012.
- NAKAMURA, Yukio et al. Tissue-and stage-specific Wnt target gene expression is controlled subsequent to  $\beta$ -catenin recruitment to cis-regulatory modules. **Development**, v. 143, n. 11, p. 1914-1925, 2016.
- NATAL, Delsio. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 205-207, 2002.
- NAYAR, J. K.; SAUERMAN JR, D. M. A comparative study of flight performance and fuel utilization as a function of age in females of Florida mosquitoes. **Journal of insect physiology**, v. 19, n. 10, p. 1977-1988, 1973.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
- Noriega, F.G., Edgar, K.A., Bechet, R., Wells, M.A., 2002. Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. **J. Insect Physiol.** 48, 205212.

- Noriega, F.G., Wang, X.Y., Pennington, J.E., Barillas-Mury, C., Wells, M.A., 1996. Early trypsin, a female specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, amino acid terminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 26, 119-126.
- NOVAK, Melinda A. et al. Stress, the HPA axis, and nonhuman primate well-being: a review. **Applied animal behaviour science**, v. 143, n. 2-4, p. 135-149, 2013.
- NUNES, Vania do Nascimento et al. **Avaliação da metodologia de aspiração de mosquitos adultos para monitoramento da infestação por *Aedes aegypti* em área endêmica de dengue em Recife/PE**. 2013. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, NE, 2013.
- OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 389-393, 1981.
- ORMAETXE, I. I. et al. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. **EMBO Rep.** v. 12, p. 508-518, 2011.
- PADMANABHA, Harish et al. An eco-physiological model of the impact of temperature on *Aedes aegypti* life history traits. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 12, p. 1597-1608, 2012.
- PASCOA, Valeria et al. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 5, p. 517-523, 2002
- PEARSON, Gray et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.
- POWELL, Jeffrey R.; TABACHNICK, Walter J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11-17, 2013.
- PUMPUNI, Charles B. et al. Dinâmica populacional bacteriana em três espécies de anofelinos: o impacto no desenvolvimento esporogônico de *Plasmodium*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 2, pág. 214-218, 1996.
- RAIKHEL, Alexander S.; DHADIALLA, TS Acúmulo de proteínas da gema em oócitos de insetos. **Revisão anual de entomologia**, v. 37, n. 1, pág. 217-251, 1992.
- RAMIREZ, Jose Luis et al. Chromobacterium Csp\_P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004398, 2014.
- Reisen, W. K., Fang, Y., and Martinez, V. M. (2006). Effects of Temperature on the Transmission of West Nile Virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) Author(s): **J. Med. Entomol.** 43, 309–317. doi:10.1603/0022-2585(2006)043.

- REY, J. R. & O'CONNELL, S. M. Oviposition by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Influence of congeners and of oviposition site characteristics. **J Vector Ecol.** v. 39, p. 190-196, 2014.
- RODGERS, F. H. et al. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. **PLoS Pathog** v. 13, p. 1-22, 2017.
- RUEDA, L. M. et al. Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 27, n. 5, p. 892-898, 1990.
- SÁFADI, Marco Aurélio Palazzi. Zika virus: what have we learned. **American journal of perinatology**, v. 33, n. 11, p. 1029-1031, 2016.
- SAITO, Rintaro et al. A travel guide to Cytoscape plugins. **Nature methods**, v. 9, n. 11, p. 1069, 2012.
- SAIZ, Juan-Carlos et al. Zika virus: the latest newcomer. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 496, 2016.
- SANDERS, Heather R. et al. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 11, p. 1105-1122, 2003.
- SANTOS, Maria Alice Varal de Melo et al. ***Aedes aegypti* (díptera: culicidae): estudos populacionais e estratégias integradas para controle vetorial em municípios da região metropolitana do Recife.** 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, NE, 2008.
- SAVIDIS, George et al. Identification of Zika virus and dengue virus dependency factors using functional genomics. **Cell reports**, v. 16, n. 1, p. 232-246, 2016.
- SCHMID-HEMPEL, Paul. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 50, p. 529-551, 2005.
- SCHULENBURG, H., Kurtz, J., Moret, Y., and Siva-Jothy, M. T. (2009). Introduction. Ecological immunology. **Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.** 364, 3–14. doi:10.1098/rstb.2008.0249.
- SHARMA, Anil et al. Os micróbios intestinais influenciam a aptidão e o potencial de transmissão da malária do vetor asiático da malária, *Anopheles stephensi*. **Acta tropical** , v. 128, n. 1, pág. 41-47, 2013.

- SHRINET, Jatin; BHAVESH, Neel Sarovar; SUNIL, Sujatha. Understanding oxidative stress in *Aedes* during chikungunya and dengue virus infections using integromics analysis. **Viruses**, v. 10, n. 6, p. 314, 2018.
- SILVA, Carlos Peres; LEMOS, Francisco José Alves; DA SILVA, José Roberto. capítulo 5 **Digestão em Insetos**. 2012.
- SILVA, Heloisa Helena Garcia da; SILVA, Ionizete Garcia da. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 4, p. 349-355, 1999.
- SIVA-JOTHY, Mike T. Ecological immunology. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 364, n. 1513, p. 1-142, 2009.
- SOLTANI, Aboozar et al. O papel de bactérias simbióticas do intestino médio na resistência de *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) a inseticidas organofosforados. **Patógenos e saúde global**, v. 111, n. 6, pág. 289-296, 2017.
- SOUZA, Aurélio Vicente G. et al. Urate protects a blood-sucking insect against hemin-induced oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 1-2, p. 209-214, 1997.
- SOUZA-NETO, Jayme A.; SIM, Shuzhen; DIMOPOULOS, George. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 42, p. 17841-17846, 2009.
- STARK, Chris et al. BioGRID: a general repository for interaction datasets. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl\_1, p. D535-D539, 2006.
- SUWANCHAICHINDA, Chansak; PASKEWITZ, Susan M. Effects of larval nutrition, adult body size, and adult temperature on the ability of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) to melanize Sephadex beads. **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 2, p. 157-161, 1998.
- TERRA, W.R., 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 21, 675-734.
- TERRA, W.R., 1996. Evolution and function of insect peritrophic membrane. **Ciência e Cultura** 48(5/6), 317-324.
- Terra, W.R., 2001. The origins and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Arch. Insect Physiol.** 47, 47-61.
- TERRA, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.** B 109, 1-62.

- TESLA, Blanka et al. Temperature drives Zika virus transmission: evidence from empirical and mathematical models. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 285, n. 1884, p. 20180795, 2018.
- TRAPNELL, Cole et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature protocols**, v. 7, n. 3, p. 562, 2012.
- TURELL, M. . Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes taeniorhynchus* for Rift Valley fever and Venezuelan equine encephalitis viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 49, 672–676,1993.
- TURK, Boris. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-799, 2006.
- VALANNE, Susanna; WANG, Jing-Huan; RÄMET, Mika. The Drosophila toll signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 2, p. 649-656, 2011.
- VIANA, Dione Viero; IGNOTTI, Eliane. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, p. 240-256, 2013.
- WANG, Ying et al. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24767, 2011.
- WATTS, Douglas M. et al. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 36, n. 1, p. 143-152, 1987.
- WOLINSKA, Justyna; KING, Kayla C. Environment can alter selection in host–parasite interactions. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 5, p. 236-244, 2009.
- XENARIOS, Ioannis et al. DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 1, p. 303-305, 2002.
- XENARIOS, Ioannis et al. DIP: the database of interacting proteins. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 289-291, 2000.
- XI, Zhiyong; RAMIREZ, Jose L.; DIMOPOULOS, George. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008.
- XIAO, Fang-Zhen et al. The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in *Aedes albopictus*. **Archives of virology**, v. 159, n. 11, p. 3053-3057, 2014.
- YUE, Tian-Li et al. Inhibition of extracellular signal–regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation–induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates

reperfusion injury in isolated perfused heart. **Circulation research**, v. 86, n. 6, p. 692-699, 2000.

ZANLUCA, Camila et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZANZONI, Andreas et al. MINT: um banco de dados Molecular InTeraction. **Cartas FEBS**, v. 513, n. 1, pág. 135-140, 2002.

ZOUACHE, Karima et al. Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1792, p. 20141078, 2014.