



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

MICROBIOMA DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE FEBRE AMARELA
SILVESTRE NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM/PA, BRASIL

ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO

BELÉM – PARÁ

2022

ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO

MICROBIOMA DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE FEBRE AMARELA
SILVESTRE NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM/PA, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal
do Pará como requisito para a obtenção do título de
Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dr^a. Adriana Ribeiro Carneiro

Coorientadora: Dr^a Ana Cecília Ribeiro Cruz

BELÉM – PARÁ

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D278m de Oliveira Aragão, Andressa.
Microbioma de mosquitos transmissores de febre amarela
silvestre na região metropolitana de Belém/PA, Brasil / Andressa
de Oliveira Aragão. — 2022.
93 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Adriana Ribeiro Carneiro
Coorientação: Prof^a. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular, Belém, 2022.

1. Controle biológico. 2. Metagenômica. 3. Microbiologia
ambiental. 4. Virologia. I. Título.

CDD 576.15

ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO

MICROBIOMA DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE FEBRE AMARELA
SILVESTRE NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM/PA, BRASIL

Tese defendida em 12/08/2022 pela seguinte banca examinadora:

Dra. Adriana Ribeiro Carneiro
(UFPA – orientadora)

Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz
(IEC – coorientadora)

Dr. Joaquim Pinto Nunes Neto
(IEC – membro externo)

Dr. Diego Assis das Graças
(UFPA – membro interno)

Dr. Rommel Thiago Jucá Ramos
(UFPA – membro interno)

Dr. Fabiano Cordeiro Moreira
(UFPA – membro interno)

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Esta pesquisa foi conduzida no laboratório de Bioinformática do Centro de Genômica e Biologia de Sistemas da Universidade Federal do Pará (Belém-PA) e laboratórios de Entomologia Médica e de Biologia Molecular do Instituto Evandro Chagas (Ananindeua-PA).

O financiamento da bolsa de doutorado foi feito pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Após uma longa jornada de estudos finalmente encerro um ciclo, o qual foi cheio de altos e baixos, mas que muito representa, afinal, 15 anos atrás jamais poderia imaginar que concluiria o último grau acadêmico, o que é motivo de muita felicidade para mim. E independente dos obstáculos, pude manter o otimismo comigo sempre. Por ter me enchido sempre de esperança e saúde, agradeço publicamente àquele que permitiu que eu chegasse até aqui: o Pai. Além Dele, externalizo meu agradecimento aos meus pais, que desde o meu primeiro dia de aula, com ainda poucos anos de vida, e até hoje, acreditaram nos meus sonhos junto comigo e me apoiaram em todas as decisões que tomei. Também agradeço a toda equipe do Instituto Evandro Chagas (IEC), que foi a minha primeira casa na pesquisa, onde pude começar a exercitar o meu “eu cientista”, e onde pude encontrar pesquisadores que acreditaram no meu potencial e me guiaram até aqui, relação essa que já dura 10 anos. Portanto, da minha casa IEC deixo aqui meu agradecimento especial aos pesquisadores Joaquim Nunes, Ana Cecília Ribeiro, Sandro Patroca, Fábio Silva, Wilson Júnior, Durval Bertram, Bruna Nascimento, Daniel Damous, Glenn da Pereira bem como os primeiros pesquisadores que ali tive contato como Hamilton Antônio (*in memoriam*), Francisco, Hélio e tantos outros que estiveram dispostos a me ajudar no processo (perdão se esqueci de citar alguém, mas deixo meu carinho a todos). Também deixo meu agradecimento para minha orientadora Adriana Carneiro, que acreditou no meu potencial e abraçou meu projeto mesmo que a minha escolha de linha de pesquisa fosse diferente dos demais orientandos, o que foi um processo muito positivo para meu crescimento profissional, pois tive a oportunidade de aprender com meus colegas mais a respeito de bactérias, que a princípio não era de meu domínio. Também agradeço à banca examinadora pela disponibilidade e contribuições sempre relevantes. À todos, espero ter atendido ao mínimo das expectativas sobre minha capacidade de desenvolver pesquisa, e espero de coração que o encerramento deste ciclo seja apenas uma oportunidade para o início de um outro. Os laços que criei no IEC e na UFPA serão sempre guardados com carinho, e espero que possamos ainda fazer pesquisas juntos, para além do doutorado.

Um abraço a todos. Nos vemos em breve.

“Torture os dados, e eles confessarão qualquer coisa.”

Ronald Coase

RESUMO

Há décadas pesquisadores tentam contornar epidemias de arbovírus, porém, muitas vezes sem sucesso. Isto porque esses vírus são transmitidos rapidamente e em grande escala por mosquitos vetores, os quais ocupam uma larga faixa de distribuição especialmente nas zonas tropicais. Devido esse problema de saúde pública, muitos estudos com mosquitos têm sido desenvolvidos nos últimos anos, e um novo conceito tem sido aplicado à competência vetorial desses insetos: a maneira como a transmissão de arbovírus ocorre depende dos demais microrganismos associados. Em outras palavras, a transmissão de doenças importantes como a febre amarela também depende das bactérias que esse mosquito carrega; e mais, também depende dos outros tipos de vírus presentes no mosquito. Saber disso muda o modo como enxergamos a competência vetorial e o controle de epidemias. Por isso, os objetivos deste trabalho focaram em conhecer a diversidade de bactérias e vírus associados a mosquitos transmissores de febre amarela silvestre. Para isso, a abordagem de sequenciamento de nova geração juntamente com metagenômica foram utilizadas para analisar mosquitos do gênero *Sabethes* spp. coletados na região metropolitana de Belém-PA, Brasil. Neste trabalho foi possível encontrar uma grande diversidade microbiana que mostrou-se semelhante para todos os *Sabethes* estudados, embora não tenha sido possível observar uma filossimbiose significativa. Bactérias com potencial para controle biológico como *Listeria monocytogenes*, *Wolbachia*, *Enterobacter cloacae* e *Bacillus thuringiensis* puderam ser identificadas nas amostras, assim como uma vasta gama de vírus, principalmente vírus inseto-específico, muitos dos quais ainda não possuem dados concretos na literatura disponível. Essas descobertas são o primeiro passo para entender como o microbioma atua na transmissão de vírus importantes, permitindo a elaboração de novas estratégias de controle biológico de arboviroses e até mesmo desenvolvimento de novas vacinas.

Palavras-chave: Controle biológico. Metagenômica. Microbiologia ambiental. Virologia.

ABSTRACT

For decades researchers have tried to control arbovirus epidemics but often without success. This is because these viruses are transmitted rapidly and on a large scale by mosquito vectors which are distributed around the world, especially in tropical areas. Due to this public health problem, many studies with mosquitoes have been developed in recent years, and a new concept has been applied to the vector competence of these insects: the way that arbovirus transmission occurs depends on the other associated microorganisms. In other words, the transmission of important diseases like yellow fever also depends on the bacteria that this mosquito carries and also depends on the other types of viruses present in the mosquito. Knowing this changes the way we understand vector competence and epidemic control. Therefore, the aim of this work was focused on knowing the diversity of bacteria and viruses associated with mosquitoes that transmit wild yellow fever. For this, the next generation sequencing approach together with metagenomics were used to analyze *Sabethes* spp. collected in the metropolitan region of Belém-PA, Brazil. In this work it was possible to find a great microbial diversity that was similar for all the *Sabethes* studied, not being possible to observe a significant phyllosymbiosis. Bacteria with potential for biological control such as *Listeria monocytogenes*, *Wolbachia*, *Enterobacter cloacae* and *Bacillus thuringiensis* could be identified in the samples, as well as a wide range of viruses, mainly insect-specific viruses, which still do not have concrete data in the available literature. These discoveries are important to understanding how the microbiome acts in the transmission of viruses, allowing the elaboration of new strategies of biological control for arbovirus and the development of new vaccines.

Keywords: Biological control. Environmental microbiology. Metagenomics. Virology.

SUMÁRIO

	pg.
1.INTRODUÇÃO.....	11
1.1. FAMÍLIA CULICIDAE E GÊNERO <i>SABETHES</i>	11
1.1.1. Morfologia externa de adultos.....	11
1.1.2. Morfologia interna de adultos.....	15
1.1.3. Hábitos comportamentais e bioecologia.....	17
1.1.4. Transmissão de arbovírus com ênfase em febre amarela.....	20
1.1.5. Microbioma.....	23
2.OBJETIVOS.....	29
2.1. OBJETIVO GERAL.....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA.....	31
3.2. ÁREA DE COLETA.....	31
3.3. OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	33
3.4. ORGANIZAÇÃO DOS MOSQUITOS EM <i>POOLS</i>	34
3.5. ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO.....	35
3.5.1. <i>Sa. chloropterus</i> , <i>Sa. glaucodaemon</i> , <i>Sa. belisarioi</i>	35
3.5.2. <i>Sa. bipartipes</i> , <i>Sa. cyaneus</i> , <i>Sa. tarsopus</i> e <i>Sa. quasicyaneus</i>	36
3.6. BIOLOGIA COMPUTACIONAL.....	36
3.6.1. Tratamento inicial e qualidade das leituras de todos os <i>Sabethes</i> spp.....	38
3.6.2. Confirmação da espécie.....	38
3.6.3. Classificação de <i>contigs</i> dentro do microbioma.....	39
3.6.4. Microrganismos candidatos para controle biológico.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO.....	40
4.2. QUALIDADE DA MONTAGEM.....	40
4.3. DIVERSIDADE DO MICROBIOMA, FILOSSIMBIOSE E CONTROLE BIOLÓGICO.....	41
4.3.1. Diversidade bacteriana (DNA).....	43
4.3.2. Diversidade viral (DNA e RNA).....	49
5. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICE.....	66
ANEXO.....	91

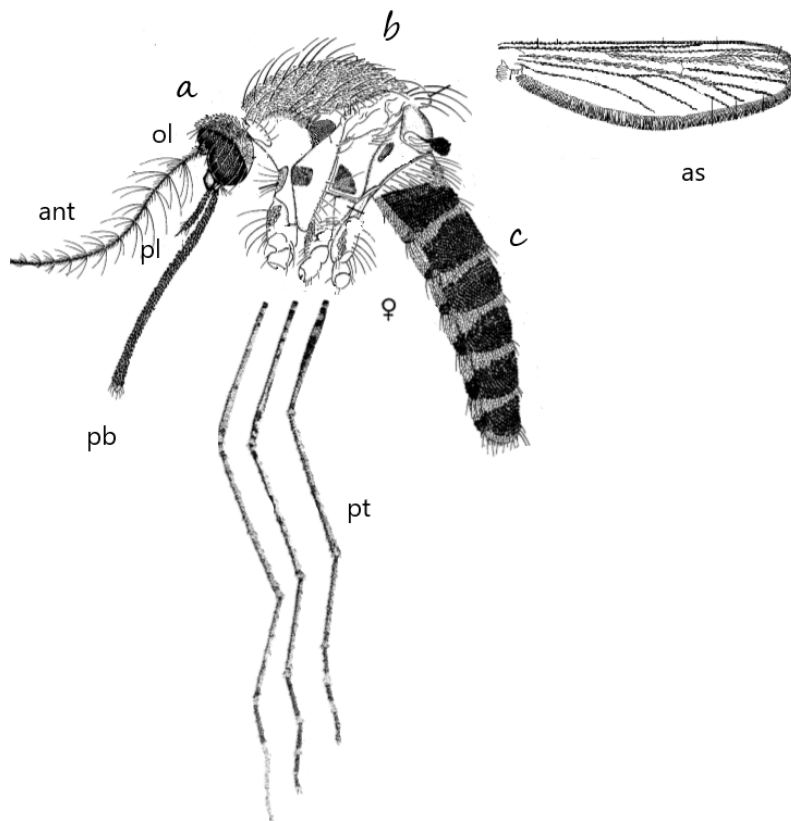
1. INTRODUÇÃO

1.1. FAMÍLIA CULICIDAE E GÊNERO *SABETHES*

1.1.1. Morfologia externa de adultos

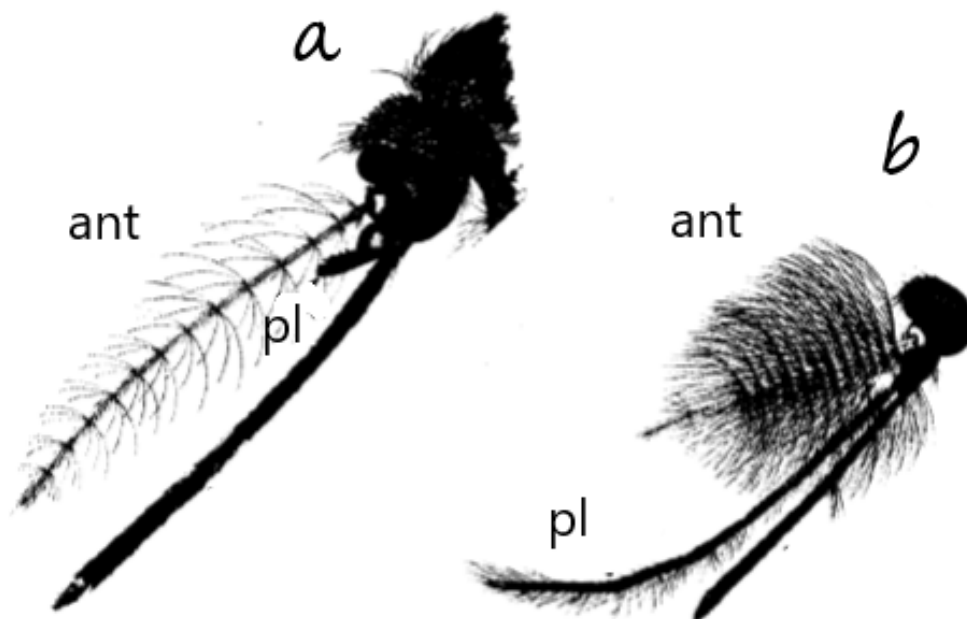
Os mosquitos são insetos pertencentes à classe Insecta, ordem Diptera e família Culicidae e são denominados popularmente como muriçocas, carapanãs ou pernilongos (Marcondes, 2011). Possuem corpo segmentado e revestido por um exoesqueleto quitinoso, que é dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça, estão localizados os órgãos sensoriais como os olhos com vários omatídeos, os palpos, as antenas, além da probóscide, que é o aparelho para realizar alimentação e hematofagia. No tórax, estão os apêndices locomotores como as patas e asas, enquanto que no abdômen não há apêndices (Consoli & de Oliveira, 1994) (Figura 1). Muitas dessas estruturas, a exemplo dos palpos e antenas, são utilizadas por taxonomistas morfológicos para realizar a identificação de espécies e dimorfismo sexual (Figura 2).

Figura 1. Morfologia externa de Culicidae



a) cabeça; b) tórax; c) abdôme; ol) olhos; pl) palpos; ant) antenas; pb) probóscide; pt) patas; as) asas.
 Fonte: adaptado de Consoli & Oliveira, 1994.

Figura 2. Dimorfismo sexual de Culicidae

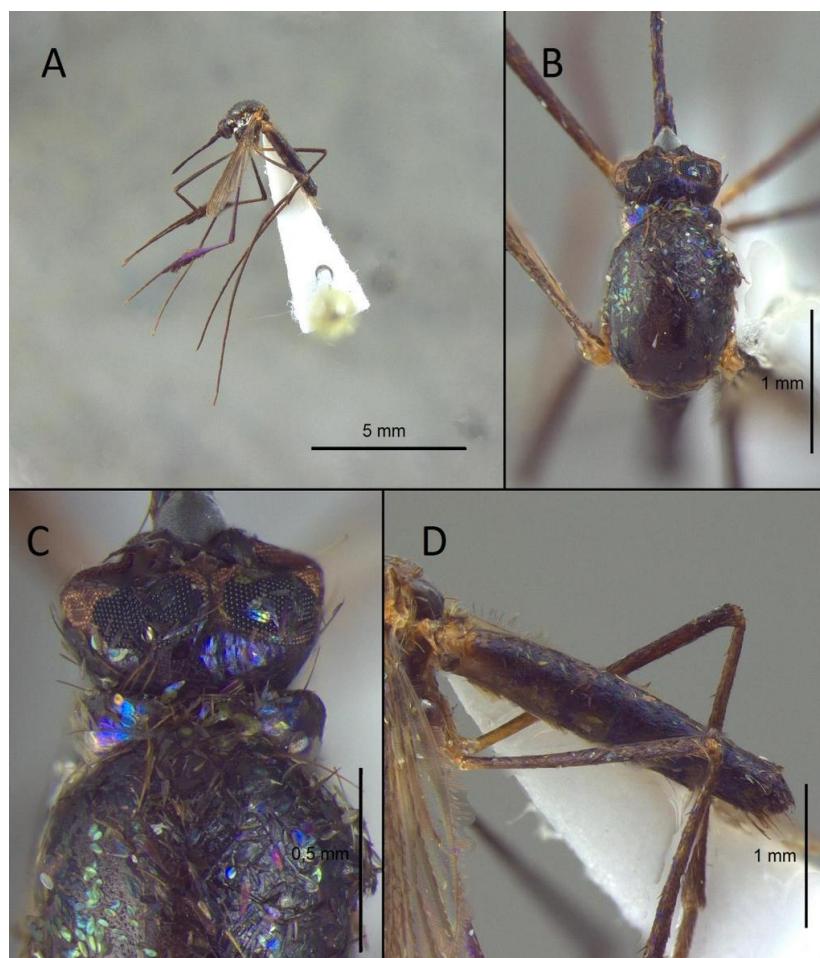


a) fêmea; b) macho; ant) antenas; pl) palpos.

Fonte: adaptado de Consoli & Oliveira, 1994.

Além das estruturas descritas, os mosquitos também possuem o corpo recoberto por escamas metálicas de diversas colorações, podendo variar entre azul, violeta e verde nas espécies do gênero *Sabethes* (Lane & Cerqueira, 1942; Marcondes, 2011), conferindo a esse mosquito um aspecto chamativo mesmo a olho nu, embora tais estruturas possam ser melhor observadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica. Essas colorações chamativas são mais comumente observadas em mosquitos selvagens do que em mosquitos urbanos, provavelmente para facilitar o destaque dos mesmos na paisagem de mata, fator que é importante principalmente para a reprodução (Lane e Cerqueira, 1942) (Figura 3).

Figura 3. Escamas violáceas de mosquitos do gênero *Sabethes*

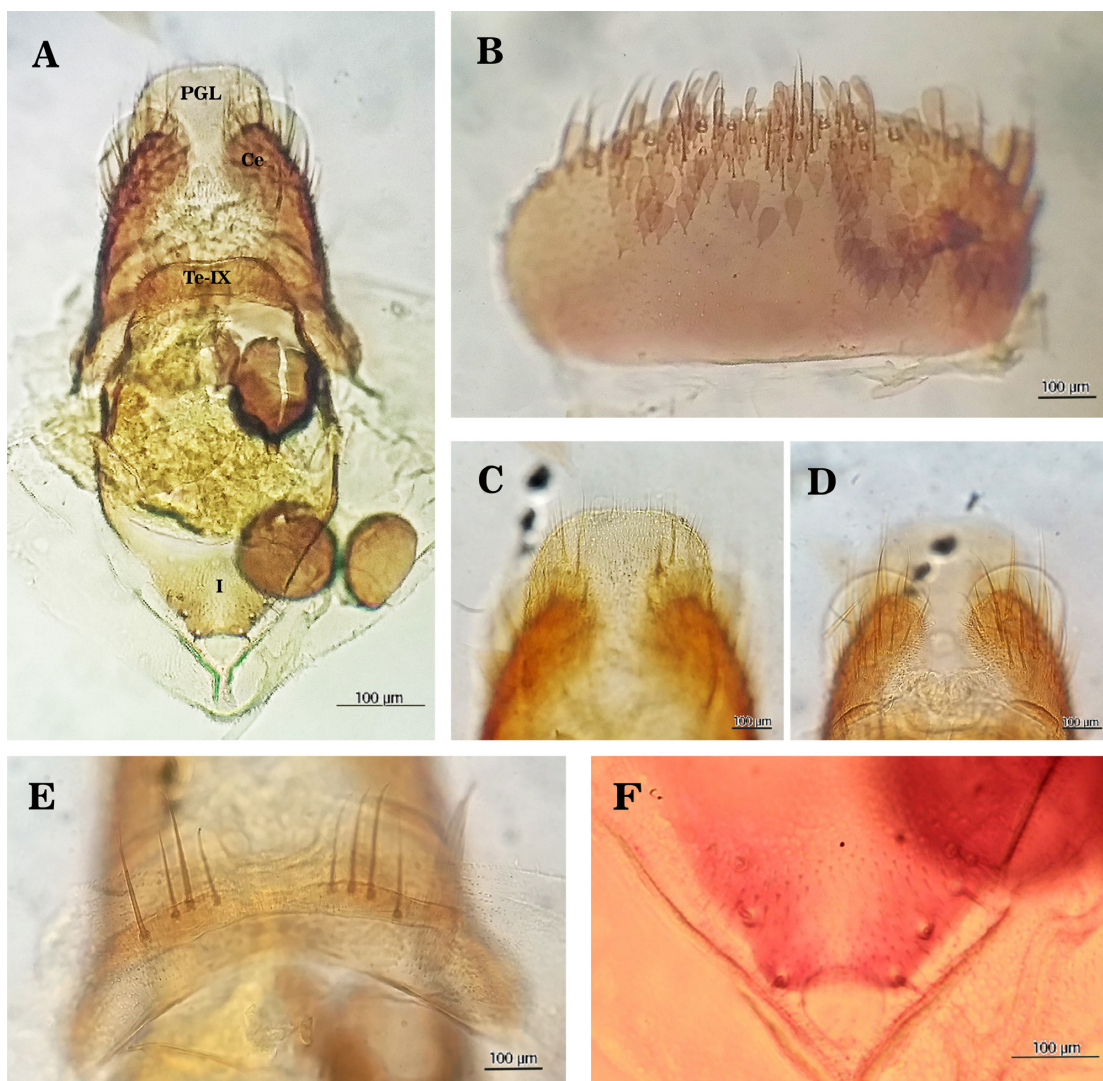


A) abdome. B) remos nos tarsos medianos. C) pleura. D) garras tarsais bífidas não denteadas

Fonte: Betina Westphal, 2011.

Outras estruturas importantes, mas que se encontram parcialmente externas, são as genitálias (Figura 4), que são compostas pelo órgão copulador e estruturas associadas, sendo também muito utilizadas na sistemática taxonômica (Consoli & de Oliveira, 1994), especialmente para o gênero *Sabethes*, uma vez que é um gênero composto de espécies difíceis de identificar quando não se tem uma vasta experiência na área ou quando as demais estruturas externas estão danificadas. As genitálias masculinas são as mais utilizadas na identificação, embora os machos sejam mais difíceis de coletar em área de mata, tornando esta prática de identificação por genitálias basicamente restrita aos espécimes mantidos em laboratório. Entretanto, há trabalhos recentes a respeito da identificação por genitais femininos (Figura 4) (Stein *et al.*, 2020).

Figura 4. Genitália feminina de mosquitos do gênero *Sabethes*

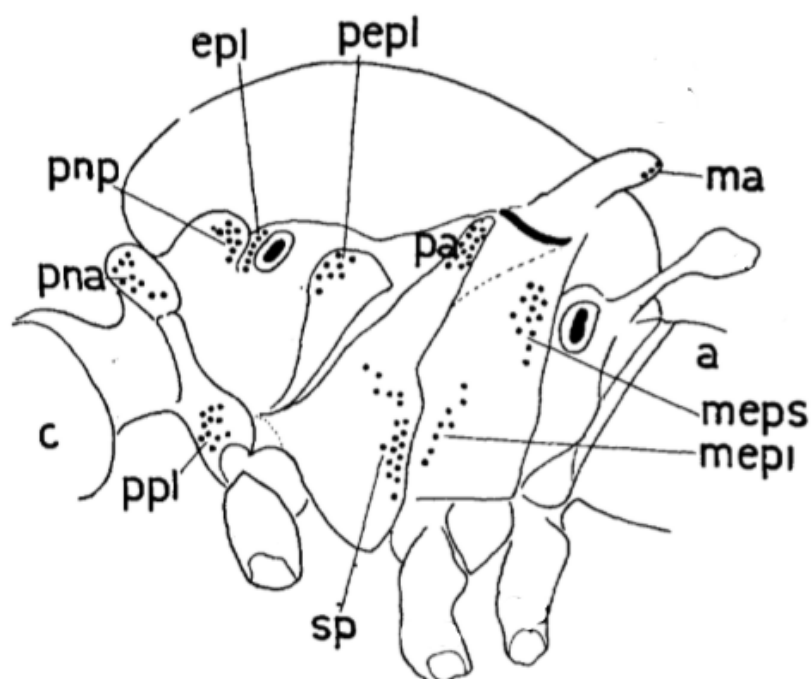


(A) Vista ventral; (B) esterno VIII; (C,D) lobo pós-genital e cercos; (E) tergum IX, vista dorsal; (F) ínsula. Abreviaturas: Ce, cerco; I, ínsula; PGL, lobo pós-genital; Te-IX, tergum IX.

Fonte: Stein *et al.*, 2020.

Todos os órgãos/estruturas mencionados anteriormente, exceto os olhos, podem ser utilizados na identificação de espécies. Além destes, há também a utilização dos pelos ou cerdas do corpo do mosquito para o reconhecimento de uma determinada espécie; a esta ciência denominamos Quetotaxia, sendo utilizada não apenas para mosquitos adultos como também para larvas e pupas (Forattini, 1962). Uma vantagem dessa abordagem é que mesmo que os pelos caiam, ainda assim é possível realizar a identificação, uma vez que permanecem no exoesqueleto pequenos orifícios semelhantes à poros dos quais saem as cerdas (Figura 5).

Figura 5. Quetotaxia de mosquito adulto (vista lateral)



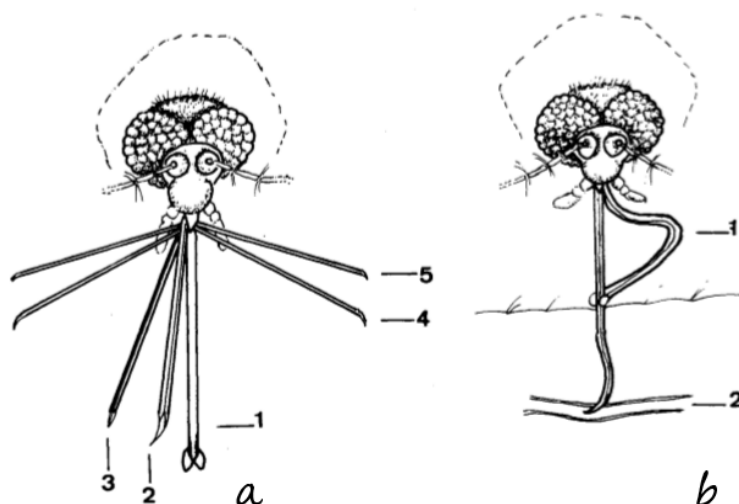
c) cabeça; a) abdôme; pna) cerdas pronotais; pnp) cerdas pronotais posteriores; epl) cerdas espiraculares; pepl) cerdas postespiraculares; pa) cerdas prealares; ma) cerdas marginais; meps) cerdas mesoepimerais superiores; mepi) cerdas mesoepimerais inferiores; sp) cerdas esternopleurais; ppl) cerdas propleurais.

Fonte: adaptado de Forattini, 1962.

1.1.2. Morfologia interna de adultos

No que diz respeito à morfologia interna, a primeira estrutura que devemos mencionar é a probóscide, que tem relação direta com a nutrição dos mosquitos e transmissão de patógenos por espécies hematófagas. Embora possamos ter uma visão externa de tal estrutura, na verdade constitui-se como um aparelho um pouco mais complexo internamente, possuindo seis estiletes, sendo um par de maxilas, um par de mandíbulas, a hipofaringe e o labro, os quais se encontram alojados no lábio e, que durante a alimentação ou hematofagia realizam movimentos específicos e coordenados de modo a permitir a rápida sucção de fluidos (Consoli & de Oliveira, 1994) (Figura 6).

Figura 6. Aparelho picador-sugador de Culicidae



a) aparelho bucal: 1) lábio com labela; 2) labro; 3) hipofaringe; 4) maxila; 5) mandíbula. b) fêmea sugando: 1) lábio; 2) capilar.

Fonte: adaptado de Consoli & de Oliveira, 1994.

Mais internamente, na cavidade bucal, está o ducto das glândulas salivares, as quais estão em número de duas e situam-se no protórax, imediatamente superior à implantação do par de pernas anterior. Essas glândulas são do tipo tri-acinosas ou trilobadas, em que o ácino mediano é menor que os laterais (Forattini, 1962).

Na faringe, há a presença da bomba faringiana, que possui placas ligadas a músculos que contraem dilatando e retraindo o órgão, de modo a aspirar o alimento através do canal alimentar formado pelas partes bucais. Próximo dessa bomba faringiana, há uma armação quitinosa, que é muito visível em fêmeas de espécies hematófagas e também muito variável entre as espécies, constituindo-se assim mais um caractere de identificação taxonômica (Forattini, 1962).

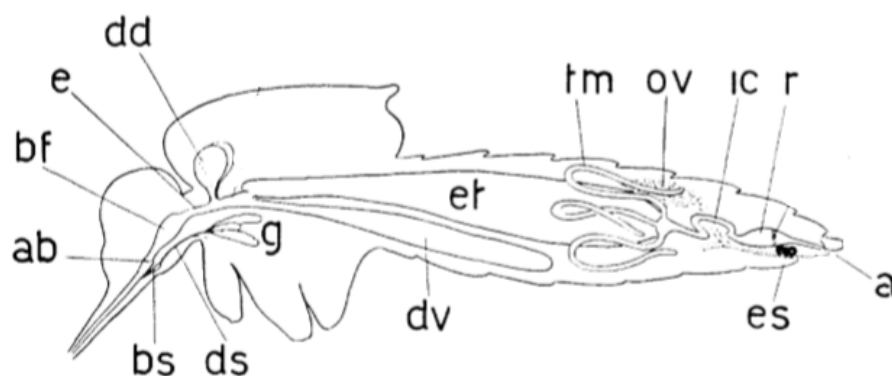
Adiante, é possível observar a presença do esôfago, que faz caminho para o estômago ou intestino médio. Porém, antes de chegar ao estômago há uma estrutura denominada divertículo, cuja função é a de armazenar alimentos (Forattini, 1962).

Praticamente no centro do corpo do mosquito, há uma estrutura grande e longilínea, chamada de estômago ou intestino médio, que possui capacidade de dilatação quando fluidos são recebidos (Forattini, 1962). Essa estrutura tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos (Bennink, Kiesow & Pradel, 2016; Cheng *et al.*, 2016; Muturi *et al.*, 2016a;

Saraiva *et al.*, 2016; Tchioffo *et al.*, 2016) uma vez que é o principal local de processamento de nutrientes, além de criar uma membrana peritrófica quando há ingestão sanguínea, que surge a partir da atividade de células do estômago que criam uma camada de material quitinoso separando o sangue ingerido da parede do estômago; essa membrana não se forma quando substâncias açucaradas passam pelo estômago, pois é permeável às enzimas proteolíticas secretadas pelas células estomacais e também aos produtos da ingestão que são absorvidos (Consoli & de Oliveira, 1994).

Por fim, há a válvula pilórica que se liga aos túbulos de Malpighi, cuja estrutura e tamanho permanecem praticamente intactos desde o último estágio larval, estando esses túbulos envolvidos na excreção e reabsorção de água. Seguidamente, há as estruturas que fazem parte da porção final do intestino posterior, composto do íleo, do reto distendido ou ampola retal e o ânus. Além das estruturas reprodutoras como os ovários e espermatecas na fêmea (Consoli & de Oliveira, 1994) (Figura 7).

Figura 7. Morfologia interna de culicídeo fêmea



ab) armadura bucofaríngea; bf) bomba faríngea; e) esôfago; dd) divertículos dorsais; g) glândula salivar; ds) ducto salivar; bs) bomba salivar; dv) divertículo ventral; et) estômago; tm) túbulos de Malpighi; ov) ovários; ic) íleo e cólon; r) reto; a) ânus; es) espermatecas.

Fonte: adaptado de Forattini, 1962.

1.1.3. Hábitos comportamentais e bioecologia

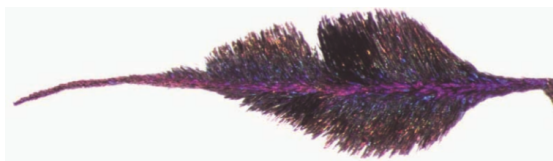
Conhecer os hábitos comportamentais dos mosquitos e bioecologia é de grande importância, uma vez que algumas espécies possuem papel epidemiológico no que diz respeito à transmissão de agentes patogênicos causadores de doenças importantes como a febre amarela, malária, filariose, dengue e outras (Consoli & de Oliveira, 1994).

Os mosquitos são insetos holometábolos que passam por quatro estágios biológicos, sendo o ovo, larva, pupa e adulto. Algumas das espécies de mosquitos se adaptam a diversas condições ambientais, inclusive em locais degradados por ação antropogênica, coexistindo e transmitindo doenças aos humanos, a exemplo do *Aedes aegypti* e do *Culex quinquefasciatus*, facilmente encontrados dentro de nossas casas. Essas espécies são muito abundantes mesmo em áreas com pouco ou nenhum saneamento ambiental, depositando seus ovos em recipientes descartáveis com água acumulada ou até mesmo em esgotos a céu aberto (Marcondes, 2011).

Já os sabetíneos, como são chamados aqueles mosquitos compreendidos na tribo Sabethini (a qual agrega o gênero *Sabethes*), são mosquitos selváticos e relativamente raros, encontrados exclusivamente em áreas de mata preservada e/ou conservada, utilizando como ambiente larval as axilas e outras pequenas cavidades de plantas como as bromélias, além de cascas de folhas caídas, frutos, buracos de árvores e internódios de bambus, pois são locais que acumulam água quando há chuva, tornando-se assim um ambiente favorável para a deposição de ovos (Lane e Cerqueira, 1942). Tais mosquitos, apesar de selváticos, possuem algum potencial para a transmissão de arbovírus de circulação urbana, como é o caso do vírus Zika que já foi observado como passível de ser transmitido por *Sabethes cyaneus*, mesmo que em uma probabilidade muito inferior se comparado ao *Aedes aegypti* (Karna *et al.*, 2018).

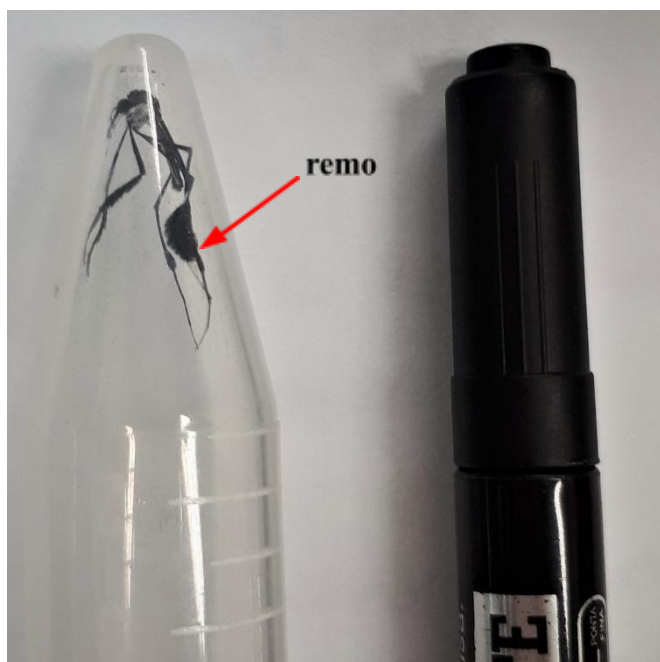
Em relação aos hábitos reprodutivos, ambos os sexos usam seu brilho metálico para a atração mútua (Lane e Cerqueira, 1942). Além deste brilho metálico, algumas espécies de *Sabethes* possuem estruturas nas pernas denominadas de remos, que são ornamentos elaborados que consistem em escamas agrupadas e iridescentes no tarso e na tíbia (Figura 8), e que tem sido parte de estudos sobre atração sexual (South & Arqvist, 2009). Tal estrutura também está presente em pelo menos uma das espécies de interesse deste estudo, o *Sabethes belisarioi*, sendo inclusive uma estrutura tão grande que podemos ver a olho nu a grandes distâncias (Figura 9).

Figura 8. Remo de mosquito do gênero *Sabethes*



South & Arqvist, 2009

Figura 9. Remo de *Sabethes belisarioi*



Fonte: acervo do autor.

Essas estruturas são de extrema importância no acasalamento porque os sabetíneos são mosquitos diurnos e mostram adaptações visuais únicas na estrutura óptica de seus olhos (Land *et al.*, 1999).

Um outro hábito importante é que embora a oviposição ocorra, principalmente, a nível do solo, as fêmeas são encontradas nas copas das árvores, realizando a hematofagia no período diurno (Galindo, Carpenter & Trapido 1951; Chadee, 1990), enquanto que os machos não tem sido encontrados facilmente na natureza, embora presentes. Segundo o estudo de Zsemlye, Hancock & Foster (2005), esses machos podem se atrair pelo som produzido por fêmeas, em que foi observado que os machos de *Sabethes chloropterus* perseguem a fêmea devido a emissão de som pela mesma e, esses machos, nunca apreendem as fêmeas no ar, mas formam pares de acasalamento apenas em substratos verticais. Quando o macho encontra a fêmea, há uma abordagem inicial, seguida de um alinhamento e então um acoplamento superficial gerando então um contato rápido entre a genitália de ambos que varia de 1 a 2 segundos, processo que já foi bem descrito por Hancock, Foster & Yee (1990).

Os mosquitos do gênero *Sabethes*, de um modo em geral, são mosquitos de difícil captura, principalmente se a mata alvo de estudo tiver qualquer tipo de perturbação ambiental à qual esses insetos são muito sensíveis; além do efeito de intrusão, que é o nome dado à observação clara da diminuição de indivíduos conforme passam os dias de

coleta, tornando difícil a obtenção de grandes quantidades destes mosquitos (Forattini, 2002). Além disso, por serem exigentes quanto às condições climáticas da mata e microclimáticas da copa das árvores, são espécies difíceis de criar em laboratório, tornando o estudo com eles um pouco mais delicado do que com os demais gêneros de Culicidae pois o padrão de atividade desses insetos é diretamente influenciado por fatores biológicos endógenos, a exemplo de fatores físicos como a luz, temperatura e umidade, os quais são difíceis de mimetizar em laboratório (De Kruijf, Woodall & Tang, 1973).

Em um estudo realizado por Pinto, Confalonieri & Mascarenhas (2009) no estado do Pará, foi possível observar o padrão de distribuição dos *Sabethes* verticalmente, em que *Sabethes chloropterus* foi encontrado principalmente a uma altura de 16 metros, enquanto que *Sabethes belisarioi* a 30 metros, e praticamente nenhum representante de *Sabethes* foi encontrado a nível do solo. Nesse estudo, também foi avaliada a atividade circadiana, que está diretamente relacionada com o ciclo biológico de todos os organismos e, que para *Sabethes*, apresenta uma maior atividade no período de 12:00 a 13:00 horas e também entre 15:00 a 16:00 horas.

1.1.4. Transmissão de arbovírus com ênfase em febre amarela

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes (*arthropod-born virus*) aos seres humanos e outros animais através da picada de insetos hematófagos (Lopes, Nozawa & Linhares, 2014). Por isso, muitas espécies de mosquitos que ingerem sangue (nem todas o fazem) são importantes para a saúde pública. Esse hábito de ingestão e digestão de sangue permite com que as fêmeas consigam aminoácidos que ajudam na maturação dos ovos. Esse comportamento denominado hematofagia é precedido pela liberação de saliva no hospedeiro; portanto, ao passo que o mosquito se beneficia com o sangue ingerido, o hospedeiro se prejudica ao entrar em contato com a saliva contaminada por patógenos. Saliva esta que foi contaminada anteriormente quando a fêmea realizou hematofagia em um outro hospedeiro infectado (Marcondes, 2011). É principalmente assim que os arbovírus como a dengue, Zika, chikungunya, febre amarela e outras se mantêm circulando.

Os arbovírus são de grande relevância especialmente nas zonas tropicais, e as mudanças climáticas, constantes desmatamentos, urbanização e condições precárias de saneamento tem favorecido a disseminação viral (Rust, 2012). No caso do Brasil, que é um

país tropical de grande extensão territorial e rico em florestas, especialmente na região amazônica, este é um local adequado para a reprodução do vetor e consequente disseminação de arbovírus (Figueiredo, 2000), pois embora existam vetores urbanos importantes como o *Aedes aegypti*, também existem numerosos vetores restritos às áreas de mata.

Dentre os vetores silvestres, podemos citar mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, que são importantes por serem os vetores primário e secundário, respectivamente, de febre amarela silvestre (de Abreu *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020), que é um vírus endêmico na Bacia Amazônica brasileira, ali exclusivamente permanecendo até meados de 1940, quando surtos esporádicos voltaram a ser observados nos estados do Nordeste, Sudeste e Sul (Monath & Vasconcelos, 2015; Benchimol, 2001; Taylor, 1951). O ressurgimento da febre amarela no Sudeste do Brasil entre 2016 e 2018 causou os piores surtos de febre amarela nos últimos 70 anos (Aragão, 2019; de Oliveira *et al.*, 2020).

O ciclo silvestre da febre amarela ocorre principalmente no nível das copas das árvores em regiões de florestas, em que se constitui como principal hospedeiro vertebrado os primatas não humanos. Acredita-se que quando há uma redução na população de macacos, quer por outros fatores ou por epizootias de febre amarela, os mosquitos vetores possam transmitir o vírus para os marsupiais; nesse estágio, a transmissão pode ser mais frequente em nível de solo (Hervé *et al.*, 1986; Vasconcelos *et al.*, 2013).

Uma vez que o ciclo silvestre está fadado a vetores essencialmente silvestres, o homem só se envolverá no ciclo de modo acidental, adentrando ambientes de mata em que haja a presença de vetores infectados. Os indivíduos mais suscetíveis a contrair a doença são aqueles menos imunes que trabalham nesses locais extraindo madeira, realizando caça, pesca, garimpo, turismo ecológico e outros. Este modo específico de contaminação e o hábito silvestre dos vetores acabam por limitar a disseminação da doença, servindo como uma barreira natural de transmissão (Vasconcelos *et al.*, 2013).

Nas Américas, o vírus da febre amarela é considerado enzoótico no ambiente natural de florestas. Nessas áreas, os mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* abrangem espécies hospedeiras do vírus amarílico e com comportamento primatófilico, elo fundamental na veiculação do vírus ao homem (Ministério da Saúde, 2014). Deste segundo gênero, as espécies *Sabethes chloropterus*, *Sabethes glaucodaemon*, *Sabethes cyaneus*, *Sabethes quasicyaneus*, *Sabethes albiprivus* e *Sabethes soperi* são consideradas vetores potenciais de febre amarela; inclusive, o Instituto Evandro Chagas/SVS/MS já conseguiu

isolar este vírus de lotes desses mosquitos provenientes de vários estados brasileiros (Dégallier *et al.*, 1992; Vasconcelos *et al.*, 2001).

A espécie *Sabethes chloropterus* inclusive já foi encontrada naturalmente infectada com o vírus amarelo na América Central. Seus hábitos acrodendrófilos, sua susceptibilidade ao vírus e sua presença marcante em surtos de febre amarela foram alguns motivos pelos quais esta espécie tem sido considerada um provável transmissor (Consoli & Oliveira, 1994). Além disso, seus ovos podem persistir durante a estação seca, o que provavelmente é um fator chave na manutenção da febre amarela em períodos secos (OMS, 2014). Recentemente esta espécie foi encontrada naturalmente infectada com febre amarela pela primeira vez no bioma de Mata Atlântica, onde o espécime infectado foi recuperado quando um surto atingiu uma grande ilha distante cerca de 2 km do continente (Ilha Grande, em Angra dos Reis-RJ) (de Abreu *et al.*, 2018). Outros arbovírus também já foram encontrados nesta espécie a partir de indivíduos coletados na natureza, a exemplo dos vírus da encefalite St. Louis, Ilheus, até mesmo dengue e mais recentemente *Mercadeo virus* (Cunha *et al.*, 2020; Forattini, 1965; Hervé *et al.*, 1986; Serra *et al.*, 2016).

Enquanto que para a espécie *Sabethes glaucodaemon*, apesar de já ter sido assinalada em áreas epizooticas de febre amarela, possui ainda poucos estudos acerca do seu papel na manutenção e transmissão deste vírus (Ministério da Saúde, 2014), embora já tenha sido encontrada naturalmente infectada com o mesmo (Vasconcelos *et al.*, 1997). Também já foi encontrada infectada com outros vírus como o *Sabethes flavivirus* (Cunha *et al.*, 2020).

No que diz respeito a *Sabethes belisarioi*, este já foi encontrado naturalmente infectado com arbovírus, incluindo os causadores de encefalite (Hervé *et al.*, 1986), a exemplo da encefalite St. Louis (Causey, Shope & Theiler, 1964). Esta é uma espécie que, assim como *Sabethes glaucodaemon*, não possui muitas informações epidemiológicas.

Uma outra espécie relevante é *Sabethes cyaneus*, pois tem sido sugerida como um possível vetor para a transmissão de Zika selvagem, embora em uma ordem muito inferior se comparado ao *Ae. aegypti* (Karna *et al.*, 2018). Esta espécie aparentemente também tem sido encontrada infectada com febre amarela, podendo sugerir um papel secundário na manutenção do vírus (Vasconcelos, 2003).

As espécies *Sabethes bipartipes*, *Sabethes quasicyaneus* e *Sabethes tarsopus* pouco aparecem na literatura médica, a não ser em alguns relatos taxonômicos e ecológicos (Fé *et al.*, 2003; Guimarães, Arlé & Machado, 1985).

Um estudo de Althouse *et al.* (2016) que aponta o gênero *Sabethes* como um possível transmissor do *Zika virus* em âmbito selvagem pede com urgência estudos com espécies desse gênero pois, como afirmam os autores, o vírus da Zika se originou e continua a circular em áreas preservadas, as quais são comuns no Brasil e especialmente na região amazônica. Inclusive, foi recentemente isolado o *Xiburema virus* de mosquitos do gênero *Sabethes* na região amazônica, reforçando a importância médica do mesmo, especialmente no contexto regional (Wanzeller *et al.*, 2014).

1.1.5. Microbioma

As ciências ômicas trouxeram consigo um enorme volume de dados biológicos, resultando em novas descobertas a respeito das comunidades microbianas, especialmente a constituinte do microbioma humano, que tem revelado nos estudos desenvolvidos no *The Integrative Human Microbiome Project* seu importante papel na regulação da saúde do indivíduo (IHMP, 2019). Tal regulação pode estar relacionada com alterações na expressão gênica tanto do hospedeiro quanto do próprio microbioma, conforme mostram Li *et al.* (2016), que foram capazes de elucidar que microRNAs do hospedeiro podem regular a expressão de genes bacterianos, o que pode resultar em uma microbiota desequilibrada e consequentemente em um processo de adoecimento do hospedeiro.

Assim como o dos seres humanos, o microbioma de outros organismos também tem chamado a atenção, a exemplo do microbioma de rizosferas de plantas, que fornece uma série de funções benéficas para a mesma (Zhang *et al.*, 2020). O que também é o caso do microbioma de corais, que melhora o estresse e mitiga o branqueamento e morte do hospedeiro (Santoro *et al.*, 2021). E, claro, de ruminantes como as ovelhas, que possuem uma relação muito estreita com microrganismos simbióticos no trato digestivo, e que por isso tem sido alvo de estudos que avaliam a relação do microbioma e da idade e estado nutricional (Li *et al.*, 2020).

Os mosquitos, por sua vez, também são objeto de estudos de comunidades microbianas, sendo grupo de interesse de um consórcio denominado *Mosquito Microbiome Consortium*, que foi criado devido a grandes quantidades de dados disponíveis sobre diferentes espécies de mosquitos com várias características fisiológicas subjacentes e de diversas localizações geográficas que são tratados sem uma padronização metodológica. Esse consórcio objetiva trabalhar coletivamente para desvendar o papel do microbioma do

mosquito na biologia do mesmo, enquanto avalia criticamente seu potencial para o controle de doenças transmitidas por esses insetos (Dada *et al.*, 2021).

Dentre os estudos de microbioma de mosquitos, podemos destacar o de Caragata, Tikhe & Dimopoulos publicado em 2019 e que discute a interação entre mosquitos, sua microbiota e arbovírus, inclusive como as alterações induzidas por microrganismos na imunidade do inseto modulam a infecção com arbovírus e também o papel do endossimbionte *Wolbachia* na biologia do hospedeiro.

De modo semelhante, o estudo de Guegan *et al.* (2018) discute os papéis funcionais da microbiota e destaca suas interações com a biologia do hospedeiro e a transmissão de patógenos. Neste artigo os autores consideram que conferir o termo holobionte ao mosquito e sua microbiota é útil para obter uma compreensão abrangente do funcionamento do patossistema vetorial, de modo a poder desenvolver novas e eficientes estratégias de controle de vetores.

De um modo geral, muitos estudos tem surgido nas últimas duas décadas a respeito do microbioma de mosquitos (Dada *et al.*, 2021; Pang *et al.*, 2016; Van Tol & Dimopoulos, 2016; Thongsripong *et al.*, 2017; Mancini *et al.*, 2018; Alfano *et al.*, 2019), os quais tem se tornado cada vez mais frequentes devido ao advento das plataformas de sequenciamento de material genético. Nesses estudos, as abordagens utilizadas geralmente são: o sequenciamento do gene 16S rRNA, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal bacteriano, sendo possível acessar rapidamente a diversidade; e também a abordagem *whole genome shotgun*, que consiste no sequenciamento do genoma completo de bactérias e outros microrganismos e que permite entender melhor as características funcionais do microbioma (Dada *et al.*, 2021).

Um exemplo de estudo de microbioma utilizando 16S rRNA é o de Muturi *et al.* (2016), em que foi possível estudar a microbiota do intestino médio de mosquitos, sendo observada a predominância de *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*, admitindo-se ainda que o padrão de variação das bactérias encontradas pode se dar por fatores externos e internos, como condições fisiológicas do intestino, dieta larval e adulta, infecção por parasitas e patógenos, envelhecimento do hospedeiro e antecedentes genéticos do hospedeiro. Hyde *et al.* (2019) também usaram o sequenciamento de 16S rRNA para a identificação de bactérias resistentes a antibióticos encontradas no microbioma de mosquitos.

Apesar da variedade de estudos usando o marcador 16S rRNA, fica claro que para entender mais profundamente as relações dentro de um sistema microbiano é interessante avaliar por uma óptica funcional e interativa, a qual só é possível com um sequenciamento do tipo *whole shotgun*; apesar disso, poucos estudos são encontrados na literatura disponível no que diz respeito este tipo de abordagem de sequenciamento sendo usada para o microbioma de mosquitos. Provavelmente, isto tem acontecido devido, principalmente, à quantidade de leituras que são direcionadas ao DNA do hospedeiro, o que acaba ocasionando em uma menor representação dos genomas bacterianos, embora a redução da quantidade de tecido do hospedeiro nas amostras (ex: sequenciando apenas o intestino médio ao invés do corpo inteiro) pareça ser uma solução útil; além disso, um outro fator é que a manipulação por biologia computacional de dados de 16S rRNA é muito mais simples do que a manipulação de *whole genome shotgun*.

Independentemente do tipo de abordagem de sequenciamento escolhida, é inegável que estudos sobre o microbioma de mosquitos são importantes, pois, os mosquitos, assim como outros organismos, vivem em associações com microrganismos, as quais são primordiais para a evolução e especiação dos parceiros envolvidos (Dale & Moran, 2006). Esses insetos possuem um microbioma com diversidade de bactérias, protozoários e vírus, dos quais alguns são específicos de artrópodes, protozoários e plantas (Shi *et al.*, 2015; Brinkmann, Nitsche & Kohl, 2016; Fauver *et al.*, 2016; Frey *et al.*, 2016). Essas relações do microbioma com o hospedeiro invertebrado contribuem para que este último adquira resistência a agentes patogênicos e/ou tolerância a estresses abióticos (Reshef *et al.*, 2006; Guay *et al.*, 2009). Os endossimbiontes bacterianos, por exemplo, afetam consideravelmente os aspectos da proteção contra inimigos, nutrição, reprodução e desenvolvimento dos insetos (Douglas, 2011). Essas relações podem ser exploradas com o objetivo de desenvolver estratégias de controle baseadas na manipulação dos microrganismos associados, sendo um dos exemplos mais conhecidos a bactéria *Wolbachia* (Iturbe-Ormaetxe, Walker & O'Neill, 2011; Calvitti *et al.*, 2012; Ricci *et al.*, 2012; Straub *et al.*, 2020).

Devido à forte influência que o microbioma tem sob os aspectos reprodutivos, nutricionais e imunes do mosquito, podemos afirmar que essa relação simbiótica é tão forte quanto a relação dos seres humanos e seu microbioma. No caso dos mosquitos, há estudos relatando o papel da microbiota natural na melhora da imunidade, fornecendo resistência contra patógenos invasores (Dong, Taylor & Dimopoulos, 2006; Xi, Ramirez &

Dimopoulos, 2008; Dong, Manfredini & Dimopoulos, 2009; Ramirez *et al.*, 2012a). Além disso, é possível que essa relação simbiótica tenha uma certa especificidade, uma vez que em 2017, Novakova *et al.*, perceberam que a espécie do mosquito está fortemente relacionada com seu perfil microbiano, havendo uma filossimbiose entre hospedeiro e microbiota. Em relação aos tecidos do mosquito, também parece haver uma certa filia dos microrganismos pelo intestino médio (estômago); principal órgão envolvido em estudos sobre microbiota, devido à sua forte interação com patógenos potenciais, embora outros tecidos como o adiposo, glândulas salivares e órgãos reprodutivos também possam ser colonizados por tais agentes (Akhouayri *et al.*, 2013; Damiani *et al.*, 2010; Favia *et al.*, 2007; Gimonneau *et al.*, 2014; Gusmao *et al.*, 2010; Lindh *et al.*, 2008; Ricci *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011).

No que diz respeito aos detalhes de como as bactérias podem interferir no sistema imune do mosquito, e consequentemente capacidade vetorial, é possível afirmar que existe um consenso na literatura que admite que a presença de bactérias Gram-negativas protege contra arbovírus, especialmente o vírus dengue (Ramirez *et al.*, 2012, 2014; Xi, Ramirez & Dimopoulos, 2008). A influência das bactérias endógenas na sinalização imunológica, interação direta com o vírus e competição por recursos compartilhados podem alterar a competência do vetor (Van Tol & Dimopoulos, 2016). Além disso, tem sido observado que a presença de bactérias melhora a expressão basal de peptídeos antimicrobianos (AMP) que atuam como moléculas efetoras antibacterianas e antivirais (Dong *et al.*, 2012; Luplertlop *et al.*, 2011; Ramirez *et al.*, 2012; Xi, Ramirez & Dimopoulos, 2008).

É importante ressaltar que os vírus também são considerados constituintes do microbioma do hospedeiro, embora muitas vezes sejam categorizados à parte como “viroma” ou “virobiota” (de Almeida *et al.*, 2021; Nebbak *et al.*, 2021). Esses vírus associados aos mosquitos são importantes porque podem ser considerados como arbovírus, provocando doenças em hospedeiros vertebrados; ou como vírus inseto-específico (ISV), que é não-infeccioso para o vertebrado mas possui capacidade para alterar a competência vetorial do inseto (Nebbak *et al.*, 2021).

Fortalecendo ainda mais essa ideia de que vírus específicos de insetos são importantes no que diz respeito à transmissão de arbovírus, o trabalho de Schultz, Frydman & Connor (2018), avaliou a hipervariação do crescimento do vírus Zika em linhagens de *Aedes aegypti*, uma vez que a replicação viral era consistente em células de *Aedes albopictus*; nesse momento, os pesquisadores hipotetizaram que poderiam haver vírus oportunistas

modulando a infecção pelo Zika; tais vírus oportunistas supostamente seriam os vírus específicos de insetos. Mais tarde, perceberam que de fato esses vírus de inseto mudavam o padrão de replicação do vírus Zika. Para ser mais específico, o vírus inseto-específico que eles observaram como responsável pela situação em questão era o *Phasi charoen*, que estava presente nas linhagens celulares de *Aedes aegypti* com variável de crescimento *Zika virus* (ZIKV), mas ausente nas linhagens de *Aedes albopictus*, sugerindo que esses ISV podem interferir no crescimento de ZIKV.

Outro trabalho relevante sobre ISV é o de Zakrzewski *et al.* (2018), que encontraram mais de 27 vírus deste tipo que possivelmente infectaram *Aedes aegypti*, dos quais 23 permaneciam sem caracterização. Nesse artigo também foi proposto que é possível que a infecção por esses vírus possa diminuir quando os mosquitos são introduzidos em laboratório.

Além de mosquitos do gênero *Aedes*, também está disponível na literatura artigos sobre ISV identificados em outros gêneros, a exemplo do *Culex*, que foi alvo no estudo de Altinli *et al.* (2020) no que tange a interação de *Wolbachia* e ISV em populações naturais de *Culex pipiens*. Entretanto, no caso de mosquitos *Sabethes*, poucas informações estão disponíveis, embora em 2019 tenha sido descoberto um novo ISV infectando *Sabethes belisarioi* que foi denominado *Sabethes flavivirus* (Gravina *et al.*, 2019).

Por muito tempo esses vírus específicos de insetos foram negligenciados porque acreditava-se que não tinham muita importância médica e veterinária, mas seu potencial para a transmissão de arbovírus tem despertado interesse, uma vez que parecem dificultar a transmissão dos mesmos (Halbach, Junglen & Van Rij, 2017). Por exemplo, já foi observado que o vírus Palm Creek ou o vírus Nhumirim, ambos Flavivirus, prejudicam a replicação do vírus do Oeste do Nilo e outros arbovírus (Hobson-Peters *et al.*, 2013; Kenney *et al.*, 2014; Goenaga *et al.*, 2015).

Apesar da importância desses vírus para o mosquito vetor, estes não se replicam em organismos vertebrados, conforme dito anteriormente, sendo restritos ao hospedeiro e fazendo parte da sua então denominada “virobiota” (Guégan *et al.*, 2018), configurando-se como marca registrada de cada mosquito, além serem fortes aliados no controle de arbovírus. Embora esses tipos de vírus não se repliquem em organismos vertebrados, nada os impedem de um dia fazê-lo, uma vez que há mais de 50 anos atrás autores como Maramorosch (1955), Andrewes (1957), Mattingly (1960) sugeriram que os arbovírus tais quais conhecemos hoje originaram de vírus precursores em artrópodes, e só então foram

introduzidos aos vertebrados, o que nos permite olhar para os vírus específicos de insetos com um olhar mais preocupante, já que um dia possam vir a ser arbovírus importantes.

Do mesmo modo que algumas bactérias já tem provado seu potencial para o controle biológico de arbovírus, os vírus específicos de insetos também tem começado a mostrar o mesmo, pois, além de mudarem o padrão de replicação de vírus oportunistas, também mostram potencial para serem usados em vacinas. Além do mais, esses vírus podem ser transmitidos por via transovariana, possibilitando a criação de mosquitos infectados com ISV, que são incapazes de transmitir certos arbovírus aos seres humanos (Bolling *et al.*, 2015b).

Mesmo que a importância dos vírus inseto-específicos já seja reconhecida por muitos profissionais da área, ainda há uma parcela que acredita que o viroma e o microbioma de um mosquito não tem tanta força assim sobre a transmissão de doenças, mas que uma mesma espécie possui o mesmo potencial de transmissão, que depende apenas de fatores abióticos como o clima e a susceptibilidade da população humana local em contrair doenças. Mas sabemos que essa é uma visão simplista, e que as bactérias e vírus presentes no mosquito influenciam sim sua capacidade vetorial (Guzman *et al.*, 2018). Portanto, por todas afirmações e controvérsias a respeito desses vírus, faz-se importante realizar tanto estudos que busquem conhecer o perfil de diversidade e abundância dos mesmos bem como estudos que visem entender detalhadamente a função e os mecanismos de ação dos vírus inseto-específicos no controle de arbovírus importantes.

Por fim, a literatura disponível reflete o papel do microbioma (comunidade bacteriana + virobiota) no *fitness* do mosquito e, independente da abordagem usada para se conhecer as bactérias e vírus vivendo associados aos mosquitos, os achados sem dúvidas têm sido importantes para ajudar a traçar novos meios de controle de transmissão de doenças importantes que de tempos em tempos apresentam novos surtos. Esses trabalhos de maneira direta ou indireta nos proporcionam a compreensão da competência vetorial e de como alguns fatores relacionados à capacidade, como a temperatura, a umidade, padrões de alimentação e a própria comunidade bacteriana, são fatores determinantes (Carrington *et al.*, 2013; Severson & Behura, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a comunidade bacteriana e os vírus presentes em mosquitos do gênero *Sabethes* provenientes da região metropolitana de Belém-PA, Brasil.

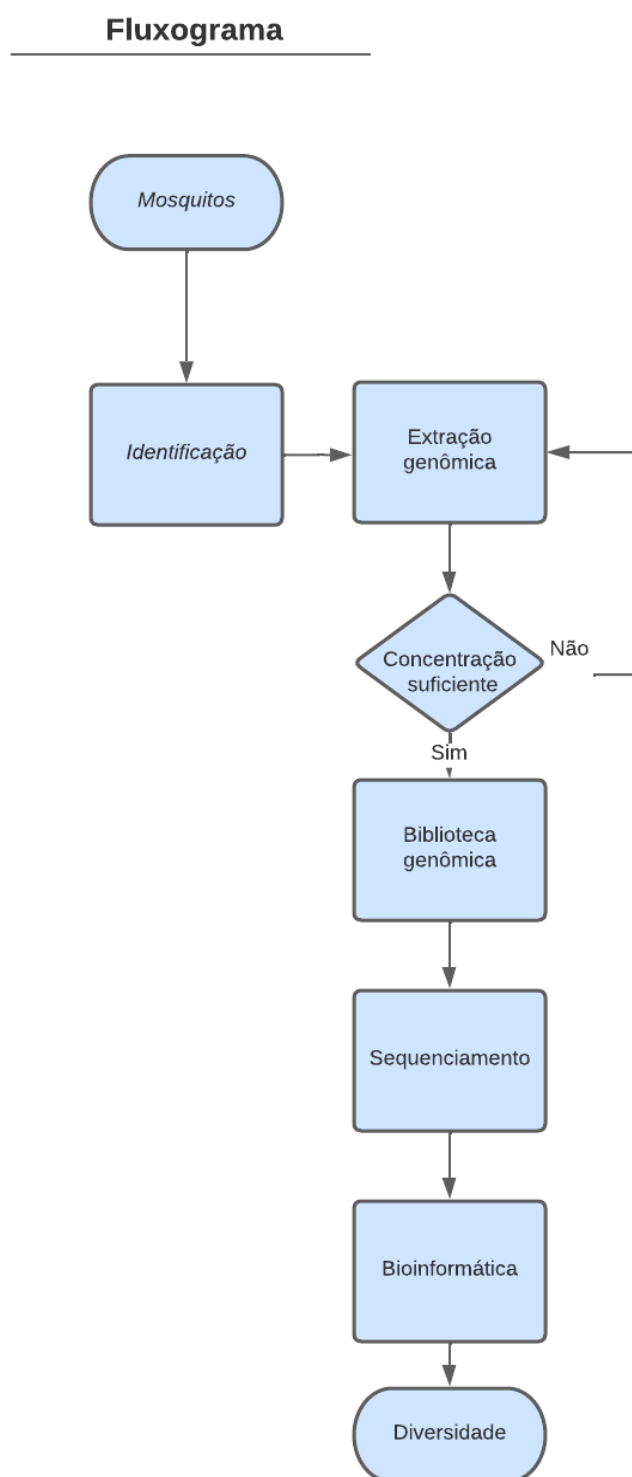
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Descrever a diversidade do microbioma dos mosquitos em estudo
- ❖ Verificar a possibilidade de existência de filossimbiose
- ❖ Identificar microrganismos candidatos para controle biológico

3. MATERIAL E MÉTODOS

De um modo geral, as etapas do trabalho seguiram de acordo com o fluxograma (Figura 10), que serão melhor detalhadas adiante.

Figura 10. Fluxograma demonstrando as etapas seguidas durante a pesquisa



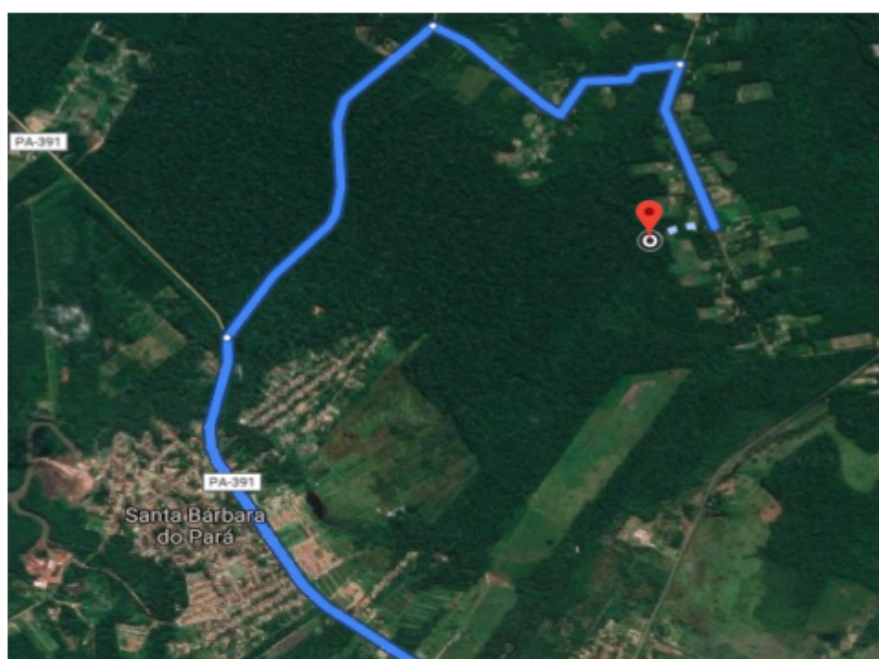
3.1. AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA

Foi concedida pelo SISBIO/IBAMA a autorização para atividades de coleta de mosquitos (Culicidae). Esta licença encontra-se nos anexos.

3.2. ÁREA DE COLETA

As coletas foram realizadas pela manhã no assentamento Expedito Ribeiro localizado no município de Santa Bárbara-PA, Brasil e na mata do Instituto Evandro Chagas em Ananindeua-PA, Brasil ao longo dos anos 2017-2021 de maneira esporádica; primeiro devido aos riscos envolvidos, pois as chuvas diárias na região metropolitana de Belém dificultam as coletas que são realizadas em plataformas fixadas em copas de árvores, e em segundo devido à sazonalidade do gênero *Sabethes* observada pelos próprios técnicos do Instituto Evandro Chagas que relatam a raridade e difícil coleta dos espécimes, o que também já foi observado por alguns estudiosos conforme indicado no referencial teórico. Com relação a área em que as coletas ocorreram no assentamento Expedito Ribeiro, esta possui vegetação característica da região amazônica (Figura 11), sendo úmida e com grande quantidade de serrapilheira, embora a alteração da paisagem provocada pelo homem seja visível devido a atividade de extração de madeira que é frequentemente realizada por trabalhadores locais.

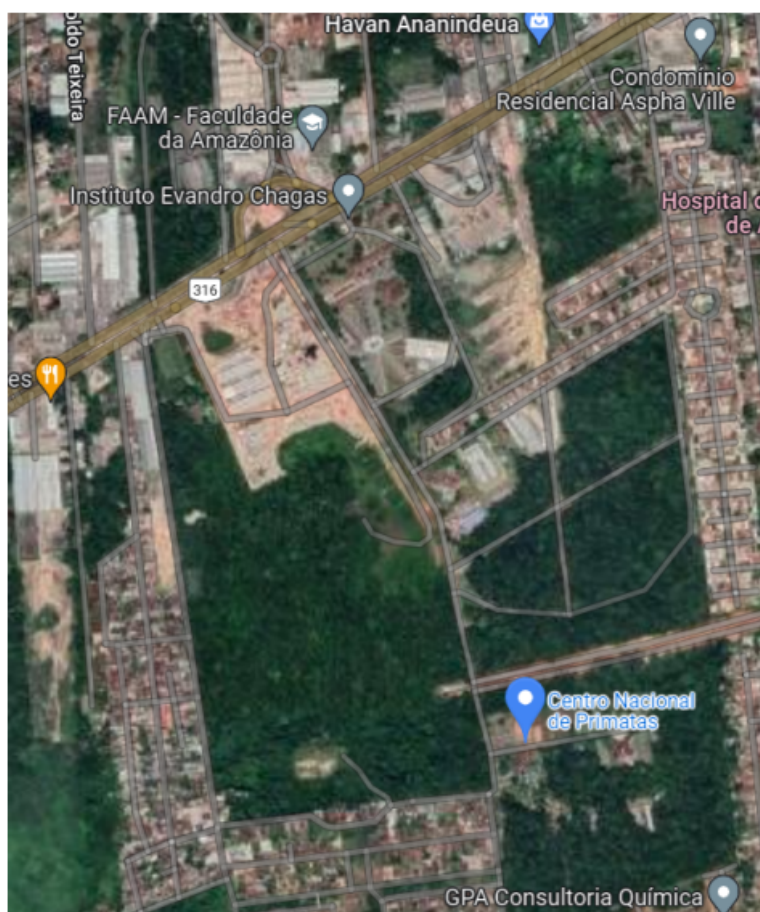
Figura 11. Visão por satélite da área de coleta no assentamento Expedito Ribeiro



Fonte: Google Earth, 2022.

Por conta dessa alteração ambiental, é muito provável que a biodiversidade esteja sendo afetada, inclusive de mosquitos e consequentemente dos microrganismos que estes carregam. Portanto, o desmatamento juntamente com a presença de populações humanas no entorno é preocupante, uma vez que é conhecida a presença de mosquitos transmissores de febre amarela e da alta reatividade em testes imunológicos para arbovírus neste local, incluindo febre amarela. Esses aspectos tornam esta mata importante para estudos eco-epidemiológicos, justificando assim nossa escolha por esse local (Baia, 2017). Com relação à mata do IEC (Figura 12), esta se torna interessante devido sua proximidade ao conjunto Júlia Seffer, sendo relevante realizar a vigilância epidemiológica no local para a manutenção da saúde dos moradores do entorno. Além disso, este é um local com plataformas para coleta previamente instaladas.

Figura 12. Visão por satélite da área de coleta na mata do IEC



Fonte: Google Earth, 2022.

3.3. OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Para coleta dos mosquitos foi indispensável o uso de equipamentos de proteção individual (EPI), principalmente porque nos dias de coleta a equipe técnica preferencialmente não utilizou cosméticos e obrigatoriamente estava sem repelentes a fim de permitir a aproximação dos *Sabethes* spp.; portanto, roupas grossas foram usadas pela equipe para minimizar o risco de contrair arbovírus e outros agentes. Também foram utilizados equipamentos que auxiliam na segurança ao subir em árvores, como os cintos de segurança, luvas e capacetes (Figura 13). Além disso, a vacinação de todos estava em dia.

Figura 13. Equipamentos de proteção individual



Fonte: acervo do autor.

A rede puçá foi utilizada para capturar os mosquitos na copa das árvores, os quais foram imediatamente acondicionados em tubos falcon de 15 mL e transportados para laboratório (Figura 14).

Figura 14. Tubos tipo falcon e rede puçá



Fonte: acervo do autor.

Os mosquitos coletados foram identificados até nível de espécie pela equipe técnica do laboratório de Entomologia da Seção de Arbovirologia do Instituto Evandro Chagas SVS/MS.

3.4. ORGANIZAÇÃO DOS MOSQUITOS EM *POOLS*

Devido a raridade e consequente dificuldade em coletar mosquitos do gênero *Sabethes* spp. conforme relatado anteriormente, fez-se necessário algumas medidas para o andamento da pesquisa: (I) mesmo que *Sabethes chloropterus* e *Sabethes glaucodaemon* tenham montantes de 81 e 131 espécimes respectivamente, tivemos que nos limitar a 37 espécimes/*pool* pois essa foi a quantidade máxima adquirida de *Sabethes belisarioi*, mantendo-se assim a homogeneidade no número de espécimes; (II) não foi possível adquirir espécimes suficientes para comparar Santa Bárbara e IEC, levando-nos a unir os mosquitos de ambos os locais e realizar um estudo mais amplo da região metropolitana de Belém-PA. Um outro ponto importante é que trouxemos para as análises outros mosquitos do gênero *Sabethes*, além de *Sa. chloropterus*, *Sa. glaucodaemon* e *Sa. belisarioi*, são eles: *Sabethes bipartites*, *Sabethes cyaneus*, *Sabethes tarsopus* e *Sabethes quasicyaneus*. Esses mosquitos foram coletados no mesmo local do assentamento Expedito Ribeiro em 2017 e realizamos a

extração do DNA total e sequenciamos, ainda naquele ano, utilizando a plataforma NextSeq 500/550 (Illumina), conforme será descrito logo adiante. Esses mosquitos não tiveram sequenciamento de RNA mas puderam ser analisados com relação principalmente à comunidade bacteriana. Esses resultados e a discussão serão apresentados pela primeira vez mais adiante juntamente com as demais espécies.

3.5. ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO

3.5.1. *Sa. chloropterus*, *Sa. glaucodaemon*, *Sa. belisarioi*

Antes de iniciar a etapa de isolamento do material genético, os mosquitos *Sa. chloropterus*, *Sa. glaucodaemon* e *Sa. belisarioi* foram organizados em *pools* contendo 37 espécimes de cada, os quais posteriormente foram submetidos a uma lavagem externa com a finalidade de remover contaminantes ambientais, que seriam fungos, bactérias, vírus e outros seres carreados na parte externa no inseto e que poderiam ser sequenciados provocando um viés na análise. Essa lavagem foi realizada semelhante ao descrito por Chandler, Liu & Bennett (2015), Pang *et al.* (2016) e Hegde *et al.* (2018) usando etanol 70% por 5 minutos e em seguida água destilada por 5 minutos. Depois da lavagem os mosquitos foram submetidos à etapa de maceração que ocorreu com o auxílio do equipamento TissueLyser II (Qiagen). Para isso, foram adicionados em torno de 600 µl de solução de PBS (Phosphate-buffered saline) para cada pool em microtubos tipo eppendorf. A maceração ocorreu durante 1 minuto. Do macerado foram retiradas duas alíquotas: uma de 140 µl para o isolamento do RNA total e outra de 80 µl para o isolamento de DNA total, ambos usando kits comerciais (QIAmp viral RNA kit (Qiagen) e DNeasy blood & tissue DNA kit (Qiagen), respectivamente) de acordo com as recomendações do fabricante. Os dois materiais isolados passaram pela avaliação de controle de qualidade usando o Qubit 4.0 fluorometer e os kits RNA HS assay e dsDNA HS assay (Thermo Fisher Scientific) para RNA e DNA, respectivamente, de acordo com o fabricante. Isto nos permitiu observar se havia concentração suficiente de material genético presente em cada amostra. Após os procedimentos de isolamento e verificação da concentração, as amostras foram armazenadas em – 80° C até a etapa de sequenciamento.

No preparo de biblioteca tanto de RNA quanto DNA foi utilizado o kit e o protocolo de preparação de biblioteca SureSelectQXT Whole Genome Library Prep for Illumina Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies), sendo que para o RNA, este foi convertido em cDNA usando os kits SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher) e NEBNext mRNA

Second Strand Synthesis Module (Biolabs). O sequenciamento ocorreu na plataforma NextSeq 500/550 (Illumina) usando o kit High Output (Illumina) para NextSeq 500/550 com 150 ciclos de leituras pareadas.

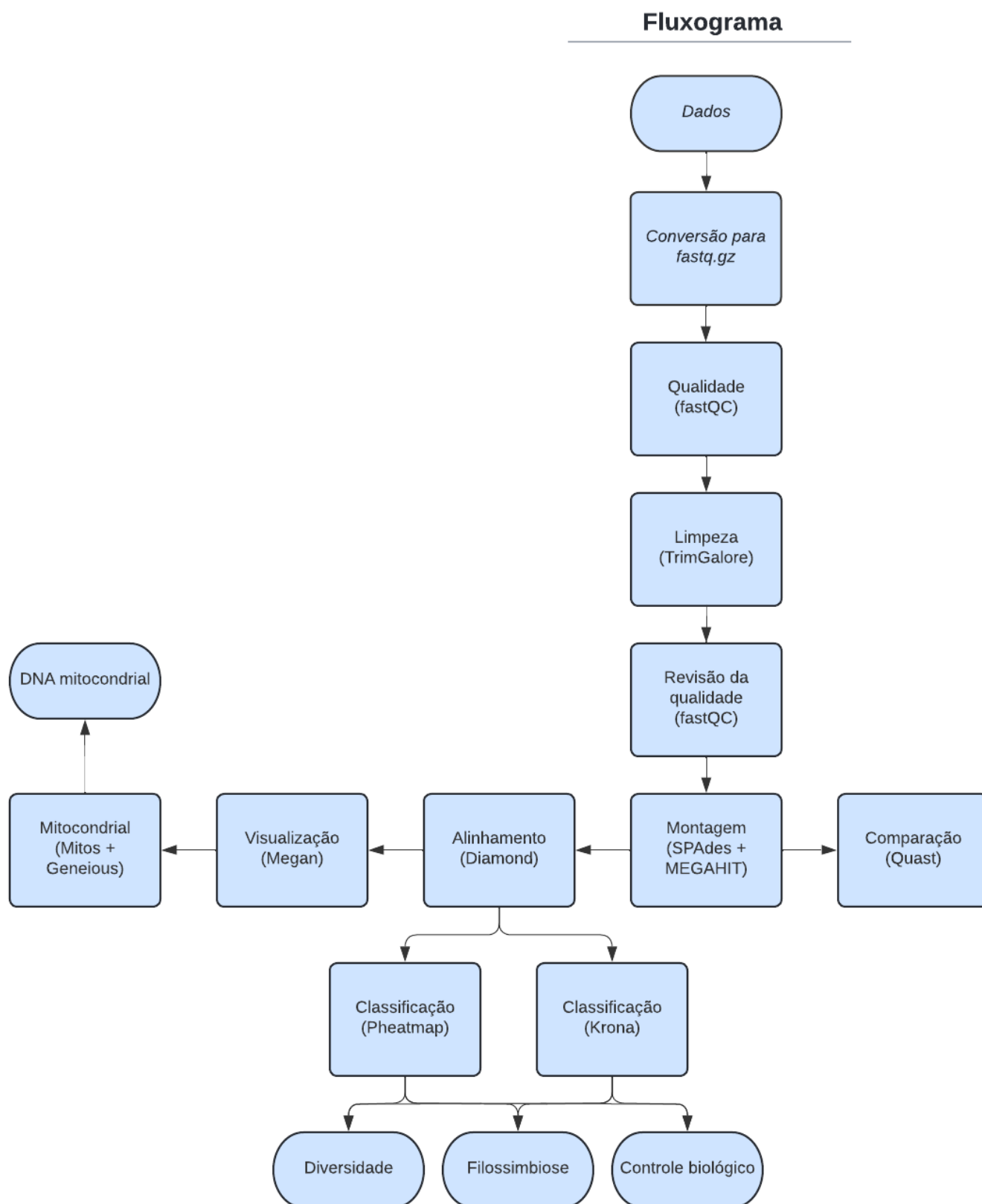
3.5.2. *Sa. bipartipes*, *Sa. cyaneus*, *Sa. tarsopus* e *Sa. quasicyaneus*

Para esses mosquitos, foram alocados de 3 a 6 espécimes/*pool*, os quais foram macerados semelhante ao citado anteriormente, usando o equipamento TissueLyser II (Qiagen) e 1 ml de solução de PBS adicionado aos *pools* em microtubos tipo eppendorf. A maceração ocorreu durante 1 minuto. Em seguida, o DNA total foi isolado usando o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total isolado de cada pool também foi inicialmente quantificado no equipamento Qubit 4.0 fluorômetro (Life Technologies) utilizando o kit comercial Qubit dsDNA Hs Assay (Invitrogen) seguindo as recomendações estabelecidas pelo fabricante. Após os procedimentos de isolamento e verificação da concentração, as amostras foram armazenadas em -80°C até a etapa de sequenciamento. Para o preparo da biblioteca genômica, foi utilizado o kit e o protocolo Nextera XT DNA Library Prep kit (Illumina). A reação de sequenciamento genômico ocorreu utilizando o kit NextSeq 500/550 High Output (Illumina) utilizando 150 ciclos de leituras pareadas na plataforma NextSeq 500/550 (Illumina).

3.6. BIOLOGIA COMPUTACIONAL

As etapas analisadas por técnicas de Bioinformática serão descritas a seguir e foram realizadas de acordo com o exposto no fluxograma apresentado na Figura 15, que encontra-se na próxima página.

Figura 15. Fluxograma representando as etapas de Bioinformática



3.6.1. Tratamento inicial e qualidade das leituras de todos os *Sabethes* spp.

O arquivo de saída em formato .bcl do NextSeq 500/550 foi primeiramente convertido em .fastq usando o bcl2fastq Conversion v.2.20 (Illumina). Em seguida, o FastQC v.0.11.9 (Andrews, 2019) foi usado para visualizar previamente a qualidade das leituras, e o TrimGalore v.0.6.5 (Krueger, 2015) foi usado para remover as sequências adaptadoras e bases com baixa qualidade (PHRED=30). Ao final do processo, o FastQC v.0.11.9 foi executado novamente para validar a qualidade dos dados.

3.6.2. Confirmação da espécie

Todas as espécies do gênero *Sabethes* de interesse nesse estudo tiveram seu genoma mitocondrial montado pelo método *De Novo* usando MEGAHIT v.1.2.9 (nos k-mers de 21, 29, 39, 59, 79, 99, 119 e 141 pb) (Li *et al.*, 2015) e SPAdes v.3.15.3 (nos k-mers de 21, 33 e 55) (Bankevich *et al.*, 2012), bem como todos os demais genomas presentes na amostra. Os *contigs* gerados e correspondentes ao genoma mitocondrial foram selecionados usando o DIAMOND v.2.0.9.147 (Buchfink *et al.*, 2015), e então visualizados no MEGAN6 (Huson *et al.*, 2007). Os *contigs* correspondentes ao genoma mitocondrial foram anotados usando a ferramenta online MITOcondrial genome annotation Server (MITOS - <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>) (Bernt *et al.*, 2013) e inspecionados manualmente usando Geneious v.11.0 (Kearse *et al.*, 2012). Nos casos de *Sa. chloropterus*, *Sa. glaucodaemon*, *Sa. belisarioi* (Aragão *et al.*, 2018) e *Sa. cyaneus* (Muñoz-Gamba *et al.*, 2020), que possuem dados disponíveis em bancos genômicos como o National Center for Biotechnology Information (NCBI), sua identidade molecular foi imediatamente confirmada a partir de alinhamento de genes barcode como o Citocromo Oxidase I (COI) usando o alinhador MAFFT. As espécies *Sa. bipartipes*, *Sa. tarsopus* e *Sa. quasicyaneus*, que não possuem nenhuma informação depositada no NCBI, tiveram os *contigs* correspondentes ao genoma mitocondrial comparados com dados genômicos de uma sequência de referência (*Sabethes belisarioi*, Genbank-NCBI ID: NC_037498) além das demais etapas citadas anteriormente a fim de se obter o genoma mitocondrial completo.

3.6.3. Classificação de *contigs* dentro do microbioma

Os *contigs* foram confrontados com o banco de dados de referência NR (não redundante) do NCBI contendo sequências de referência para bactéria e vírus (Disponível em: <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/>).

A partir do *output* gerado pelo Diamond, os *contigs* bacterianos e virais foram tabulados e gerados heatmaps utilizando o pacote Pheatmap, do R (Kolde, 2018). Também foi elaborado um gráfico dinâmico no Krona charts para melhor visualização dos *contigs*.

Foi realizada inspeção manual dos *contigs* classificados e apresentados no Krona charts objetivando a observação de uma possível filossimbiose, ou seja, detecção de espécies de microorganismos que fossem exclusivas de cada mosquito estudado.

3.6.4. Microrganismos candidatos para controle biológico

Os microrganismos considerados como candidatos para controle biológico foram aqueles já descritos na literatura como importantes para o controle biológico de arbovírus. Entretanto, é necessário também levar em consideração os *contigs* que não foram classificados e aqueles cuja espécie ainda não se tem informações consistentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

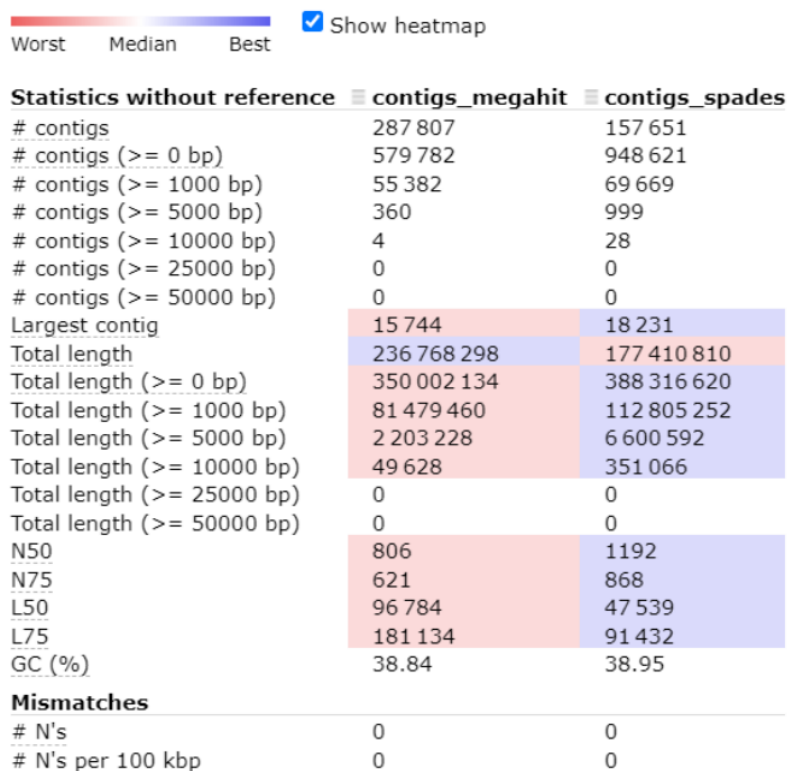
4.1. QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO

Todos os sequenciamentos geraram arquivos brutos de alta qualidade. Esses arquivos apresentaram qualidade superior após a etapa de limpeza, garantindo uma maior confiabilidade dos dados analisados, já que apenas as bases nucleotídicas com alto nível de certeza fizeram parte do estudo. Os gráficos do FastQC que demonstram a qualidade dos dados antes e após a etapa de limpeza encontram-se no apêndice.

4.2. QUALIDADE DA MONTAGEM

Após a montagem com MEGAHIT e SPAdes, foi possível observar que de um modo geral o SPAdes teve um melhor desempenho na construção de *contigs* para todos os mosquitos do gênero *Sabethes*, semelhante ao que pode ser observado para o sequenciamento de DNA de *Sa. chloropterus* (Figura 16). Por isso, todos os resultados apresentados a seguir dizem respeito à montagem com SPAdes.

Figura 16. Comparação entre montagens usando diferentes softwares



	contigs_megahit	contigs_spades
Statistics without reference		
# contigs	287 807	157 651
# contigs (>= 0 bp)	579 782	948 621
# contigs (>= 1000 bp)	55 382	69 669
# contigs (>= 5000 bp)	360	999
# contigs (>= 10000 bp)	4	28
# contigs (>= 25000 bp)	0	0
# contigs (>= 50000 bp)	0	0
Largest contig	15 744	18 231
Total length	236 768 298	177 410 810
Total length (>= 0 bp)	350 002 134	388 316 620
Total length (>= 1000 bp)	81 479 460	112 805 252
Total length (>= 5000 bp)	2 203 228	6 600 592
Total length (>= 10000 bp)	49 628	351 066
Total length (>= 25000 bp)	0	0
Total length (>= 50000 bp)	0	0
N50	806	1192
N75	621	868
L50	96 784	47 539
L75	181 134	91 432
GC (%)	38.84	38.95
Mismatches		
# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Fonte: Quast online, 2022.

É possível notar que o SPAdes gerou *contigs* maiores, elevando o valor de N50, que é uma avaliação estatística da qualidade da montagem uma vez que refere-se ao tamanho do *contig* em que a partir dele a soma dos demais *contigs* de igual ou maior tamanho representa 50% das informações geradas. Adicionalmente temos o L50, que é uma métrica em que se busca um valor baixo, pois representa a quantidade de *contigs* necessários para representar 50% da informação gerada (Gurevich *et al.*, 2013). Os resultados mostraram-se semelhantes para todas as espécies tanto na montagem do DNA quanto do RNA. Essas informações podem ser consultadas no apêndice.

4.3. DIVERSIDADE DO MICROBIOMA, FILOSSIMBIOSE E CONTROLE BIOLÓGICO

Foi possível detectar números muito mais expressivos de *contigs* bacterianos do que virais, o que já era esperado devido ao tamanho das bactérias ser significativamente maior do que o tamanho dos vírus, resultando em uma maior probabilidade de sequenciamento bem como sucesso na etapa de montagem. Isso é um ponto importante porque vírus pouco abundantes ou muito pequenos podem passar despercebidos em casos de sequenciamentos com baixa quantidade de reads disponíveis, fazendo-se necessário um maior cuidado durante a etapa de desenho experimental e aquisição de kits de sequenciamento.

É importante ressaltar que para as espécies *Sa. bipartipes*, *Sa. cyaneus*, *Sa. tarsopus* e *Sa. quasicyaneus* não foi possível obter *contigs* de RNA viral uma vez que essas amostras foram sequenciadas apenas para DNA.

O número de *contigs* para cada amostra está descrito na Tabela 1, que se encontra na página a seguir.

Tabela 1. Quantitativo de *contigs* bacterianos e virais para as espécies de mosquitos do gênero *Sabethes*

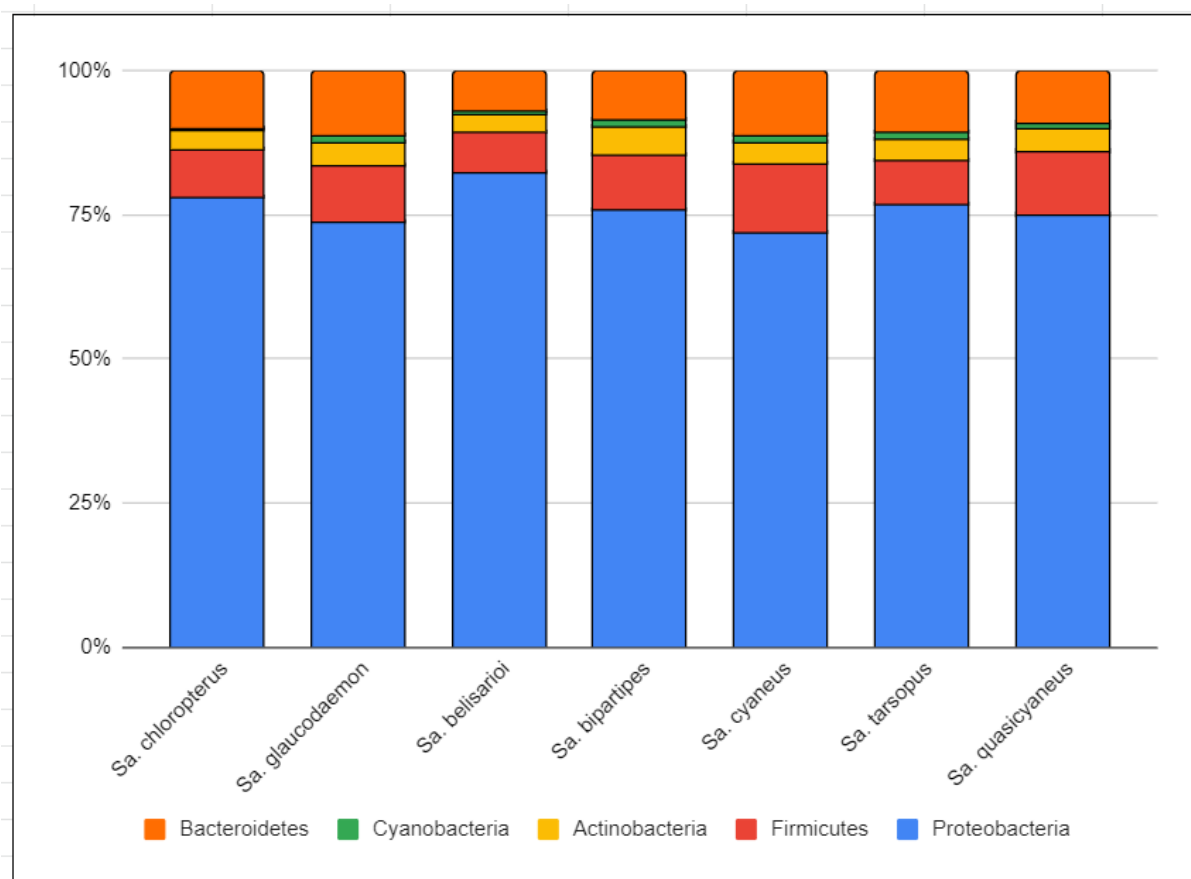
Espécie	<i>Contigs</i> bacterianos (DNA)	<i>Contigs</i> virais (DNA)	<i>Contigs</i> virais (RNA)
<i>Sa. chloropterus</i>	96.156	2.220	5.214
<i>Sa. glaucodaemon</i>	33.939	1.957	4.471
<i>Sa. belisarioi</i>	61.505	1.669	4.177
<i>Sa. bipartipes</i>	32.351	1.381	-
<i>Sa. cyaneus</i>	32.698	1.487	-
<i>Sa. tarsopus</i>	27.927	1.046	-
<i>Sa. quasicyaneus</i>	59.584	2.492	-

Também deve-se salientar que os *pools* de *Sa. chloropterus*, *Sa. glaucodaemon* e *Sa. belisarioi* foram construídos com 37 mosquitos cada, enquanto as demais espécies tiveram *pools* com tamanho reduzido de espécies; isso também pode refletir no número de *contigs* gerados bem como na variabilidade de espécies encontradas. Mesmo assim, chama atenção que *Sa. glaucodaemon* tenha gerado 33.939 *contigs* referentes a DNA bacteriano enquanto que *Sa. cyaneus* apresenta um número tão próximo como 32.698, mesmo que o primeiro tenha tido um *pool* com 37 mosquitos enquanto o segundo apenas entre 3 a 6. Isso pode levar a crer que essa semelhança no número de *contigs* tenha se dado devido ao alto número de leituras geradas para *Sa. cyaneus*, obtendo-se portanto 63.221.994 leituras mesmo na presença de um baixo número de espécimes, enquanto que para *Sa. glaucodaemon* foram geradas 35.574.808 leituras mesmo havendo um quantitativo superior de mosquitos, o que pode ter sido em decorrência dos kits de biblioteca, pois o protocolo do Nextera XT (Illumina) usado para *Sa. cyaneus* é muito mais sensível se comparado ao protocolo do SureSelect (Agilent Technologies) usado para *Sa. glaucodaemon*. Outros fatores subjacentes também podem estar envolvidos na diferença de performance, a exemplo da eficiência da montagem que favoreceu *Sa. glaucodaemon* apesar da menor quantidade de leituras, conforme é possível observar no apêndice.

4.3.1. Diversidade bacteriana (DNA)

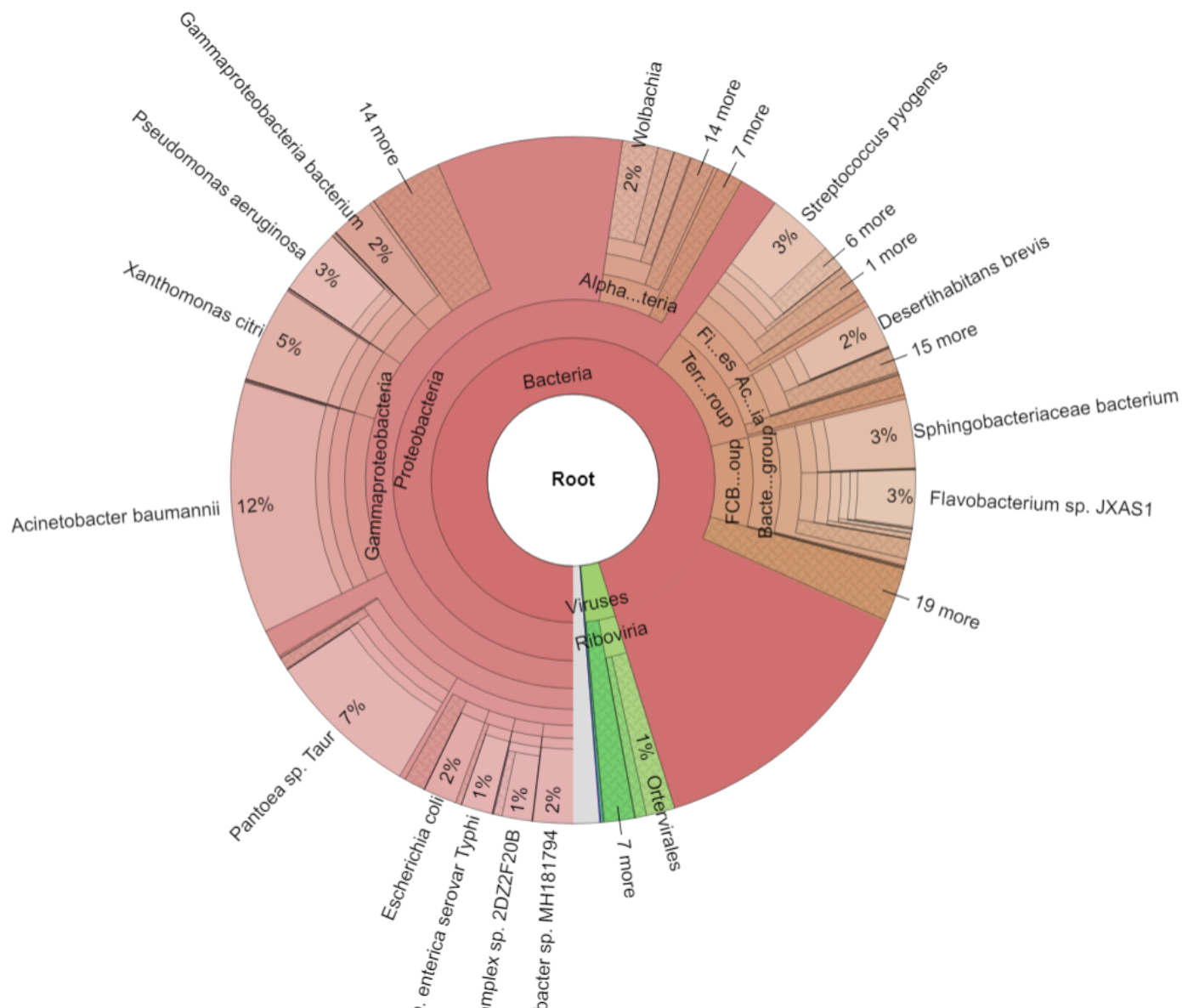
Os dados referentes aos cinco filos que apresentaram maior quantidade de *contigs* estão representados no gráfico 1.

Gráfico 1. Abundância e diversidade de *contigs* bacterianos em mosquitos do gênero *Sabethes*



Ao observar o gráfico acima, pode-se notar que *Proteobacteria* é o filo mais representado para todas as espécies de mosquito estudadas. Em seguida, há uma abundância relativamente semelhante entre *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, seguido de *Actinobacteria* e *Cyanobacteria*. Esses dados puderam ser melhor avaliados observando o Krona charts (Gráfico 2) que será apresentado na página seguinte.

Gráfico 2. Krona chart de *Sa. chloropterus* demonstrando a diversidade de *contigs* bacterianos



É importante destacar que o Krona chart de todos os mosquitos do gênero *Sabethes* avaliados são semelhantes em abundância e diversidade, o que nos permite inferir que não há filossimbiose significativa. Por isso, as inferências a seguir são similares para todos os mosquitos. A seguir, será discutido a respeito das bactérias encontradas no Krona chart dinâmico.

Os microrganismos em destaque em termos de números de *contigs* são as bactérias *Acinetobacter baumannii* e *Pantoea* sp. Taur, que podem apresentar tamanho médio correspondente a 3.9 Mb e 4.8 Mb, respectivamente (NCBI, 2022).

Tanto *Acinetobacter* quanto *Pantoea* estão entre as bactérias consideradas como as mais abundantes em mosquitos vetores (Gendrin & Christophides, 2013; Wilke & Marrelli, 2015; Wang & Jacobs-Lorena, 2019). Com relação a *Acinetobacter*, também há indícios de que esta pode colonizar glândulas salivares e/ou órgãos reprodutivos (Sharma *et al.*, 2014; Tchioffo *et al.*, 2015; Scolari *et al.*, 2019) ou até mesmo aumentar a capacidade digestiva de proteínas do sangue por parte do mosquito. Devido a capacidade de *A. baumannii* em colonizar glândulas salivares e órgãos reprodutivos, é necessário considerá-la como uma bactéria potencialmente relevante para o controle biológico de arbovírus, uma vez que tais vírus também podem colonizar as glândulas salivares, por exemplo (Sanchez-Vargas, Olson & Black, 2021).

De um modo geral é possível observar que *Proteobacteria* é a mais abundante, em que podemos destacar *Escherichia coli*, que é uma bactéria amplamente encontrada no intestino de seres humanos e que também tem sido relatada em mosquitos (Lopes & Soujik, 2018; Baumgartner *et al.*, 2020; Nakkarach *et al.*, 2021; Guegan *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2021). A presença desta espécie inclusive já foi observada como sendo um fator importante para o crescimento de larvas de *Aedes aegypti* (Valzania *et al.*, 2018). Entretanto, Correa *et al.* (2018) demonstraram que bactérias como a própria *E. coli* não são imprescindíveis para o crescimento do mosquito, embora admitam que sejam relevantes. Nesse sentido, é interessante hipotetizar que a manipulação de *E. coli* em mosquitos transgênicos poderá impactar no desenvolvimento larval e possivelmente no desenvolvimento do adulto bem como seu fitness para a transmissão de patógenos. Além disso, também existem estudos com *Anopheles gambiae* que concluíram que a infecção por *E. coli* promove uma alteração na expressão gênica de genes relacionados à resposta imune do inseto, como é o caso de *draper* e *eater* (Estévez-Lao & Hillyer, 2014; Sigle & Hillyer, 2018).

Outra bactéria encontrada nas amostras foi *Klebsiella pneumoniae*, que é reconhecida há muito tempo como um agente infeccioso que se encontra entre os patógenos nosocomiais mais comuns do mundo (Pendleton, Gorman & Gilmore, 2013) e que há tempos se sabe que pode ser encontrada vivendo em uma ampla gama de nichos ambientais e associados ao hospedeiro (Bagley, 1985), conforme observado neste trabalho. A depender do ambiente, essa bactéria pode se comportar como um simples comensal ou um potencial patógeno (Wyres &

Holt, 2018). Apesar de sua importância, não foi possível achar dados recentes e suficientemente consistentes sobre o papel da *K. pneumoniae* dentro do microbioma de mosquitos.

Por outro lado, foi possível encontrar bactérias *Wolbachia*, tidas como relevantes para o controle biológico de arbovírus como a dengue. No caso de *W. pipientis*, foi demonstrado que *Aedes aegypti* infectado com tal bactéria são menos suscetíveis a infecções por dengue se comparados a *Ae. aegypti* selvagem, refletindo diretamente no número de hospitalizações por dengue entre os participantes do estudo (Utarini *et al.*, 2021). De modo semelhante, Ekwudu *et al.* (2020) também demonstraram que em culturas de células de mosquitos foi observada uma redução de vírus de RNA, especialmente *Flavivirus* e *Alphavirus*. Esse é provavelmente o gênero mais promissor de bactérias para controle biológico de arbovírus na atualidade.

A bactéria *Wolbachia* é tipicamente transmitida verticalmente através dos ovos do hospedeiro, sendo capaz de alterar sua biologia, seja induzindo manipulações reprodutivas, como (i) a feminização de machos infectados (ou seja, transformando machos genéticos em fêmeas); (ii) partenogênese induzida (isto é, reprodução sem machos); (iii) morte de machos infectados; e (iv) incompatibilidade citoplasmática (ou seja, modificação do esperma de machos infectados resultando em defeitos embrionários e morte) (Niang *et al.*, 2018).

Na revisão de Pimentel *et al.* publicada em 2021, é possível ter uma ampla visão da relevância de *Wolbachia* no cenário dos arbovírus. O trabalho inclusive mostra alguns estudos realizados ao longo dos anos, e é possível observar a existência de estudos com *Wolbachia* e a transmissão de febre amarela, vírus esse que pode ser transmitido por mosquitos do gênero *Sabethes*, conforme relatado anteriormente. Esse é um ponto importante, pois não tem sido encontrados estudos que retratam o papel de *Wolbachia* nesses mosquitos, assim como relatado por Silva *et al.* (2021), que afirma que nenhuma espécie deste gênero tem sido escaneada para *Wolbachia*, tornando portanto este o primeiro trabalho a relatar a presença de tais bactérias no microbioma dos mosquitos em questão. Este fato também é suportado pela revisão de Pimentel *et al.* (2021) que mostra que os mosquitos mais usados para estudos com *Wolbachia* são do gênero *Aedes*.

Apesar da facilidade em encontrar estudos relatando os efeitos da presença e/ou ausência de *Wolbachia* em mosquitos vetores, ainda há um blackout no que diz respeito aos mosquitos do gênero *Sabethes*, e talvez uma das razões para isto seja a dificuldade em coletar seus espécimes e criar em laboratório, pois são insetos que vivem em condições muito específicas, com microclima de copa de árvore, tornando difícil mimetizar em laboratório.

Mesmo assim, a ausência de estudos de diversidade microbiana para tais mosquitos é um enigma, uma vez que este gênero alberga espécies com importância médica reconhecida.

Apesar de toda a reconhecida relevância de *Wolbachia*, é importante destacar que estudos de isolamento da bactéria e outros testes complementares devem ser feitos para confirmar a presença de tal gênero uma vez que a quantidade de contigs detectados não foi tão alta, podendo configurar um erro de alinhamento, por exemplo.

Um outro exemplo de bactéria importante que foi encontrada no microbioma dos *Sabethes* é a *Listeria monocytogenes*, sendo um dos principais agentes causadores de doenças graves em humanos e animais através do consumo de leite e outros produtos lácteos, bem como carne, aves e produtos prontos para o consumo (Shamloo *et al.*, 2019). Doença esta denominada por listeriose e que possui alta morbidade e mortalidade (Disson, Moura & Lecuit, 2021). Mas a importância desta bactéria vai além da espécie humana, já tendo sido realizados estudos com *L. monocytogenes* e algumas espécies de mosquitos, como é o caso de *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*, que já foram testadas para a eficácia mosquitocida de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas por cepas bacterianas, incluindo cepas de *L. monocytogenes*, em que foi observada uma alta suscetibilidade das larvas, pupas e adultos aos AgNPs (Soni & Prakash, 2015), podendo ser portanto uma estratégia promissora para o controle biológico de insetos vetores como é o caso dos *Sabethes*. Entretanto, faz-se necessário estudos adicionais para entender os mecanismos subjacentes de *L. monocytogenes* na biologia do inseto, além de compreender a aplicabilidade desta técnica para mosquitos selvagens.

Imunologicamente, a *L. monocytogenes* parece desempenhar um papel importante, uma vez que Kim *et al.* (2020) descreveram que essa bactéria pode induzir a transcrição de AaAtg8 (gene de autofagia) em mosquitos alimentados com açúcar e sangue. Essa é uma bactéria conhecida por orquestrar a maquinaria de autofagia de uma forma que, por sua vez, protege o hospedeiro do patógeno invasor (Kim *et al.*, 2020). Sabe-se também que *L. monocytogenes* pode contornar a maquinaria de autofagia e promover a fagocitose (Mitchell *et al.*, 2018). Portanto, essa parece ser uma bactéria promissora em termos de controle biológico, pois a função desempenhada parece estar diretamente ligada à modulação da expressão de genes que participam de cascatas imunológicas; assim, a manipulação do sistema protetor de mosquitos vetores poderá ser um ponto chave para a não infecção e/ou eliminação de patógenos como os vírus, refletindo diretamente na competência vetorial.

Também foi possível encontrar outras bactérias patogênicas ao homem, a exemplo de

Streptococcus pyogenes, que pode causar doenças não invasivas e invasivas, bem como sequelas não supurativas, incluindo faringite, escarlatina, impetigo, celulite, fascíte necrosante tipo II, síndrome do choque tóxico estreptocócico, febre reumática aguda e glomerulonefrite pós-estreptocócica (Kimberlin, Brady & Jackson, 2015). Além desta, outra bactéria do mesmo gênero encontrada foi *Streptococcus dysgalactiae*, conhecida por causar mastite em bovinos e infecções também em humanos (Baracco, 2019; Wentz & Krömker, 2020). Apesar de sua relevância médica, não foi possível encontrar dados atualizados e relevantes sobre seu papel no microbioma de mosquitos.

Dentre as bactérias patogênicas ao homem damos aqui um destaque especial a *Pseudomonas aeruginosa*, reconhecida como patógeno oportunista, sendo a bactéria mais comum associada a infecções hospitalares e pneumonia relacionada à ventilação mecânica (Barbier *et al.*, 2013). Raramente afeta indivíduos saudáveis, mas causa alta morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística e indivíduos imunocomprometidos (Sadikot *et al.*, 2005). Tal bactéria já foi utilizada para a biossíntese de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) (Abdo *et al.*, 2021), as quais demonstraram alta eficácia contra bactérias, fungos e também alta mortalidade para *Culex pipiens*. Portanto, assim como *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* demonstra potencial para ser usada como controle biológico de mosquitos vetores.

Interessantemente, um estudo realizado com a mosca *Bactrocera oleae*, que é o inseto praga mais importante na produção de azeitona, destacou que as larvas deste inseto podem se desenvolver em azeitonas verdes devido à presença de uma bactéria chamada *Candidatus Erwinia dacicola* (Ben-Yosef *et al.*, 2015), sugerindo a possibilidade de usá-la no controle deste inseto praga (Bigiotti *et al.*, 2019). Essas informações também deverão ser consideradas e testadas para mosquitos como *Sabethes*, pois a presença de *C. Erwinia dacicola* no microbioma poderá revelar um papel no controle genético e imunológico.

A bactéria *Enterobacter cloacae* foi encontrada no microbioma dos *Sabethes*. Bactérias deste gênero já foram observadas produzindo enzimas hemolíticas que melhoram a digestão do sangue em dípteros hematófagos (De Gaio *et al.*, 2011), o que deve ser considerado uma vez que *Sabethes* são insetos hematófagos, conforme discutido anteriormente. Inclusive, também já foi observado que esta bactéria pode suprimir parasitas *Plasmodium* e interromper a invasão do epitélio do intestino médio, exercendo 54 pressão oxidativa (Dennison *et al.*, 2016). Além disso, um um suposto inibidor de protease serina (SRPN6) tem sido destacado como um componente imunológico que restringe o desenvolvimento do *Plasmodium berghei* no mosquito *Anopheles stephensi*, sendo SRPN6

fortemente induzido após exposição a *Enterobacter cloacae* (Eappen, Smith & Jacobs-Lorena, 2013). Este é um ponto importante porque demonstra como bactérias podem regular genes provocando uma alteração no sistema imune de modo a não permitir a replicação e perpetuação de patógenos importantes.

Também foi possível identificar a presença de *Bacillus thuringiensis*, patógeno de insetos mais bem sucedido usado para o controle de insetos. Essas bactérias são patógenos de insetos que dependem de proteínas formadoras de poros inseticidas conhecidas como toxinas Cry e Cyt para matar seus hospedeiros larvais de insetos (Bravo *et al.*, 2011). Este é um microrganismo que também deve receber atenção devido seu potencial para o controle biológico de insetos.

Outras bactérias também encontradas neste estudo foram *Clostridioides difficile*, *Desertihabitans brevis*, *Sphingobacteriaceae bacterium*, *Xanthomonas citri*, *Salmonella enterica subsp. enterica*, *Citrobacter sp.*, *Vibrio anguillarum*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsiaceae bacterium*, *Listeria welshimeri*, *Chloroflexi bacterium*, *Nostocales*, *Macrococcus caseolyticus*, *Gammaproteobacteria bacterium*, *Enterococcus faecium*, *Synechococcus sp.*, *Flavobacterium sp. JXAS1*, *Chryseobacterium sp. RR2-3-20*, *Hymenobacter sp.*

É interessante ressaltar que estudos de transcriptoma envolvendo bactérias e mosquitos vetores podem ser de grande valia uma vez que sabe-se que microRNAs do hospedeiro podem regular a expressão e o crescimento de genes bacterianos, e sua perda resulta em microbiota desequilibrada (Liu *et al.*, 2016). De modo semelhante, o microbioma também é capaz de regular a transcrição de genes do hospedeiro, embora o estudo de Hyde *et al.* (2020) tenha demonstrado que essa influência do microbioma é muito menor do que se pensava, afirmando que embora o microbioma pareça afetar algumas vias, como função imunológica e metabolismo, os dados sugerem que o microbioma está desempenhando principalmente um papel nutricional no desenvolvimento, com apenas efeitos menores no adulto. Essa influência ainda não tem sido descrita para o microbioma de mosquitos *Sabethes*, tampouco o papel específico de cada bactéria que compõe este sistema.

4.3.2. Diversidade viral (DNA e RNA)

A abundância e diversidade de *contigs* dos principais grupos virais representados encontra-se nos gráficos 3 e 4.

Gráfico 3. Abundância e diversidade de *contigs* virais (DNA) em mosquitos do gênero *Sabethes*

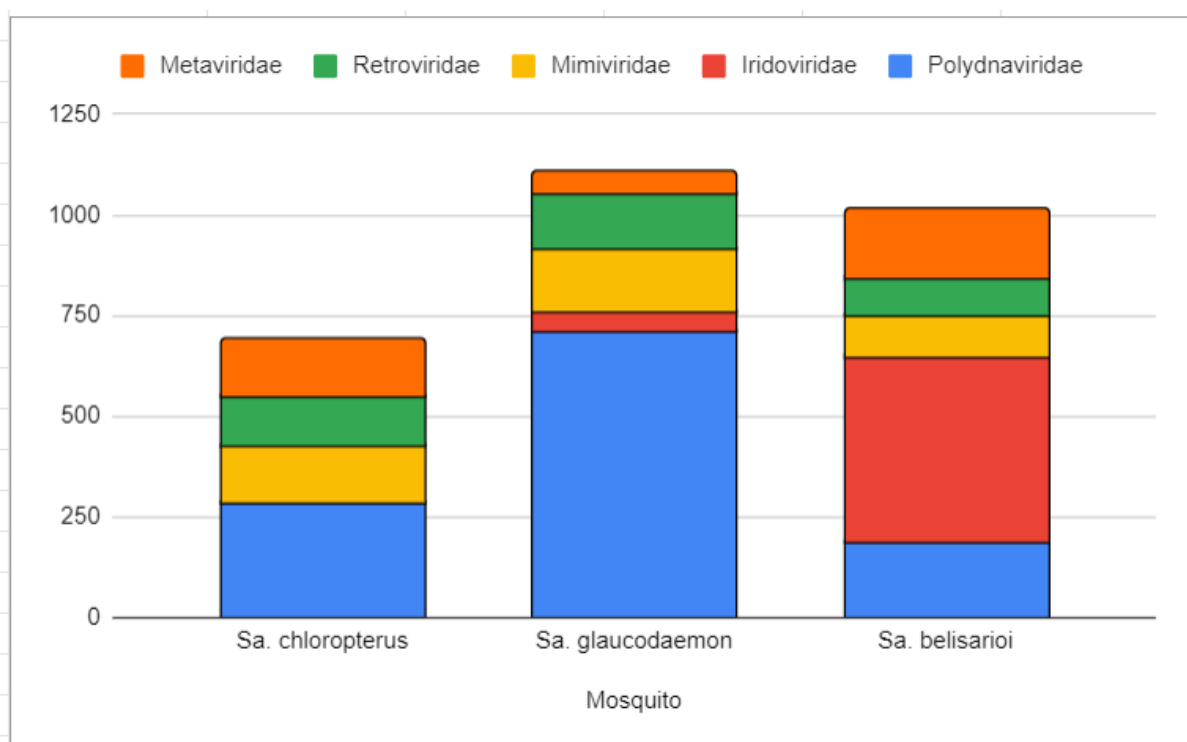


Gráfico 4. Abundância e diversidade de *contigs* virais (RNA) em mosquitos do gênero *Sabethes*

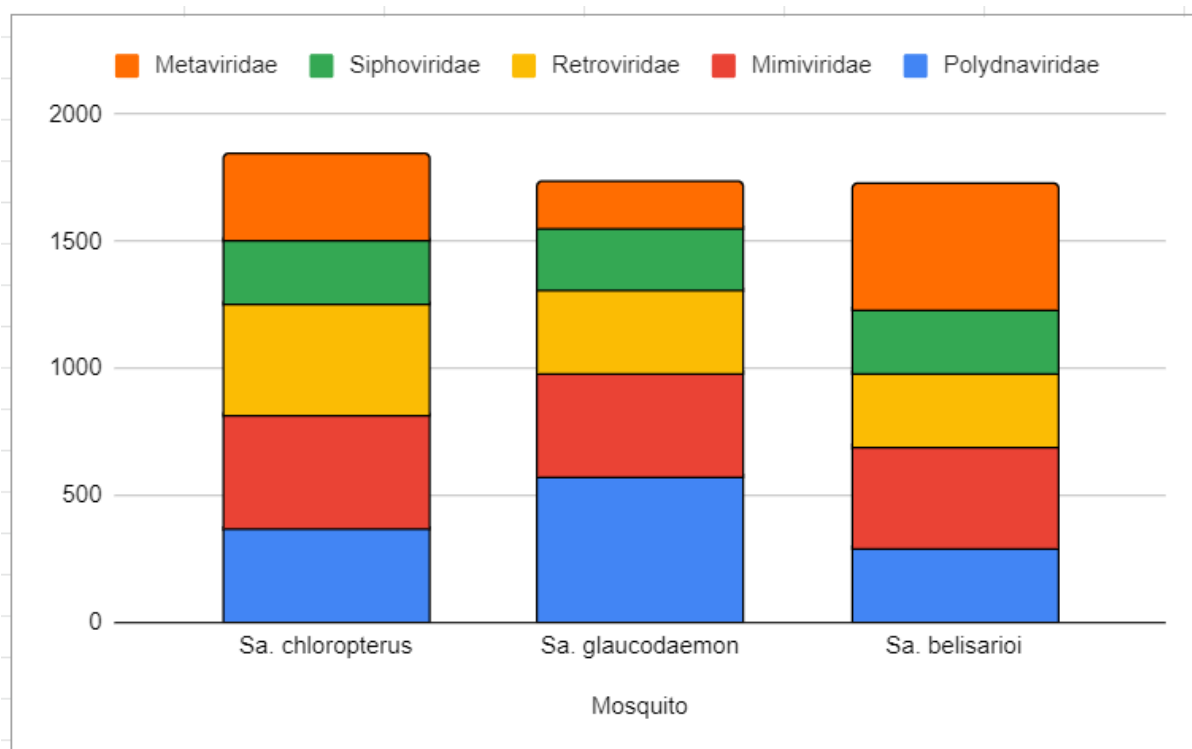
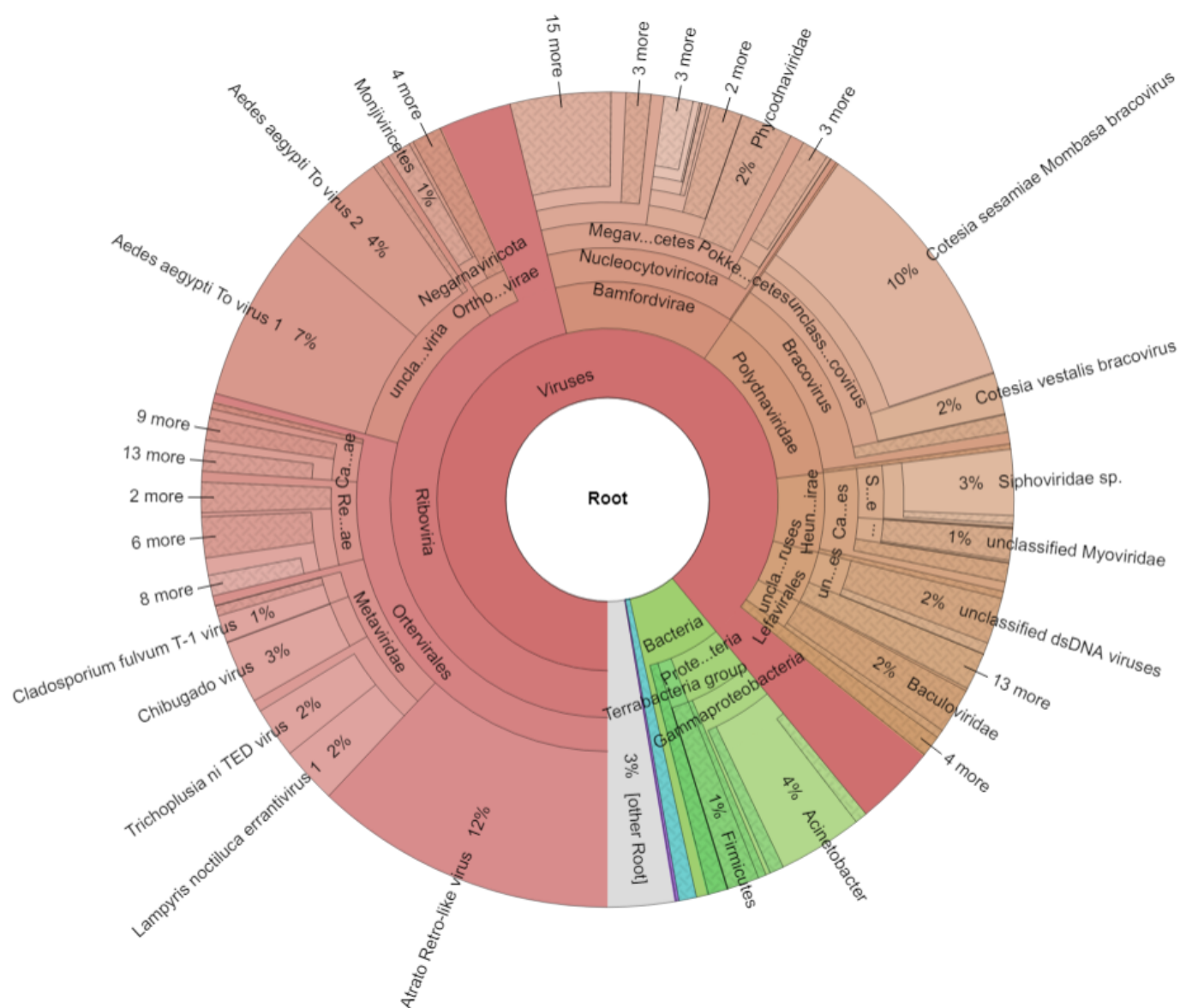


Gráfico 6. Krona chart de *Sa. chloropterus* demonstrando a diversidade de *contigs* virais (RNA)



A similaridade de *contigs* entre as amostras de DNA e RNA pode ter ocorrido porque o kit de extração de RNA utilizado não separa RNA viral de DNA celular (Qiagen, 2020), o que parece incluir o DNA dos vírus, já que são parasitas intracelulares obrigatórios. E como o kit de preparo de biblioteca utilizado é indicado tanto para DNA quanto RNA, o

sequenciamento prosseguiu para ambos os ácidos. Isto indica que para o uso destes kits para o mesmo propósito deste trabalho, DNase deverá ser utilizada a fim de permitir o sequenciamento do RNA isolado.

Assim como para as amostras referentes a DNA, em RNA destacamos os mesmos vírus, sendo eles: *Aedes aegypti To virus* e *Atrato Retro-like virus*, ambos fazem parte de *Riboviria*, que é um táxon que inclui vírus de RNA que utiliza RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) para a replicação (Gorbalenya *et al.*, 2019).

Não foi possível encontrar informações a respeito de *Aedes aegypti To virus*, inclusive a sequência deste vírus que está publicada no NCBI e deu match no alinhamento não está publicada em artigo científico. Esta sequência foi submetida ao banco de dados no final de 2020 por Neto *et al.* (NCBI, 2022). A julgar pelo nome da espécie, este é provavelmente um ISV detectado pela primeira vez em *Aedes aegypti*, sendo necessária uma avaliação mais detalhada a respeito da importância deste vírus no microbioma de mosquitos, uma vez que entende-se que vírus de inseto também desempenham papéis importantes já que parecem dificultar a transmissão de arbovírus (Halbach, Junglen & Van Rij, 2017).

Atrato Retro-like virus foi o segundo vírus com maior número de *contigs*, ficando atrás apenas de *Aedes aegypti To virus*, apresentando um quantitativo mais elevado especialmente na espécie *Sa. chloropterus*, apesar de não necessariamente significar que seja o mais abundante nas amostras, podendo este ter mais *contigs* devido ao seu tamanho ou simplesmente pela performance do sequenciamento, conforme discutido anteriormente. Apesar dessa representatividade nas amostras, não há muitos estudos disponíveis para consulta, a não ser pelo de Ren *et al.* (2021), que detectou *Atrato virus* em viromas de *Culex* e *Anopheles* em Wuhan (China), embora não haja uma discussão a respeito da relevância do mesmo. Além deste, também há alguns outros poucos trabalhos que identificam este vírus em amostras de mosquitos de outros gêneros como *Anopheles* e *Haemagogus*, por exemplo (Ali *et al.*, 2021; Jansen *et al.*, 2021; Neves *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021). Assim como *Aedes aegypti To virus*, *Atrato virus* também precisa ser investigado a respeito de seu papel no microbioma do vetor.

Foi possível detectar *contigs* referentes a *Mimiviridae*, incluindo *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, que é um vírus gigante (semelhante ao tamanho de pequenas bactérias) capaz de se ligar a diferentes organismos, como bactérias Gram-positivas, fungos e artrópodes, mas não a bactérias Gram-negativas, levando a prever que artrópodes, principalmente insetos, podem atuar como dispersores de mimivírus (Rodrigues *et al.*, 2015).

Essa é uma informação importante porque *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* já foi usada em estudos experimentais para verificar a possibilidade do desenvolvimento de pneumonia em camundongos, os quais desenvolveram as características histopatológicas de pneumonia, sugerindo a possibilidade de um processo semelhante em outros mamíferos, incluindo o ser humano (Khan *et al.*, 2007), o que deve ser considerado como um alerta para a possibilidade deste vírus ser efetivamente transmitido por mosquitos e gerar infecções importantes em humanos e/ou outros animais. Apesar da relevância das informações é importante ressaltar que o número máximo de *contigs* encontrados para essa espécie foi 3 (em *Sa. belisarioi*), sendo difícil afirmar se realmente este vírus estava presente na amostra, ou foi apenas um viés de montagem e/ou alinhamento.

Outros vírus também foram encontrados nas amostras, a exemplo de *Lampyris noctiluca errantivirus 1*, *Trichoplusia ni TED virus*, *Chibugado virus*, *Cladosporium fulvum T-1 virus*, *Aedes aegypti To virus*, *Monjiviricetes*, *Pimascovirales*, *Poxviridae*, *Cotesia sesamiae Mombasa bracovirus*, *Cotesia vestalis bracovirus*, *Siphoviridae sp.*, *Myoviridae sp.*, *Yasminevirus sp.*, *Lefavirales*, além de muitos outros. Porém apesar da vasta diversidade, poucas são as informações disponíveis, tornando complexa a avaliação da importância desses vírus para os mosquitos vetores, especialmente no caso de *Sabethes*, que também é um gênero relativamente pouco estudado.

Por causa desta ausência de informações, esforços devem ser realizados a fim de entender primeiramente a diversidade do viroma associado ao mosquito vetor e por conseguinte o papel dos mesmos em relação a infecções por arbovírus. Inclusive, o entendimento desta dinâmica é importante porque existem estudos que comprovaram que arbovírus podem ter sido ISVs no passado, os quais através da evolução adquiriram a capacidade de expandir sua gama de hospedeiros para incluir também vertebrados, o que sugere a possibilidade de adaptação de ISVs resultando em novos arbovírus (Öhlund, Lundén & Blomström, 2019).

Aqui, é necessário inserir aqui o termo “vírus específico de mosquito” (MSV), esses vírus são um subtipo de ISVs, mas que se restringem aos mosquitos. Curiosamente, muitos desses vírus agrupam-se taxonomicamente muito próximos aos vírus transmitidos por artrópodes, dos quais muitos são de preocupação para a saúde pública (Atoni *et al.*, 2019), reforçando ainda mais a ideia de que MSVs podem vir a se tornar arbovírus de interesse médico.

Uma vez que é clara a possibilidade de MSVs tornarem-se arbovírus e que também

assume-se a existência de uma relação entre MSVs e arbovírus, torna-se interessante a condução de estudos de transcriptoma, pois tem sido observado o papel de RNAs de interferência durante esse processo, inclusive as interações arbovírus-miRNA-via já foram relatadas, seja pela expressão de miRNAs virais ou alterações nos miRNAs expressos por mosquitos após a infecção (Leggewie & Schnettler, 2018). Por outro lado, os dados sobre a interação de MSVs e a via de miRNA em mosquitos são limitados a apenas um estudo até 2019, sugerindo que não há efeitos da infecção por MSV na expressão de miRNA (Lee *et al.*, 2017), o que pode vir a ser refutado em estudos posteriores.

Além do controle de vetores e transmissão, os MSVs também podem ser usados como ferramentas de expressão, pois alguns deles se replicam em altos títulos e são considerados seguros devido à sua incapacidade de infectar e replicar em células de vertebrados. Isso e a semelhança de alguns MSVs com arbovírus patogênicos os identificaram como bons candidatos a vacinas, segundo é exemplificado por Agboli *et al.* (2019).

É importante ressaltar que em *Sabethes chloropterus*, *Sabethes glaucodaemon* e *Sabethes belisarioi* foi observado uma quantidade alta de *contigs* para *Aeribacillus phage* AP45. Esse vírus chegou a ser representado por mais de 84 mil *contigs* em uma das espécies. Embora não hajam estudos discutindo o papel deste vírus em mosquitos vetores, faz-se necessário entender seu papel no microbioma, especialmente pela sua representatividade, que posteriormente deverá ser traduzida em abundância, uma vez que já foi discutido anteriormente que o alto número de *contigs* *não* necessariamente diz respeito à abundância, mas sim à cobertura do genoma.

Não foi possível encontrar nenhum vestígio de febre amarela nas amostras, o que já era esperado devido ao baixo número de espécimes utilizados no trabalho, reduzindo assim a probabilidade de coletar insetos naturalmente infectados.

5. CONCLUSÃO

Conhecer os microrganismos associados a mosquitos vetores é uma etapa importante no desenvolvimento de estratégias de controle desses insetos e/ou de seus patógenos, uma vez que é consolidado que a manipulação de bactérias pode induzir a mortalidade de larvas de mosquito, além de alterar o sistema imunológico e até mesmo o *fitness* do inseto, tornando-o incapaz de transmitir arbovírus importantes. Portanto, estudos como esse que visam conhecer a composição microbiana se fazem importantes como uma forma de apontar bactérias e vírus que poderão ser usados no controle biológico, uma vez que não só as bactérias mas também vírus específicos de inseto possuem essa capacidade de alterar significativamente a fisiologia do mosquito vetor. Além desses aspectos, estudos de diversidade microbiana podem permitir o conhecimento da presença de vírus importantes, como a febre amarela, e abre possibilidades para a descoberta de novos vírus e bactérias, uma vez que existem *contigs* que não foram identificados através do alinhamento, podendo existir microrganismos ainda não disponibilizados nos bancos de dados genéticos. Também é importante ressaltar que a ausência de filossimbiose significativa pode ser um fator importante no desenvolvimento de estratégias de controle semelhantes para todas as espécies de mosquitos do gênero *Sabethes* presentes nesse estudo. Por fim, o reconhecimento da diversidade e posteriormente funcionalidade dos microrganismos descritos devem ser considerados para a busca por novos alvos vacinais.

REFERÊNCIAS

- Akhouayri, I.; Habtewold, T.; Christophides, G. Melanotic pathology and vertical transmission of the gut commensal *Elizabethkingia meningoseptica* in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. **PLOS ONE**, 8:e77619, 2013.
- Alfano, N.; Tagliapietra, V.; Rosso, F.; Manica, M.; Arnoldi, D.; Pindo, M.; Rizzoli, A. Changes in microbiota across developmental stages of *Aedes koreicus*, an invasive mosquito vector in Europe: indications for microbiota-based control strategies. **Frontiers in Microbiology**, 10, 2019.
- Althouse, B. K.; Vasilakis, N.; Sall, A. A.; Diallo, M.; Weaver, S. C.; Hanley, K. A. Potential for Zika virus to establish a sylvatic transmission cycle in the Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 10(12): e0005055.doi:10.1371/journal.pntd.0005055, 2016.
- Andrewes, C. Factors in virus evolution. **Advances in Virus Research**, 4:1–24, 1957.
- Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data, 2010.
- Baia, L. N. N. F. **Estudo epidemiológico de patógenos emergentes e reemergentes na população humana no município de Santa Bárbara do Pará, Brasil**. Dissertação (Dissertação em Virologia). Instituto Evandro Chagas, p. 71, 2017.
- Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.; Lesin, V.; Nikolenko, S.; Pham, S.; Prjibelski, A.; Pyshkin, A.; Sirotkin, A.; Vyahhi, N.; Tesler, G.; Alekseyev, M.; Pevzner, P. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, 19(5): 455-477, 2012.
- Bennik, S.; Kiesow, M. K.; Pradel, G. The development of malaria parasites in the mosquito midgut. **Cellular microbiology**, 18(7): 905-918, 2016.
- Bolger, A. M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, 1;30(15): 2114-2120, 2014.
- Bolling, B. G.; Vasilakis, N.; Guzman, H.; Widen, S. G.; Wood, T. G.; Popov, V. L.; Thangamani, S.; Tesh, R. B. Insect-specific viruses detected in laboratory mosquito colonies and their potential implications for experiments evaluating arbovirus vector competence. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 92(2): 422-428, 2015a.
- Bolling, B. G.; Weaver, S. C.; Tesh, R. B.; Vasilakis, N. Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. **Viruses**, 7: 4911-4928, 2015b.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia de vigilância de epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da febre amarela**. 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014, 100p.
- Brinkmann, A.; Nitsche, A.; Kohl, C. Viral Metagenomics on Blood-Feeding Arthropods as a

Tool for Human Disease Surveillance. **International Journal of Molecular Sciences**, 17:1743, 2016.

Buchfink, B.; Xie, C.; Huson, D.H. Fast and sensitive protein alignment using diamond. **Nature methods**, 12(1):59–60, jan. 2015.

Bullock, T. H.; Orkand, R.; Grinnell, A. Introduction to nervous systems. San Francisco: W. H. Freeman & Co. **Capítulo 7. Integration at the intermediate levels**. pp 242-290. 1977.

Calvitti, M.; Moretti, R.; Skidmore, A.R.; Dobson, S.L. Wolbachia strain wPip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a Wolbachia-based suppression strategy against the disease vector *Aedes albopictus*. **Parasites & Vectors**, 5:254, 2012.

Caporaso et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, 7(5): 335–336, 2010.

Carrington, L. B.; Seifert, S. N.; Armijos, M. V.; Lambrechts, L.; Scott, T. W. Reduction of *Aedes aegypti* vector competence for dengue virus under large temperature fluctuations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 88: 689-697, 2013.

Causey, O. R.; Shope, R. E.; Theiler, M. Isolation of St. Louis Encephalitis virus from arthropods in Pará, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, 13(3): 449, 1964.

Chadee, D. D. Seasonal abundance and diel landing periodicity of *Sabethes chloropterus* (Diptera: Culicidae) in Trinidad, West Indies. **Journal of Medical Entomology**, 27, 1041–1044, 1990.

Cheng, G.; Liu, Y.; Wang, P.; Xiao, X. Mosquito defense strategies against viral infection. **Trends in Parasitology**, 32(3): 177-186, 2016.

Consoli, R. A. G. B. & de Oliveira, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p. ISBN 85-85676-03-5. Disponível em SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

Damiani, C.; Ricci, I.; Crotti, E.; Rossi, P.; Rizzi, A.; Scuppa, P.; Capone, A. Ulissi, U.; Epis, S.; Genchi, M.; Sagnon, N.; Faye, I.; Kang, A.; Chouaia, B.; Whitehorn, C.; Moussa, G.; Mandrioli, M. Esposito, F.; Sacchi, L.; Bandi, C.; Daffonchio, D.; Favia, G. Mosquito-bacterial symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. **Microbial Ecology**, 60:644-654, 2010.

Dale, C. & Moran, N.A. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. **Cell**, 126:453 – 465, 2006.

Dégallier, N.; Rosa, A.T.; Vasconcelos, P.F.C.; Rosa, E.S.T.; Rodrigues, S.G.; Sá Filho, G.C.; Rosa, J.F.S.T. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic Yellow fever in Brazil. **Ciência e Cultura**, 44(2-3): 136-142, 1992.

De Kruijf, H. A. M.; Woodall, J. P.; Tang, A.T. The influence of accumulated rainfall and its pattern on mosquito (Diptera) populations in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, 63: 327-333, 1973.

- Dong, Y.; Manfredini, F.; Dimopoulos, G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLOS Pathogens**, 5:e1000423, 2009.
- Dong, Y.; Morton, J.; Ramirez, J.; Souza-Neto, J.; Dimopoulos, G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 42: 126-132, 2012.
- Dong, Y.; Taylor, H. E.; Dimopoulos, G. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. **PLOS Biology**, 4:e229, 2006.
- Douglas, A.E. Lessons from studying insect symbioses. **Cell Host Microbe**, 10:359 – 367, 2011.
- Ergunay, K.; Brinkmann, A.; Gunay, F.; Kar, S.; Obter, K.; Orsten, S.; Sarikaya, Y.; Alten, B.; Nitsche, A.; Linton, Y. M. A metagenomic survey reveals rhabdo and negevivirus sequences in mosquito pools from Turkey. **International Journal of Infectious Diseases**, 53: 122, 2016.
- Fauver, J.R.; Grubaugh, N.D.; Krajacich, B.J.; Weger-Lucarelli, J.; Lakin, S.M.; Fakoli, L.S.; Bolay, F.K.; Diclaro, J.W.; Dabiré, K.R.; Foy, B.D.; et al. West African *Anopheles gambiae* mosquitoes harbor a taxonomically diverse virome including new insect specific flaviviruses, mononegaviruses, and totiviruses. **Virology**, 498, 288 – 299, 2016.
- Favia, G.; Ricci, I.; Damiani, C.; Raddadi, N.; Crotti, E.; Marzorati, M.; Rizzi, A.; Urso, R.; Brusetti, L.; Borin, S.; Mora, D.; Scuppa, P.; Pasqualini, L.; Clementi, E.; Genchi, M.; Corona, S.; Negri, I.; Grandi, G.; Alma, A.; Kramer, L.; Esposito, F.; Bandi, C.; Sacchi, L.; Daffonchio, D. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 104: 9047-9051, 2007.
- Figueiredo, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, 2(13):1643-9, 2000.
- Forattini, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Departamento de Parasitologia, v.1, 1962.
- Forattini, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, Departamento de Parasitologia, v.2., 1965.
- Forattini, O. P. **Culicidologia Médica**. Identificação, Biologia, Epidemiologia. Vol. 2. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, 2002.
- Frey, K.G.; Biser, T.; Hamilton, T.; Santos, C.J.; Pimentel, G.; Mokashi, V.P.; Bishop-Lilly, K.A. Bioinformatic Characterization of mosquito viromes within the eastern United States and Puerto Rico: Discovery of novel viruses. **Evolutionary Bioinformatics**, 12, 1 – 12, 2016.
- Galindo, P., Carpenter, S. J. & Trapido, H. Ecological observations on forest mosquitoes of an endemic yellow fever area of Panama. **American Journal of Tropical Medicine**, 31, 98–137, 1951.

- Garg, A. & Gupta, D. VirulentPred: a SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. **BMC Bioinformatics**, 9: 62, 2008.
- Gimonneau, G.; Tchioffo, M.; Abate, L.; Boissiere, A.; Awono-Ambene, P.; Nsango, S.; Christen, R.; Morlais, I. Composition of *Anopheles coluzzi* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. **Infection, Genetics and Evolution**, 28: 715-724, 2014.
- Goenaga, S.; Kenney, J. L.; Duggal, N. K.; Delorey, M.; Ebel, G. D.; Zhang, B.; Levis, S. C.; Enria, D. A.; Brault, A. C. Potential for co-infection of a mosquito-specific flavivirus, Nhumirim virus, to block West Nile virus transmission in mosquitoes. **Viruses**, 7: 5801-5812, 2015.
- Guay, J-F; Boudreault, S.; Michaud, D.; Cloutier, C. Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: Role of *Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. **Journal of Insect Physiology**, 55:919 – 926, 2009.
- Guégan, M.; Zouache, K.; Démichell, C.; Minard, G.; Van, V. T.; Potier, P.; Mavingui, P.; Moro, C. V. The mosquito holobiont: fresh inside into mosquito-microbiota interactions. **Microbiome**, 2018.
- Gusmao, D.; Santos, A.; Marini, D.; Bacci, M.; Berbert-Molina, M.; Lemos, F. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. **Acta Tropica**, 115: 275-281, 2010.
- Guzman, H.; Contretas-Gutierrez, M. A.; Travassos da Rosa, A. P. A.; Nunes, M. R. T.; Cardoso, J. F.; Popov, V. L.; Young, K. I.; Savit, C.; Wood, T. G.; Widen S. G.; Watts, D. M.; Hanley, K. A.; Perera, D.; Fish, D.; Vasilakis, N.; Tesh, R. B. Characterization of three new insect-specific Flaviviruses: their relationship to the mosquito-borne Flavivirus pathogens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 98(2): 410-419, 2018.
- Halbach, R.; Junglen, S.; Van Rij, R. P. Mosquito-specific and mosquito-borne viruses: evolution, infection, and host defense. **Current Opinion in Insect Science**, 22: 1-12, 2017.
- Hancock, R. G., Foster, W.A.; Yee, W.L. Courtship behavior of the mosquito *Sabethes cyaneus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Behavior**, 3, 401–416, 1990.
- Hervé, J.P.; Dégallier, N.; Travassos da Rosa, A.P.A.; Pinheiro, F.P.; Sá Filho, G.C. Arboviroses - Aspectos ecológicos. In: **INSTITUTO EVANDRO CHAGAS - 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém: Fundação Serviço de Saúde Pública, v. 1, 529 pg., 1986.
- Hobson-Peters, J.; Yam, A. W.; Lu, J. W.; Setoh, Y. X.; May, F. J.; Kurucz, N.; Walsh, S.; Prow, N. A.; Davis, S. S.; Weir, R. et al. A new insect-specific flavivirus from northern Australia suppresses replication of West Nile virus and Murray Valley encephalitis virus in co-infected mosquito cells. **Plos One**, 2013.
- Huson, D. H. Auch, A. F.; Qi, J.; Schuster, S. C. MEGAN: analysis of metagenomic data. **Genome Research**, 17: 377-386, 2007.

Hyde, J.; Gorham, C.; Brackney, D. E.; Steven, B. Antibiotic resistant bacteria and comensal fungi are common and conserved in the mosquito microbiome. **PLOS One**, 14(8): e0218907, 2019.

Iturbe-Ormaetxe, I.; Walker, T.; O'Neill, S.L. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. **EMBO Reports**, 12:508 – 518, 2011.

Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Mentjies, P.; Drummond, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28(12): 1647-1649, 2012.

Kenney, J. L.; Solberg, O. D. Langevin, S. A.; Brault, A. C. Characterization of novel insect-specific flavivirus from Brazil: potential for inhibition of infection of arthropod cells with medically important arbovirus. **Journal of General Virology**, 2014.

Land, M. F., Gibson, G., Horwood, J. & Zeil, J. Fundamental differences in the optical structure of the eyes of nocturnal and diurnal mosquitoes. **Journal of Comparative Physiology A**, 185: 91–103, 1999.

Lane, J.; Cerqueira, N. L. **Os Sabetíneos da América (Diptera, Culicidae)**. São Paulo: Imprensa oficial do estado, 1942.

Li, X.; Xie, Y.; Liu, M.; Tai, C.; Sun, J.; Deng, Z.; Ou, H.Y. oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements. **Nucleic Acids Research**, 2018.

Lindh, J.; Borg-Karlson, A.; Faye, I. Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. **Acta Tropica**, 107: 242-250

Lopes, N.; Nozawa, C. Linhares, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovirus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, 5(3): 55-64, 2014.

Lupertlop, N.; Surasombatpattana, P.; Patramool, S.; Dumas, E.; Wasinpiyamongkol, L. Saune, L.; Hamel, R.; Bernard, E. Sereno, D. Thomas, F.; Piquemal, D.; Yssel, H.; Briant, L.; Misse, D. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with dengue virus. **PLOS Pathogens**, 7: e1001252, 2011.

Mancini, M. V.; Damiani, C.; Accoti, A.; Tallarita, M.; Nunzi, E.; Cappelli, A.; Bozic, J.; Catanzani, R.; Rossi, P.; Valzano, M.; Serrao, A.; Ricci, I.; Spaccapelo, R.; Favia, G. Estimating bacterial diversity in different organs of nine species of mosquito by next generation sequencing. **BMC Microbiology**, 18: 126, 2018.

Maramorosch, K. Multiplication of plant viruses in insect vectors. **Advances in Virus Research**, 3:221–249, 1955.

Marcondes, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Editora Atheneu, 2ª ed., 2011.

Mattingly, P. Ecological aspects of the Evolution of mosquito-borne virus diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 54:97–112, 1960.

Modha, S.; Hughes, J.; Bianco, G.; Ferguson, H.M.; Helm, B.; Tong, L.; Wilkie, G.S.; Kohl, A.; Schnettler, E. Metaviromics Reveals Unknown Viral Diversity in the Biting Midge *Culicoides impunctatus*. **Viruses**, 11, 865. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11090865>, 2019.

Muturi, E. J.; Bara, J. J.; Rooney, A. P.; Hansen, A. K. Midgut fungal and bacterial microbiota of *Aedes triseriatus* and *Aedes japonicus* shift in response to La Crosse virus infection. **Molecular Ecology**, 25(16): 4075-4090, 2016a.

Muturi, E.J.; Kim, C.H.; Bara, J.; Bach, E.M.; Siddappaji, M.H. *Culex pipiens* and *Culex restuans* mosquitoes harbor distinct microbiota dominated by few bacterial taxa. **Parasites & Vectors**, 9(1):18, 2016.

Novakova, E.; Woodhams, D. C.; Rodríguez-Ruano, S. M.; Brucker, R. M.; Leff, J. W.; Maharaj, A.; Amir, A.; Knight, R.; Scott, J. Mosquito Microbiome Dynamics, a Background for Prevalence and Seasonality of West Nile Virus. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

Pang, X.; Xiao, X.; Liu, Y.; Zhang, R.; Liu, J.; Liu, Q.; Wang, P.; Cheng, G. Mosquito C-type lectins maintain gut microbiome homeostasis. **Nature microbiology**, 1: 16023, 2016.

Pinto, C. S.; Confalonieri, U. E. C.; Mascarenhas, B. M. Ecology of *Haemagogus* sp. and *Sabethes* sp. (Diptera: Culicidae) in relation to the microclimates of the Caxiuanã National Forest, Pará, Brazil. Rio de Janeiro: **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104(4): 592-598, July, 2009.

Powel, J. R.; Tabachnick, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 108(1): 11-17, 2013.

R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

Ramirez, J.; Short, S.; Bahia, A.; Saraiva, R.; Dong, Y.; Kang, S.; Tripathi, A.; Mlambo, G.; Dimopoulos, G. *Chromobacterium Csp_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. **PLOS Pathogen**, 10: e1004398, 2014.

Ramirez, J.; Souza-Neto, J.; Cosme, R.T.; Rovira, J.; Ortiz, A.; Pascale, J.M.; Dimopoulos, G. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 6:e1561, 2012.

Reshef, L.; Koren, O.; Loya, Y.; Zilber-Rosenberg, I.; Rosenberg, E. The coral probiotic hypothesis. **Environmental Microbiology**, 8:2068 – 2073, 2006.

Ricci, I.; Damiani, C.; Capone, A.; Defreese, C.; Rossi, P.; Favia, G. Mosquito/ microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, 15:278 – 284, 2012.

Ricci, I.; Damiani, C.; Scuppa, P.; Mosca, M.; Crotti, E.; Rossi, P.; Rizzi, A.; Capone, A.; Gonella, E.; Ballarini, P.; Chouaia, B.; Sagnon, N.; Esposito, F.; Alma, A.; Mandrioli, M.;

Sacchi, L.; Bandi, C.; Daffonchio, D.; Favia, G. Different mosquito species host *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*): perspectives on vector-borne diseases symbiotic control. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 99: 43-50, 2010.

Rust, R. S. Human arboviral encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, 19(3):130-51, 2012.

Sanchez-Vargas, I.; Olson, K. E.; Black, W. C. The genetic basis for salivary gland barriers to arboviral transmission. **Insects**, 12(1): 73, 2021.

Saraiva, R. G.; Kang, S.; Simões, M. L.; Angleró-Rodríguez, Y. I.; Dimopoulos, G. Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, 64: 53-64, 2016.

Schultz, M. J.; Frydman, H. M.; Connor, J. H. Dual insect specific virus infection limits arbovirus replication in *Aedes* mosquito cells. **Virology**, 518: 406-413, 2018.

Serra, O. P.; Cardoso, B. F.; Ribeiro, A. L. M.; dos Santos, F. A. L.; Shlessarenko, R. D. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. Rio de Janeiro: **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, 111 (1): 20-29, 2016.

Severson, D. W. & Behura, S. K. Genome investigations of vector competence in *Aedes aegypti* to inform novel arbovirus disease control approaches. **Insects**, 2016.

Sharma, P.; Sharma, S.; Maurya, R.; De, T.; Thomas, T.; Lata, S.; Singh, N.; Pandey, K.; Valecha, N.; Dixit, R. Salivary glands harbor more diverse microbial communities than gut in *Anopheles culicifacies*. **Parasit Vectors**, 7: 235, 2014.

Shi, C.; Liu, Y.; Hu, X.; Xiong, J.; Zhang, B.; Yuan, Z. A metagenomic survey of viral abundance and diversity in mosquitoes from Hubei Province. **PLOS One**, 10: e0129845, 2015.

South, S. H. & Arnqvist, G. Morphological variation of an ornament expressed in both sexes of the mosquito *Sabethes cyaneus*. **Evolutionary Ecology Research**, 11: 1-21, 2009.

Stein, Marina, Bangher, Debora N., Neves, Maycon Sebastião Alberto Santos & Alvarez, Carla N., 2020, Redescription of the female, male, larva and pupa of *Sabethes* (*Sabethoides*) *glaucodaemon* (Dyar & Shannon) (Diptera: Culicidae) and description of the female genitalia, pp. 589-600 in **Zootaxa** 4789 (2) on page 592, DOI: 10.11646/zootaxa.4789.2.12

Szklarczyk, D.; Franceschini, A.; Wyder, S.; Forslund, K.; Heller, D.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Roth, A.; Santos, A.; Tsafou, K. P.; Kuhn, M.; Bork, P.; Jensen, L. J.; Von Mering, C. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, 2015.

Tchioffo, M. T.; Abate, L.; Boissière, A.; Nsango, S. E.; Gimonneau, G.; Berry, A.; Oswald, E.; Dubois, D.; Morlais, I. An epidemiological successful *Escherichia coli* sequence types modulates *Plasmodium falciparum* infection in the mosquito midgut. **Infection, Genetics and Evolution**, 43: 22-30, 2016.

Thongsripong, P.; Chandler, J. A.; Green, A. B.; Kittayapong, P.; Wilcox, B. A.; Kapan, D. D.; Bennett, S. N. Mosquito vector-associated microbiota: metabarcoding bacteria and eukaryotic symbionts across habitat types in Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. **Ecology and Evolution**, 8(2): 1352-1368, 2017.

Tithi, S. S.; Aylward, F. O.; Jensen, R.V. & Liqing Zhang, L. FastViromeExplorer: a pipeline for virus and phage identification and abundance profiling in metagenomics data. **Peer J**, 6:e4227; DOI 10.7717/peerj.4227, 2018.

Van Tol, S.; Dimopoulos, G. Chapter nine: influences of the mosquito microbiota on vector competence. **Advances in Insect Physiology**, 51: 243-291, 2016.

Vasconcelos, P. F. C.; Quaresma, J. A. S.; Azevedo, R. S. S.; Martins, L. C. Febre Amarela. In: Leão, R.N.Q (coord.). **Medicina tropical e infectologia na Amazônia**. Belém: Samauma, p. 549-568, 2013.

Vasconcelos, P. F. C.; Rodrigues, S. G.; Dégallier, N.; Moraes, M. A. P.; Travassos da Rosa, J. F. S.; Travassos da Rosa, E. S.; Mondet, B.; Barros, V. L. R. S.; Travassos da Rosa, A. P. A. An Epidemic of Sylvatic Yellow Fever in the Southeast Region of Maranhao State, Brazil, 1993–1994: Epidemiologic and Entomologic Findings. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 57 (2): 132-137, 1997.

Vasconcelos, P.F.C.; Rosa, A.P.A.T.; Rodrigues, S.G.; Rosa, E.S.T.; Monteiro, H.A.O.; Cruz, A.C.R.; Barros, V.L.R.S.; Souza, M.R.; Rosa, J.F.S.T. Yellow fever in Pará state, Amazon region of Brazil, 1998-1999: entomologic and epidemiologic. **Emerging infectious diseases**, 7(7): 565-569, 2001.

Wang, Y.; Gilbreath, T.; Kukutla, P.; Yan, G.; Xu, J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. **PLOS One**, 6: e24767, 2011.

Wood, D.E.; Lu, J.; Langmead, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. **Genome biology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2019.

Wu, P.; Sun, P.; Nie, K.; Zhu, Y.; Shi, M.; Xiao, C.; Liu, H.; Liu, Q.; Zhao, T.; Chen, X.; Zhou, H.; Wang, P.; Cheng, G. A gut comensal bacterium promotes mosquito permissiveness to arbovirus. **Cell Host & Microbe**, 25(1): 101-112, 2019.

Xi, Z.; Ramirez, J.L.; Dimopoulos, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLOS Pathogen**, 4:e1000098, 2008.

Xia, H. Wang, Y.; Shi, C.; Atoni, E.; Zhao, L. Yuan, Z. Comparative metagenomic profiling of virome associated with four common mosquito species in China. **Virologica sinica**, 33: 59-66, 2018.

Zakrzewski, M.; Rasic, G.; Darbro, J. M.; Krause, L.; Poo, Y. S.; Filipovic, I.; Parry, R.; Asgari, S.; Devine, G.; Suhrbier, A. Mapping the virome in wild-caught *Aedes aegypti* from Cairns and Bangkok. **Scientific Reports**, 8: 4690, 2018.

Zhu, W.; Lomsadze, A.; Borodovsky, M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 12, p. e132-e132, 2010.

Zsemlye, J. L.; Hancock, R. F.; & Foster, W. A. Analysis of a complex vertical copulatory-courtship display in the yellow fever vector *Sabethes chloropterus*. **Medical and Veterinary Entomology**, 19, 276–285, 2005.

APÊNDICES

TRABALHOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos completos publicados em periódicos

1. **ARAGÃO, ANDRESSA O.**; BLANCO, IAGO R. ; SOUZA, LUCIANA P.S. ; RAMOS, ROMMEL T.J. ; GUIMARÃES, LUÍS C. ; SILVA, ARTUR L. ; AZEVEDO, VASCO A.C. ; ARAÚJO, CARLOS LEONARDO A. ; FOLADOR, ADRIANA R.C. Proteins from the core genome of *Corynebacterium ulcerans* respond for pathogenicity and reveal promising vaccine targets for diphtheria. MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 161, p. 105263. 2021.
2. **ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO**; FÁBIO SILVA DA SILVA; DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS; ANA CECÍLIA RIBEIRO CRUZ; SANDRO PATROCA DA SILVA; DANIEL DAMOUS DIAS; BRUNA LAÍS SENA DO NASCIMENTO; JOSÉ WILSON ROSA JÚNIOR; HAMILTON ANTÔNIO DE OLIVEIRA MONTEIRO; JOAQUIM PINTO NUNES NETO. Description of mitochondrial genome and phylogenetic considerations of *Sabethes bipartipes*, *Sabethes cyaneus*, *Sabethes quasicyaneus* and *Sabethes tarsopus* (Diptera: Culicidae). ACTA TROPICA. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106493>. 2022.
3. AMPUERO, NAIANA FLEURY DA FONSECA ; SILVA, SANDRO PATROCA DA ; PEREIRA, WASHINGTON LUIZ ASSUNÇÃO ; BENIGNO, RAIMUNDO NONATO MORAES ; CARNEIRO, ADRIANA RIBEIRO ; **ARAGÃO, ANDRESSA DE OLIVEIRA** ; CASSEB, LÍVIA MEDEIROS NEVES ; NUNES, BRUNO TARDELLI DINIZ ; CASSEB, ALEXANDRE DO ROSÁRIO . Isolation and identification of *Brucella suis* biovar 1 in pork samples (*Sus scrofa*) from the municipality of Cachoeira do Arari, State of Pará-Brazil. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT, v. 11, p. e20811426351. 2022.
4. WYLERSON GUIMARÃES NOGUEIRA, BRUNA VERÔNICA AZEVEDO GOIS, KENNY DA COSTA PINHEIRO, **ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO**, ANA LÍDIA CAVALCANTE QUEIROZ, ARTUR LUIZ DA SILVA, ADRIANA RIBEIRO CARNEIRO FOLADOR, ROMMEL THIAGO JUCÁ RAMOS. Viral metagenomics reveals a widely diverse viral community of freshwater Amazonian Lake. FRONTIERS IN PUBLIC HEALTH, SECTION ENVIRONMENTAL HEALTH AND EXPOSOME, <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.869886>. 2022.
5. LUCAS HENRIQUE SILVA E SILVA; FÁBIO SILVA DA SILVA; DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS; ANA CECÍLIA RIBEIRO CRUZ; SANDRO PATROCA DA SILVA; **ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO**; DANIEL DAMOUS DIAS; BRUNA LAÍS SENA DO NASCIMENTO; JOSÉ WILSON ROSA JÚNIOR; DURVAL BERTRAM RODRIGUES VIEIRA; HAMILTON ANTÔNIO DE OLIVEIRA MONTEIRO; JOAQUIM PINTO NUNES NETO. Description of the mitogenome and phylogeny of *Aedes* spp. (Diptera: Culicidae) from the Amazon region. ACTA TROPICA. [10.1016/j.actatropica.2022.106500](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106500).
6. OSCAR VICTOR CARDENAS ALEGRIA; MARIELLE PIRES QUARESMA; CARLOS DIAS DANTAS; ELAINE MARIA SILVA GUEDES; **ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO**; SANDRO PATROCA DA SILVA; AMANDA COSTA BARROS DA SILVA; ANA CECÍLIA RIBEIRO CRUZ;

ROMMEL THIAGO JUCÁ RAMOS; ADRIANA RIBEIRO CARNEIRO FOLADOR. Impacts of soybean agriculture on the resistome of the Amazonian soil. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.948188>. 2022.

Artigos submetidos

1. **ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO**; ANA CECÍLIA RIBEIRO CRUZ; JOAQUIM PINTO NUNES NETO; SANDRO PATROCA DA SILVA; FÁBIO SILVA; JOÃO LUCAS GAMA DO COUTO; ADRIANA RIBEIRO CARNEIRO. Microbiome diversity as biological control for yellow fever mosquitoes and its arbovirus.
2. CARDENAS, Oscar; DIAS DANTAS, Carlos; SILVA GUEDES, Elaine; **de OLIVEIRA ARAGÃO, Andressa**; PATROCA DA SILVA, Sandro; de SOUSA MORAES, Cassia; RIBEIRO CRUZ, Ana Cecilia; JUCÁ RAMOS, Rommel; CARNEIRO, Adriana. From the forest to the soybean crop: how the microorganism diversity shifts in Amazon soils.

Capítulos de livros publicados

1. **ARAGÃO, ANDRESSA DE OLIVEIRA**. Surtos de febre amarela no Brasil e a importância do Ministério da Saúde e do Sistema Único de Saúde (SUS). TÓPICOS EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. 1 ed. Belo Horizonte - Minas Gerais: Poisson, 2019, v. 3, p. 46-52.

Apresentações de trabalhos em Congresso Nacional

1. **ARAGÃO, A. O.**; CRUZ, A. C. R. ; NUNES NETO, J. P. ; SILVA, S. P. ; RAMOS, R. T. J. ; FOLADOR, A. R. C. . Microbiome profile from wild yellow fever mosquitoes using shotgun approach. 2019. Apresentado no 30º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA.
2. MORAES, C.N.S. ; ARAUJO, C. L. A. ; **ARAGÃO, A. O.** ; ALVES, J.T.C. ; BARRETO, D.F. ; DIAS, L. M. ; BARAUNA, R. A. ; HENRIQUES, I. ; SILVA, A. ; FOLADOR, A. R. C. . Genetic characterization of *Klebsiella* sp. APC 28, a multiresistant antibiotic strain isolated from Água Preta lake, Belém, Brazil. 2019. Apresentado no 30º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA.
3. SILVA, A.C.B. ; MORAES, C.N.S. ; **ARAGÃO, A. O.** ; CASTRO, I.R. ; ALVES, J.T.C. ; MADEIRA, L.D.P.S. ; BARAUNA, R. A. ; HENRIQUES, I. ; SILVA, A. ; FOLADOR, A. R. C. . Genomic characterization of an antibiotic multiresistant *Enterobacter* sp. strain isolated from Água Preta lake, Belém, Pará. 2019. Apresentado no 30º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA.

Apresentação oral em Workshop local

1. **ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO**; ANA CECÍLIA RIBEIRO CRUZ; JOAQUIM PINTO NUNES NETO; SANDRO PATROCA DA SILVA; ADRIANA RIBEIRO CARNEIRO FOLADOR. Metagenômica preliminar de mosquitos transmissores de febre amarela silvestre (*Sabethes* spp.) provenientes de Santa Bárbara/Pará, Brasil. 2018. WORKSHOP DE GENÉTICA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR (UFPA).

Palestras ou rodas de conversa

1. **ARAGÃO, A. O.** Porque alguns mosquitos são melhores vetores do que outros? SIMPÓSIO NO MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI. 2019.
2. **ARAGÃO, A. O.** Roda de conversas “Geneticando”. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARÁ [evento online]. 2021.
3. **ARAGÃO, A. O.** Um bate-papo sobre Bioinformática: do mercado de trabalho às técnicas de identificação de patógenos. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO [evento online]. 2021.
4. **ARAGÃO, A. O.** Bioinformática aplicada à Genética - Dia do DNA. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARÁ. 2022.

Participação em bancas de trabalho de conclusão (monografia/especialização)

1. PINHO, R. A. P.; **ARAGÃO, A. O.**; OLIVEIRA, M. H. C.. Participação em banca de Marcela Natalia Rocha de Castro. Expansão da dengue no Brasil e na região norte: aspectos epidemiológicos e a contribuição do *Aedes aegypti* neste processo. 2020. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Saúde Pública) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Estado do Pará.

Desenvolvimento de material didático ou instrucional

1. **ARAGÃO, A. O.** Biodata descomplica: Bioinformática do zero ao avançado. 2021. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - eBook).

Cursos de curta duração ministrado (online)

1. Aplicação de Linguagens de Programação R e Python em Análises Biológicas. **Universidade Estadual do Pará** [online]. 2021.
2. Minicurso de Bioinformática. **Universidade de São Paulo** [online]. 2021.
3. Introdução à Bioinformática. **Biodata cursos**. 2021-atual.
4. Alinhamento de amostras. **Biodata cursos**. 2021-atual.
5. Montagem genômica. **Biodata cursos**. 2021-atual.

6. RNAseq. **Biodata cursos**. 2021-atual.
7. Filogenia. **Biodata cursos**. 2021-atual.
8. Programação em Python. **Biodata cursos**. 2021-atual.
9. Programação em R. **Biodata cursos**. 2021-atual.
10. Metagenômica. **Biodata cursos**. 2021-atual.

Redes sociais, websites e blogs

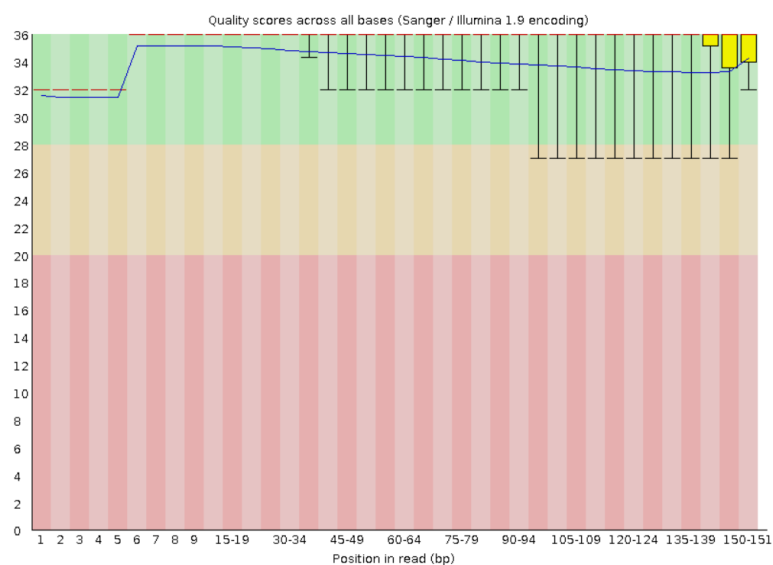
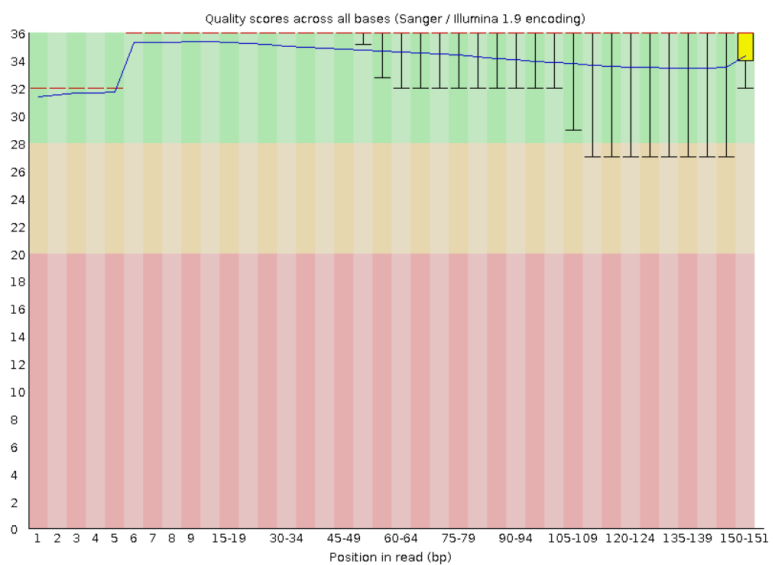
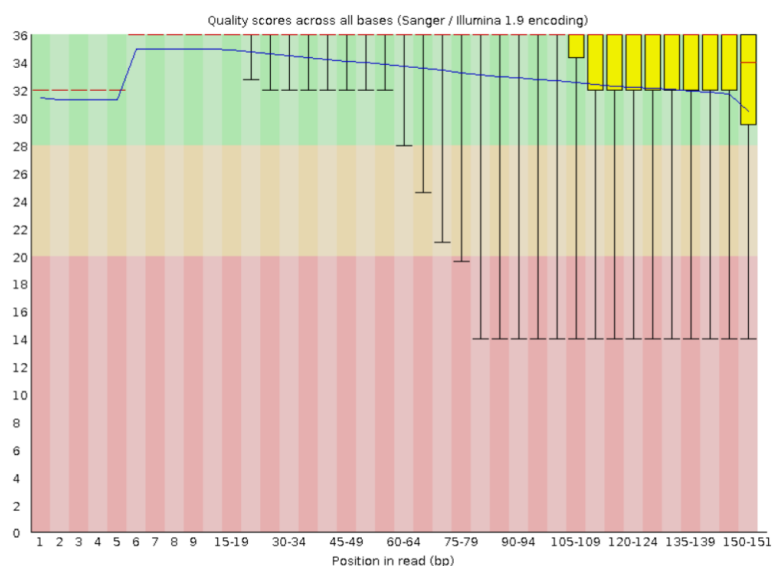
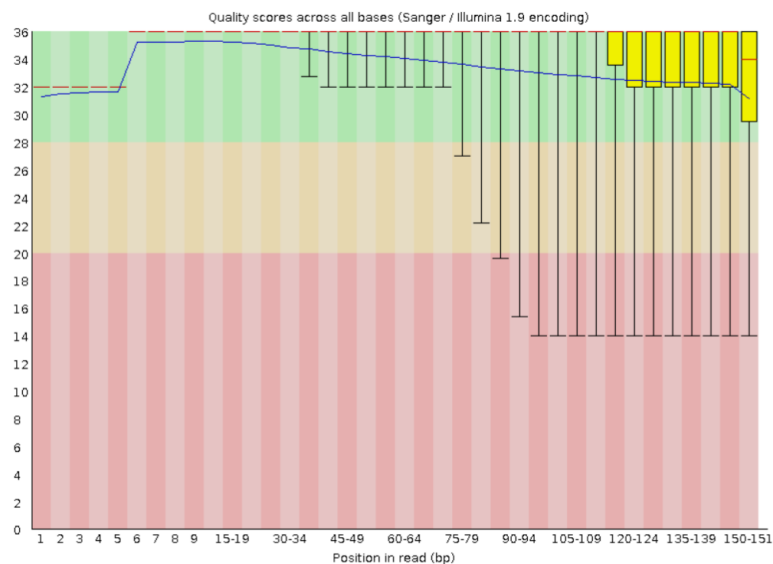
1. **ARAGÃO, A. O.** Site do Biodata cursos. www.biodatacursos.com. 2021-atual.
2. **ARAGÃO, A. O.** Youtube do Biodata cursos. <https://www.youtube.com/channel/UCQG9ZtmDpnEGRj5GrMXfQHA>. 2021-atual.
3. **ARAGÃO, A. O.** Instagram do Biodata cursos. <https://www.instagram.com/dra.andressaaragao/> . 2021-atual.
4. **ARAGÃO, A. O.** Grupo do Telegram do Biodata cursos. <https://t.me/biodatacursos>. 2021-atual.

Outros

1. Curso de graduação em Ciência da Computação. Universidade Paulista (UNIP). 2021-atual.

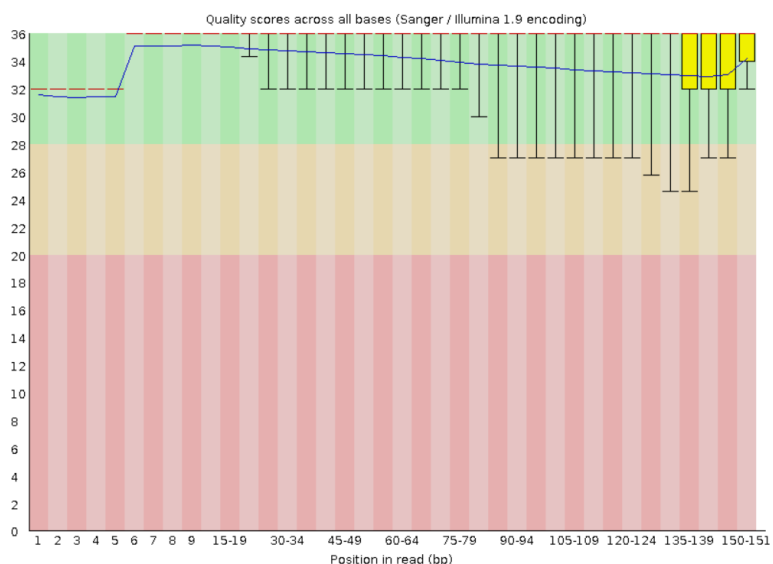
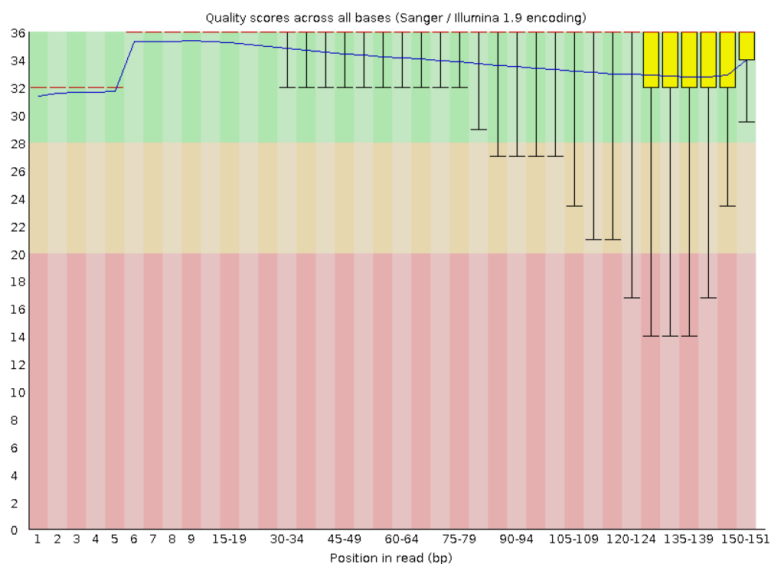
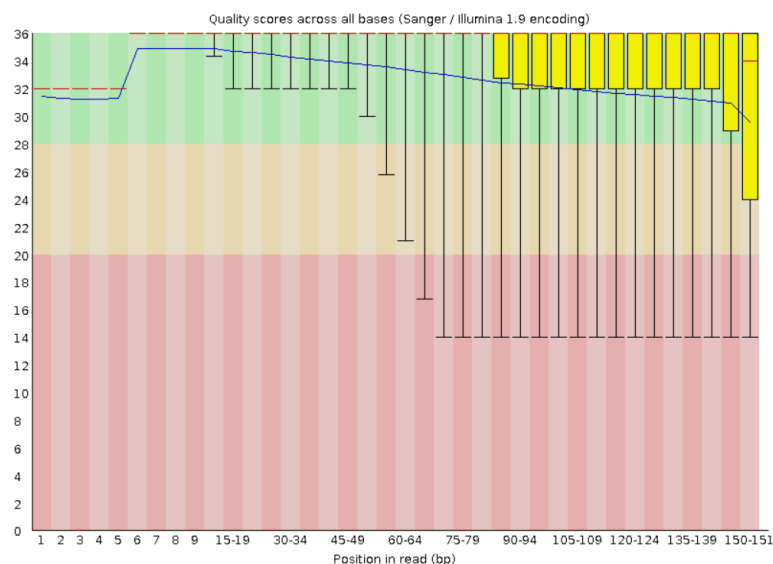
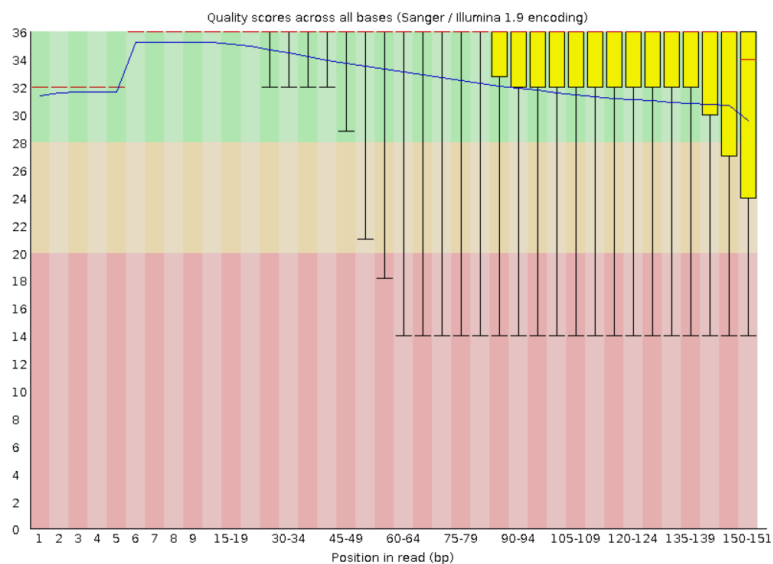
FastQC - antes e depois

Sabethes chloropterus (DNA)



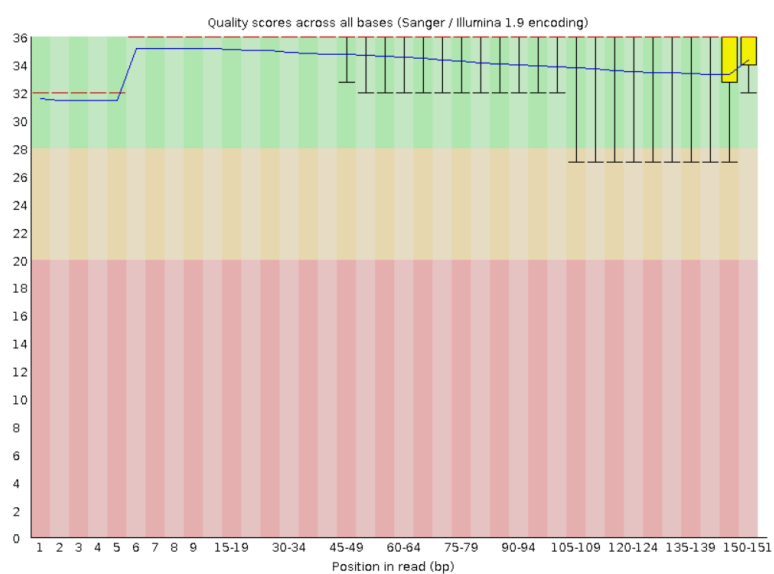
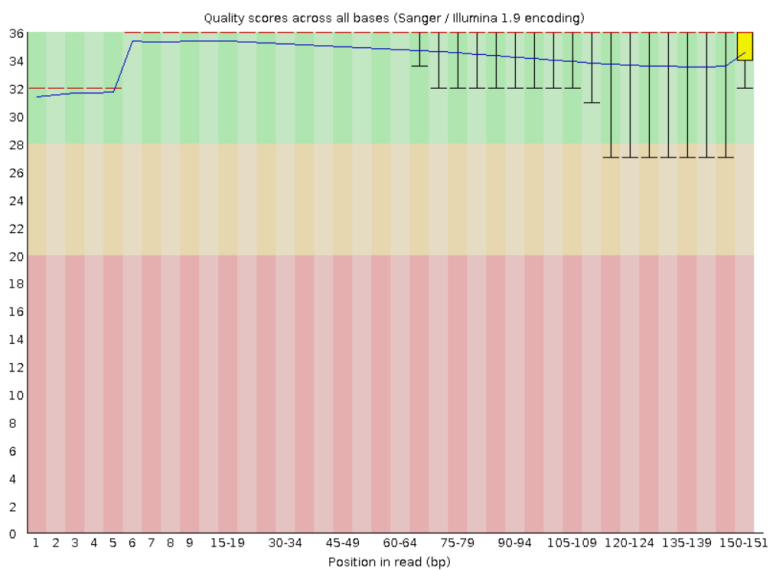
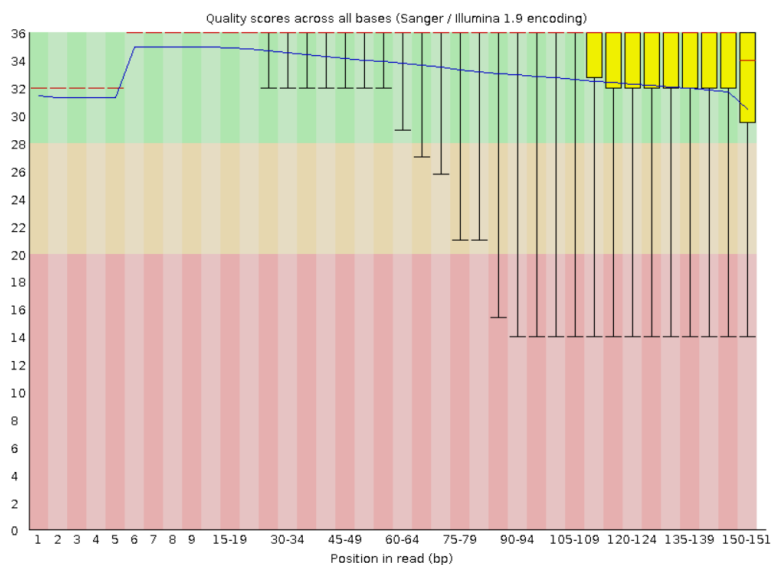
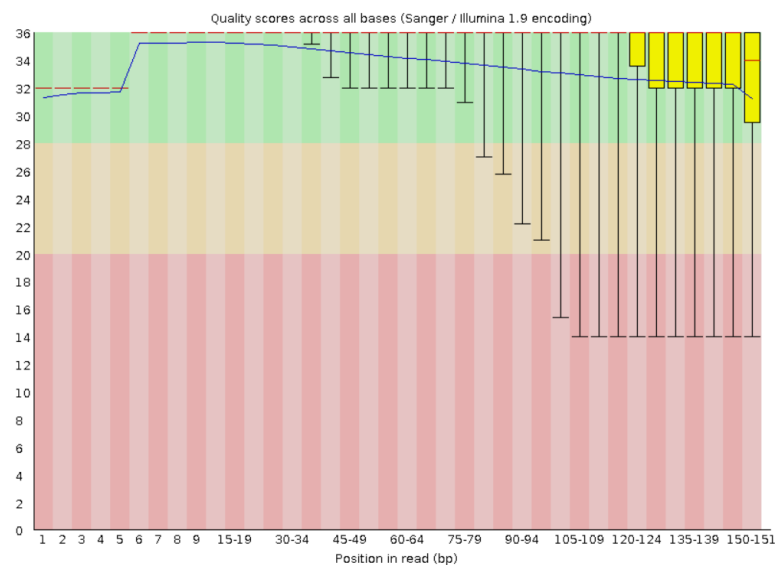
FastQC - antes e depois

Sabethes chloropterus (RNA)



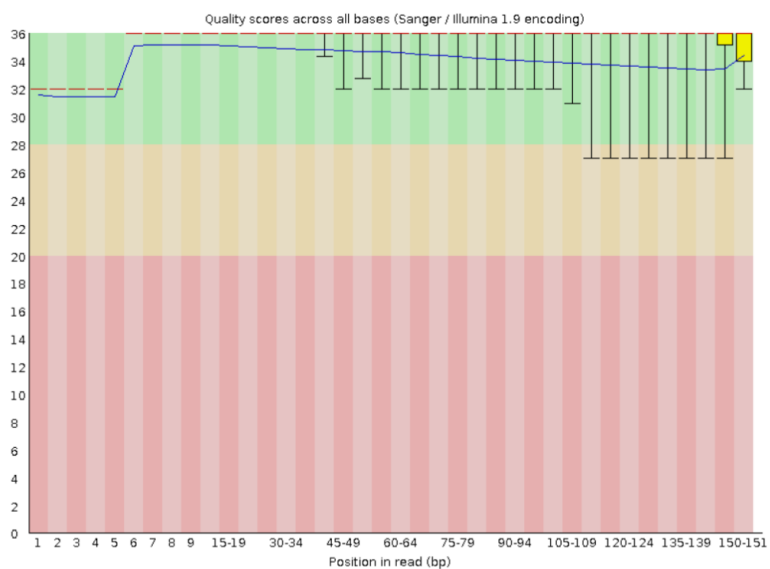
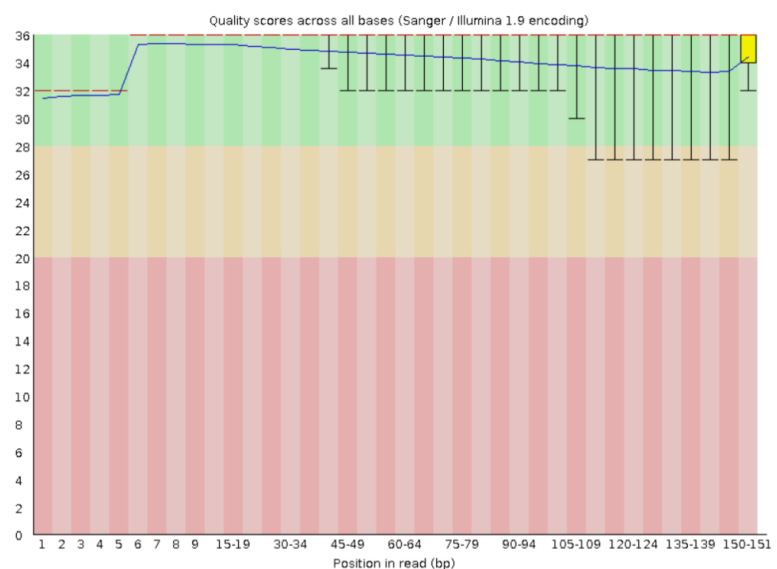
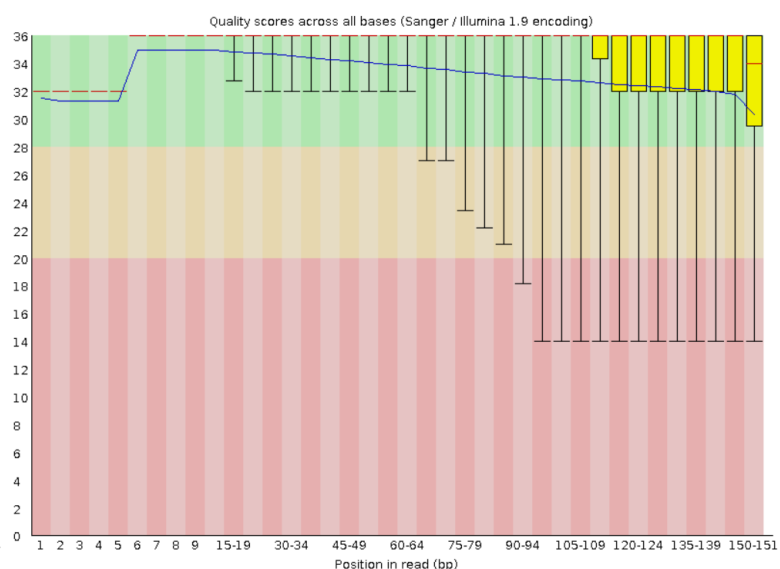
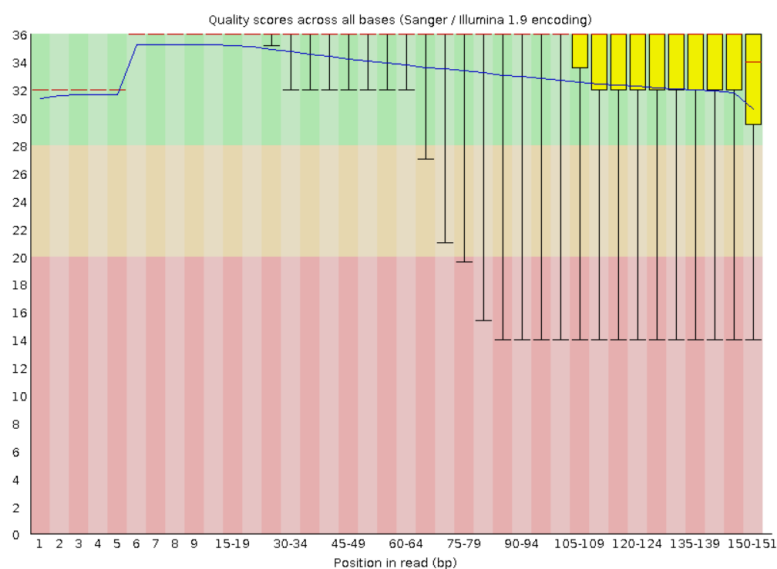
FastQC - antes e depois

Sabethes glaucodaemon (DNA)



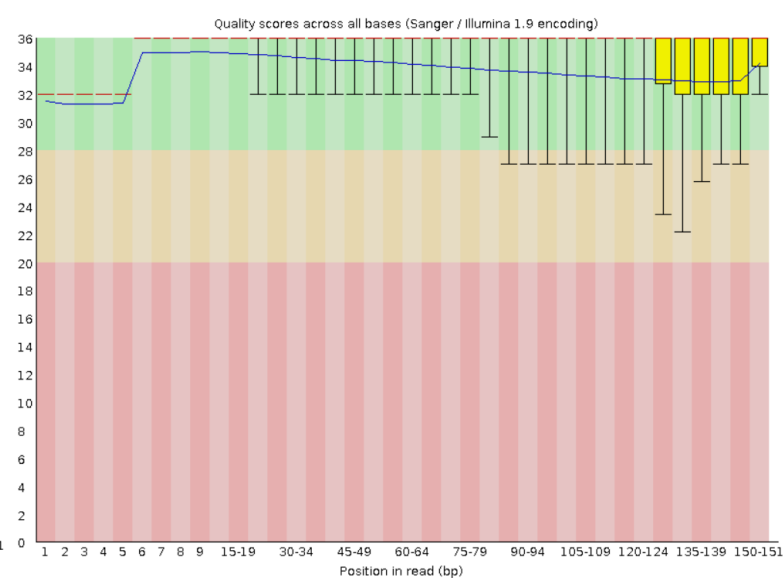
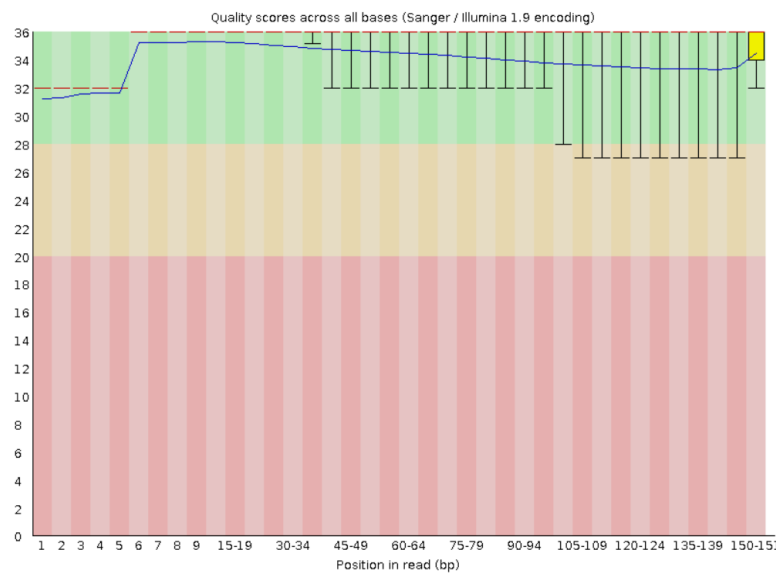
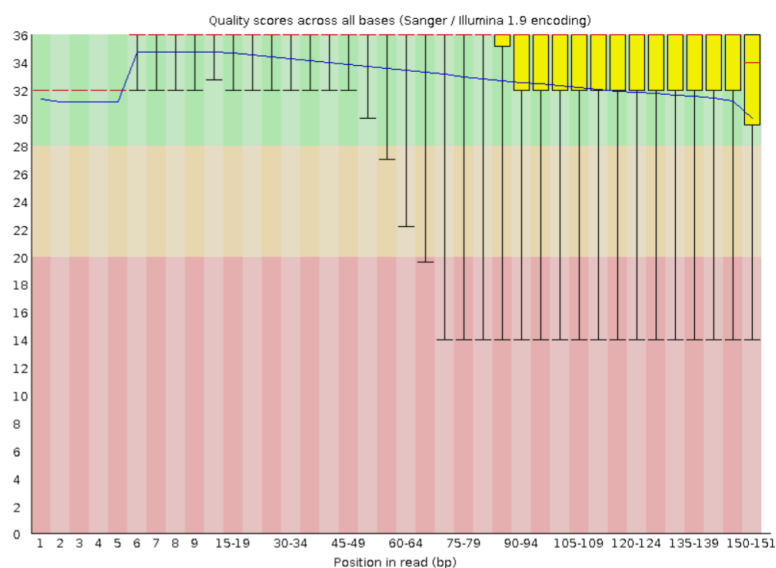
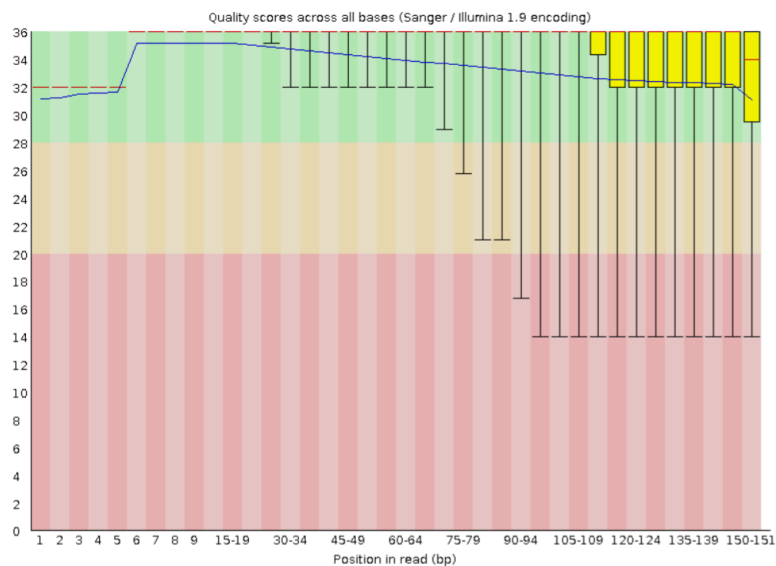
FastQC - antes e depois

Sabethes glaucodaemon (RNA)



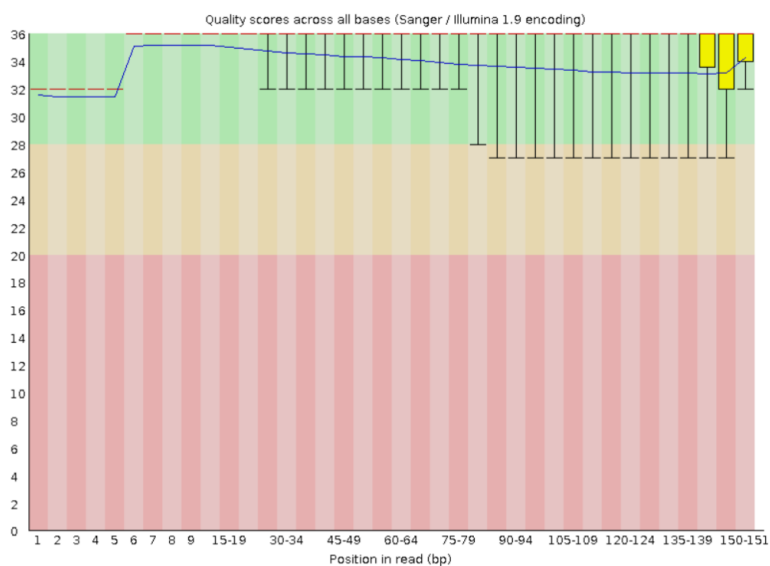
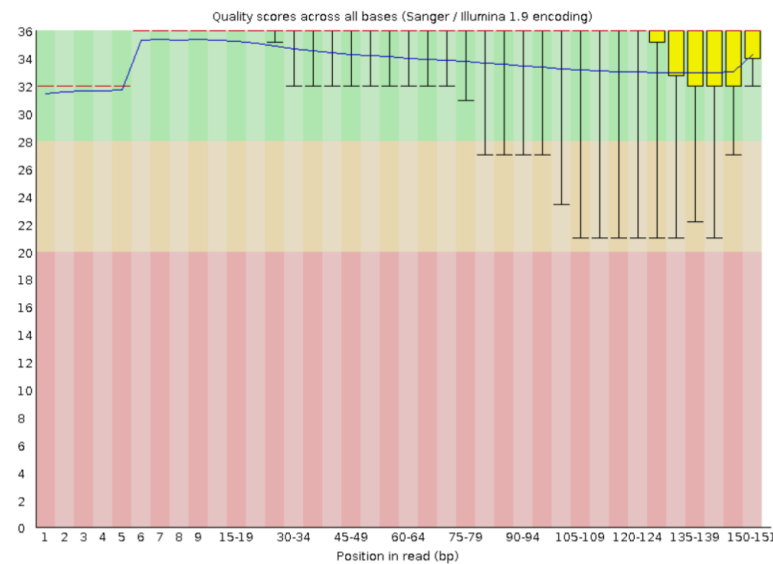
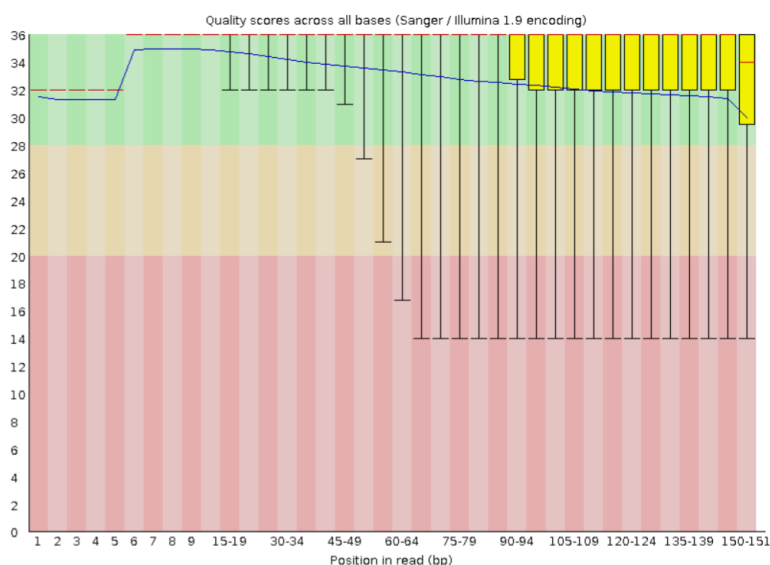
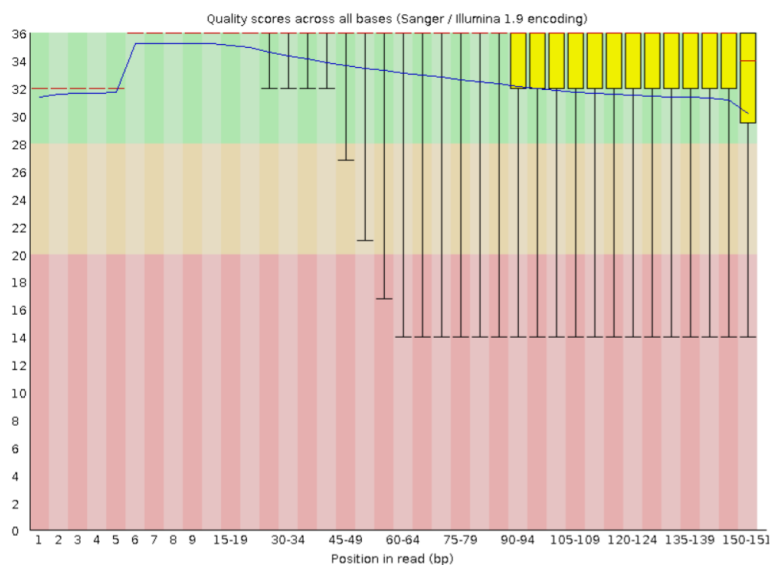
FastQC - antes e depois

Sabethes belisarioi (DNA)



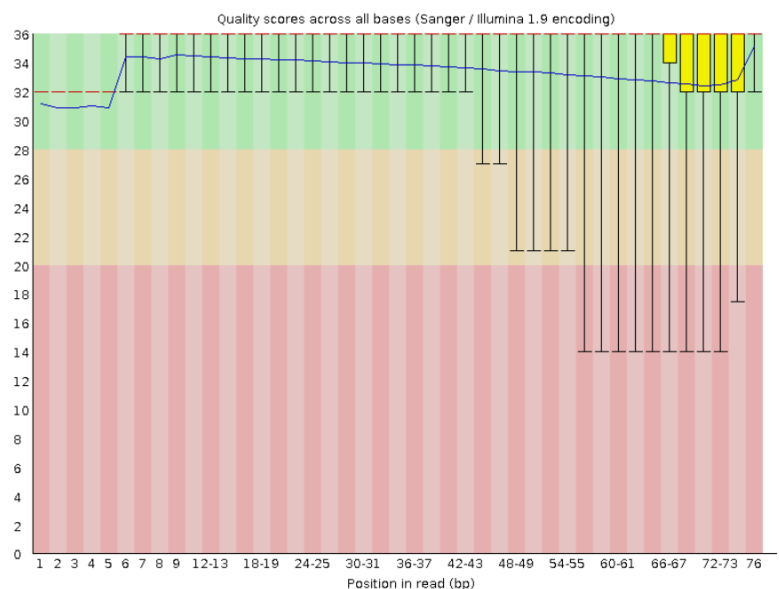
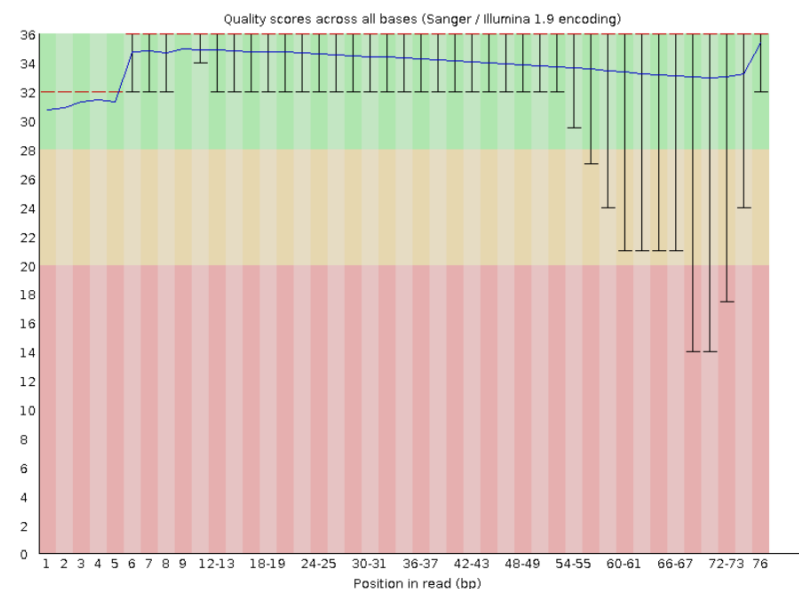
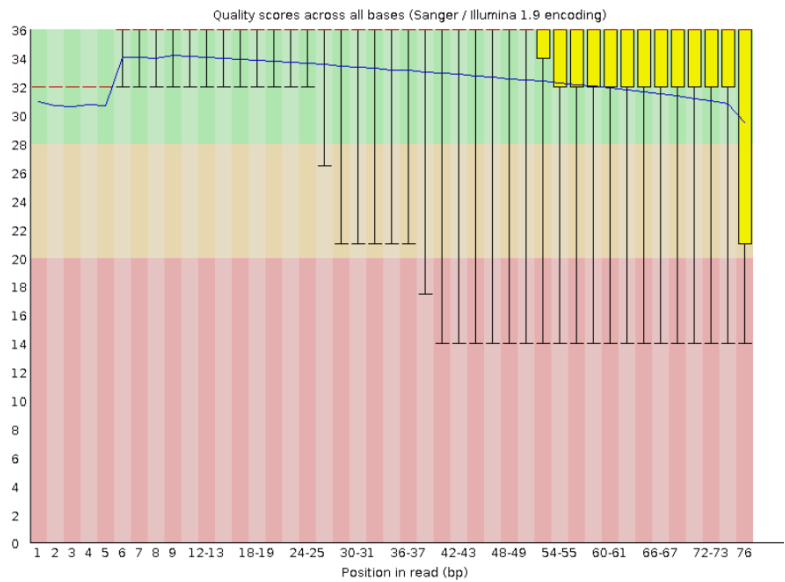
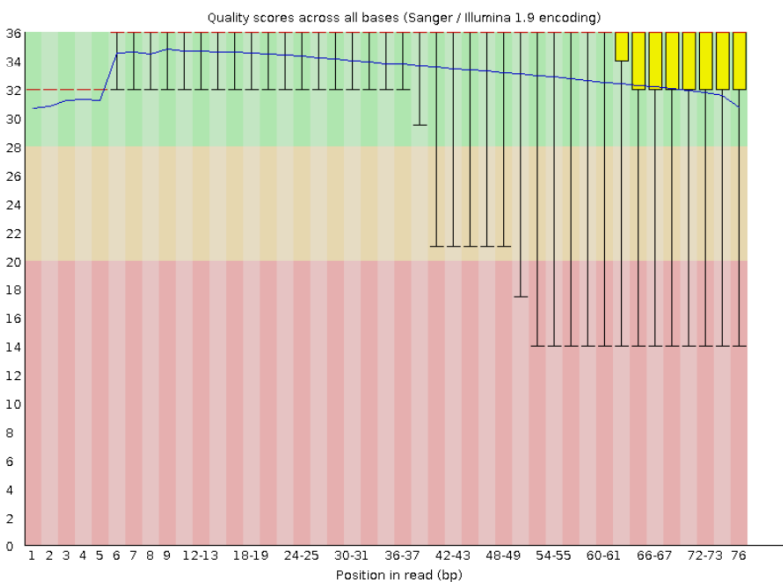
FastQC - antes e depois

Sabethes belisarioi (RNA)



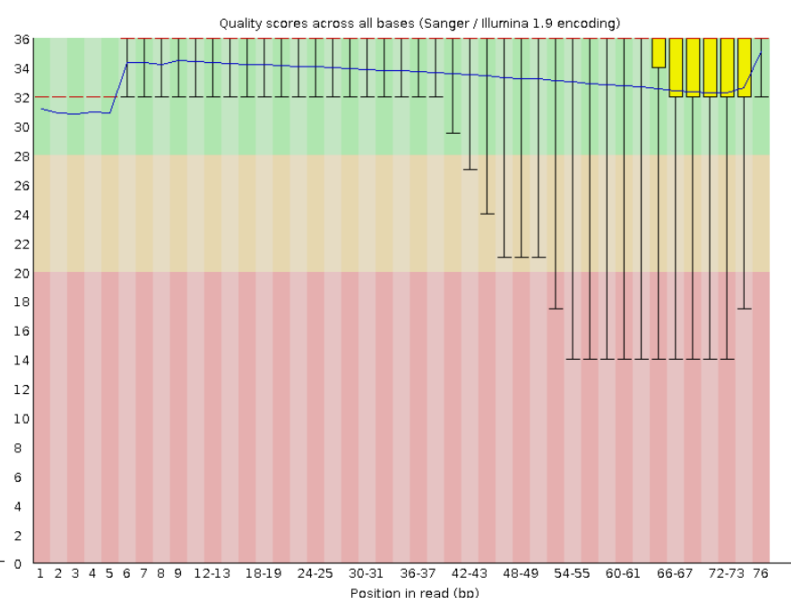
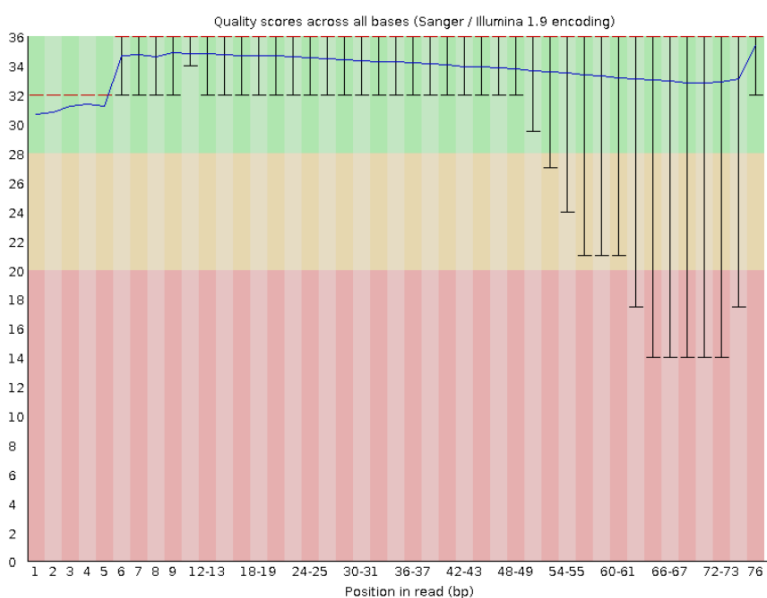
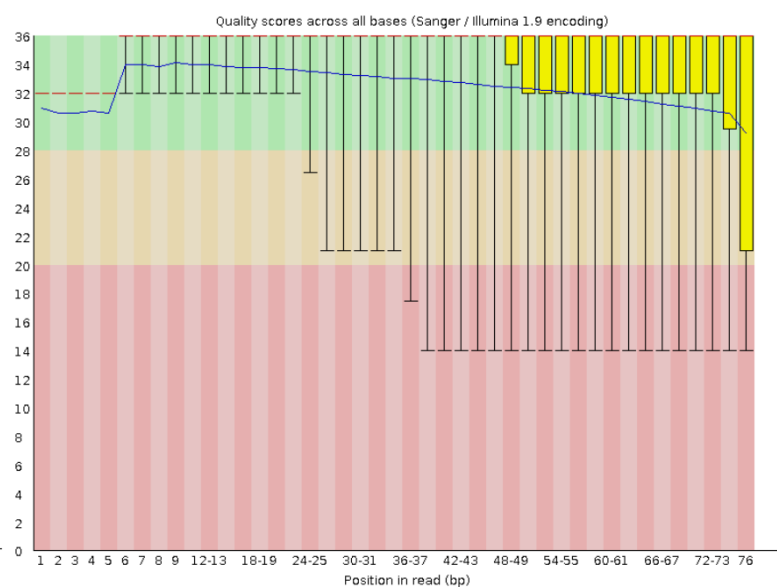
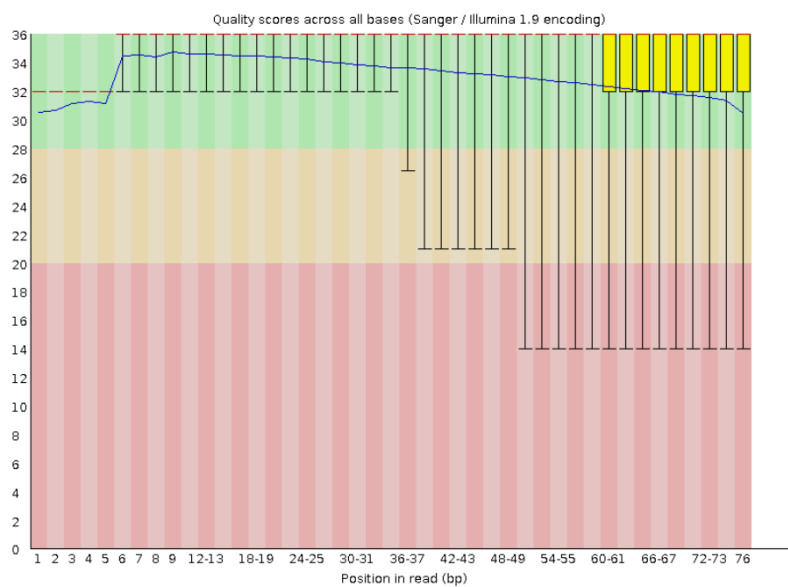
FastQC - antes e depois

Sabethes bipartipes (DNA)



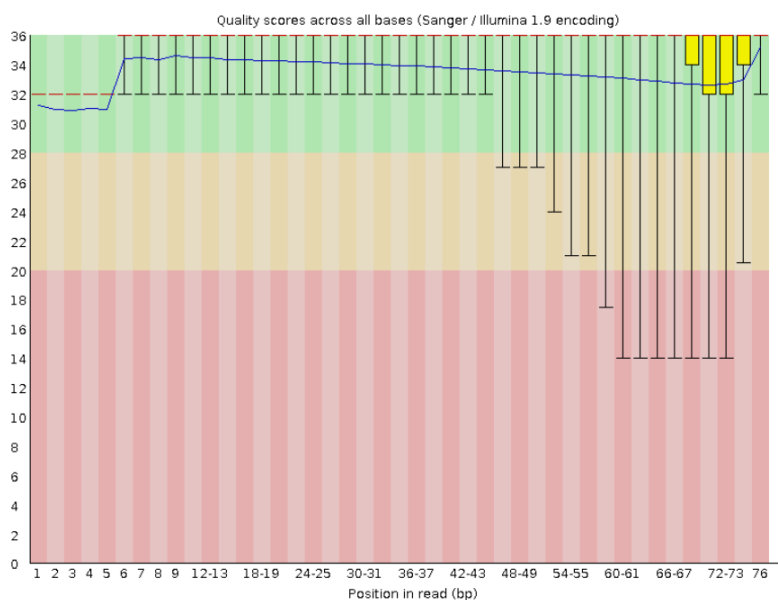
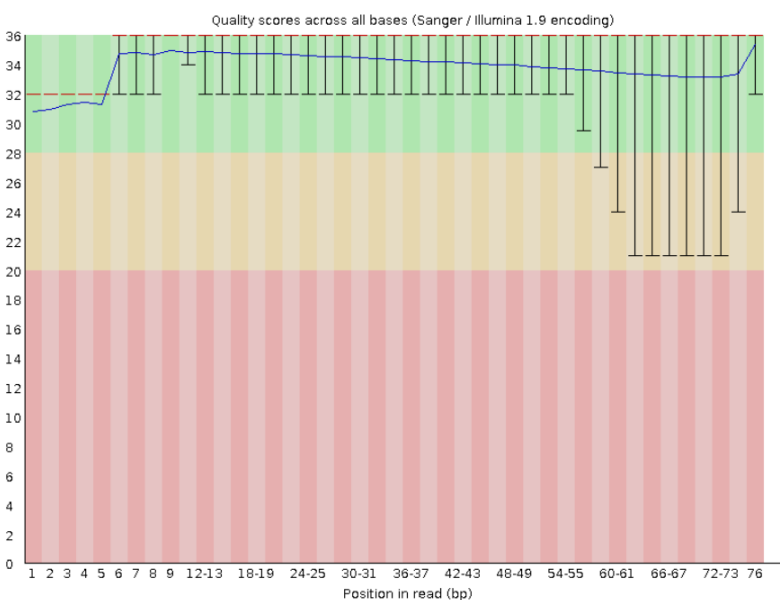
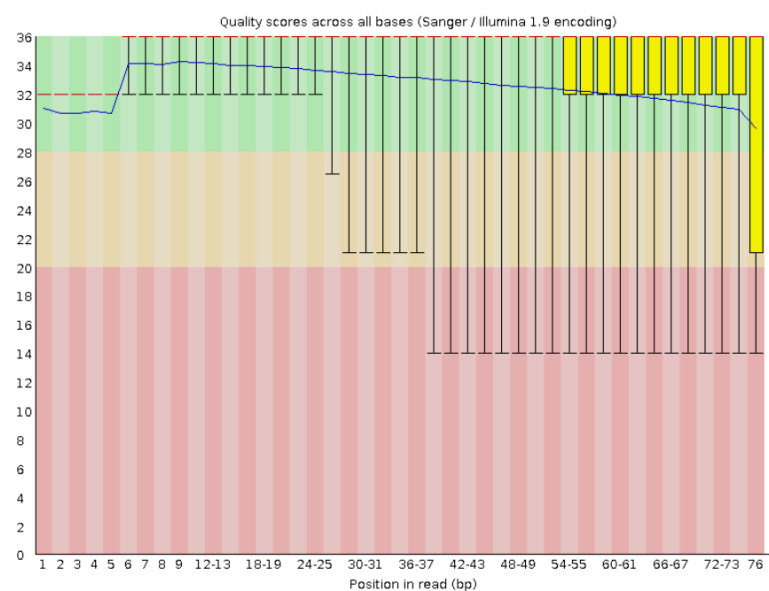
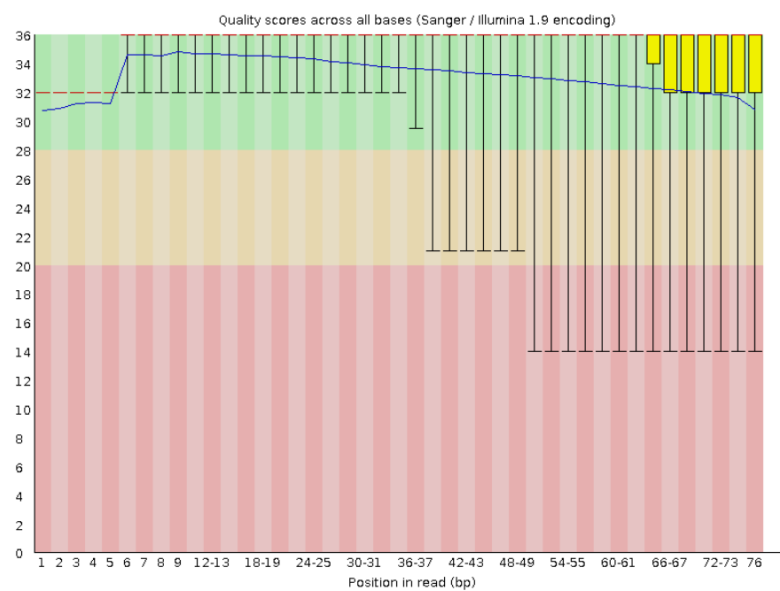
FastQC - antes e depois

Sabethes cyaneus (DNA)



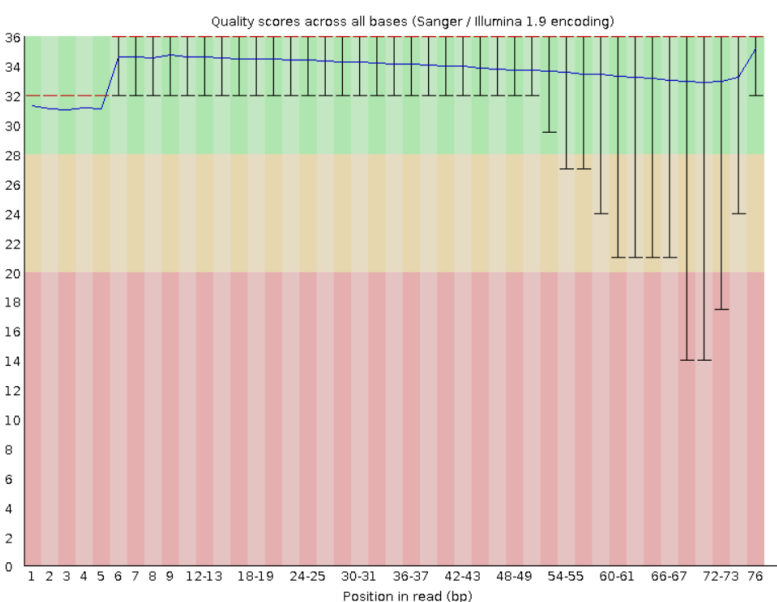
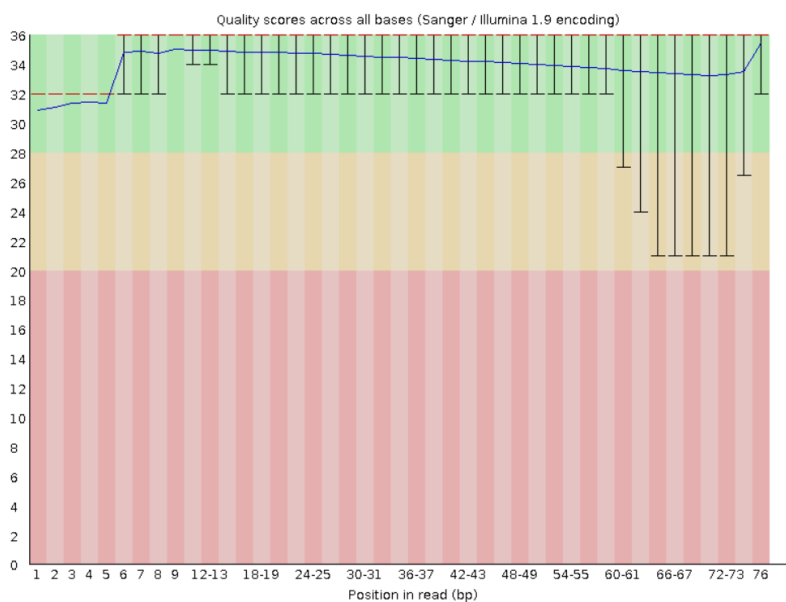
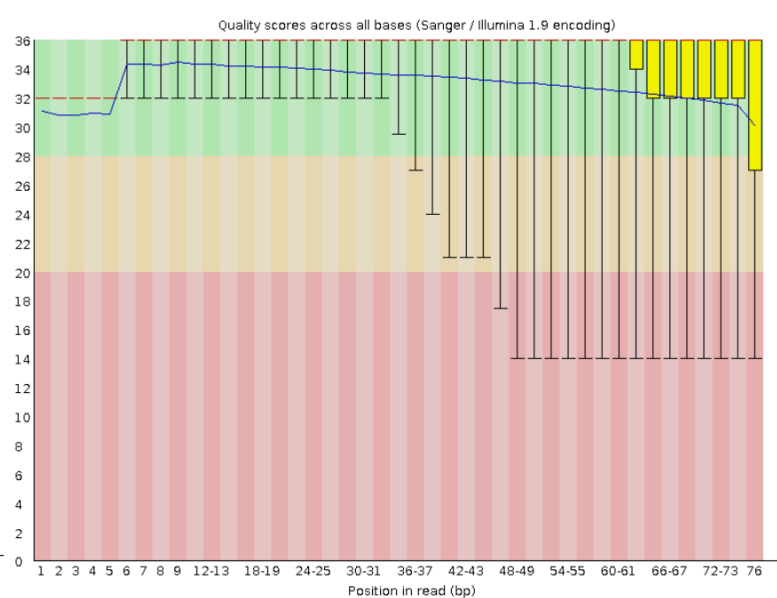
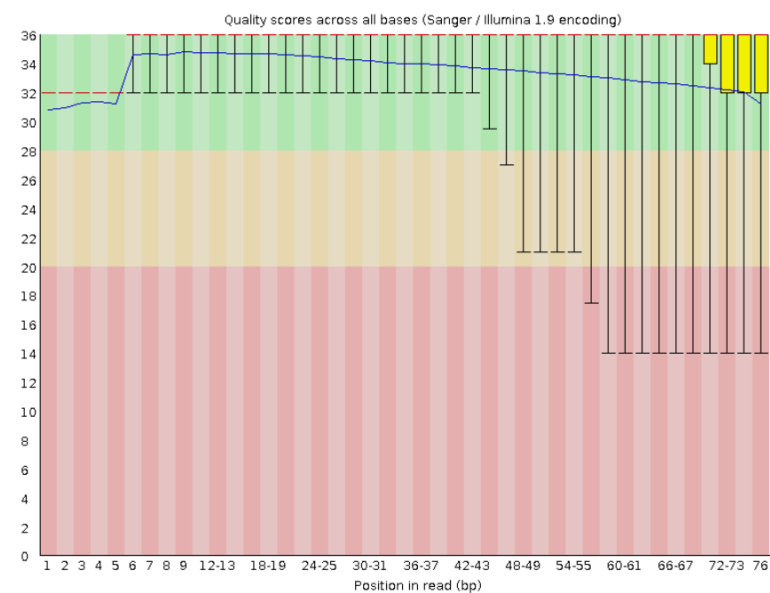
FastQC - antes e depois

Sabethes tarsopus (DNA)



FastQC - antes e depois

Sabethes quasicyaneus (DNA)



Quast online

Sabethes chloropterus (DNA)


☒ Show heatmap

Statistics without reference	contigs_megahit	contigs_spades
# contigs	287 807	157 651
# contigs (≥ 0 bp)	579 782	948 621
# contigs (≥ 1000 bp)	55 382	69 669
# contigs (≥ 5000 bp)	360	999
# contigs (≥ 10000 bp)	4	28
# contigs (≥ 25000 bp)	0	0
# contigs (≥ 50000 bp)	0	0
Largest contig	15 744	18 231
Total length	236 768 298	177 410 810
Total length (≥ 0 bp)	350 002 134	388 316 620
Total length (≥ 1000 bp)	81 479 460	112 805 252
Total length (≥ 5000 bp)	2 203 228	6 600 592
Total length (≥ 10000 bp)	49 628	351 066
Total length (≥ 25000 bp)	0	0
Total length (≥ 50000 bp)	0	0
N50	806	1192
N75	621	868
L50	96 784	47 539
L75	181 134	91 432
GC (%)	38.84	38.95
Mismatches		
# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Quast online

Sabethes chloropterus (RNA)


 Worst Median Best

☒ Show heatmap

Statistics without reference contigs_megahit contigs_spades

# contigs	129 871	81 509
# contigs (≥ 0 bp)	402 986	828 741
# contigs (≥ 1000 bp)	8444	15 864
# contigs (≥ 5000 bp)	28	247
# contigs (≥ 10000 bp)	0	4
# contigs (≥ 25000 bp)	0	0
# contigs (≥ 50000 bp)	0	0
Largest contig	9825	14 099
Total length	88 445 295	69 201 090
Total length (≥ 0 bp)	192 900 338	275 717 706
Total length (≥ 1000 bp)	11 455 076	24 565 479
Total length (≥ 5000 bp)	180 736	1 523 170
Total length (≥ 10000 bp)	0	47 999
Total length (≥ 25000 bp)	0	0
Total length (≥ 50000 bp)	0	0
N50	649	841
N75	562	639
L50	51 286	26 869
L75	88 049	50 650
GC (%)	38.85	38.78

Mismatches

# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Quast online

Sabethes glaucodaemon (DNA)


 Worst Median Best

☒ Show heatmap

Statistics without reference contigs_megahit contigs_spades

# contigs	240 584	133 598
# contigs (≥ 0 bp)	483 267	758 064
# contigs (≥ 1000 bp)	47 483	62 306
# contigs (≥ 5000 bp)	354	811
# contigs (≥ 10000 bp)	2	28
# contigs (≥ 25000 bp)	0	1
# contigs (≥ 50000 bp)	0	0
Largest contig	13 017	28 580
Total length	199 384 305	153 570 849
Total length (≥ 0 bp)	293 418 695	319 803 171
Total length (≥ 1000 bp)	70 228 019	100 893 477
Total length (≥ 5000 bp)	2 195 941	5 377 212
Total length (≥ 10000 bp)	24 523	347 375
Total length (≥ 25000 bp)	0	28 580
Total length (≥ 50000 bp)	0	0
N50	814	1226
N75	624	889
L50	80 343	40 449
L75	150 923	77 471
GC (%)	38.1	38.58

Mismatches

# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Quast online

Sabethes glaucodaemon (RNA)


 Worst Median Best

☒ Show heatmap

Statistics without reference	contigs_megahit	contigs_spades
# contigs	102 719	72 870
# contigs (≥ 0 bp)	336 687	671 735
# contigs (≥ 1000 bp)	6908	14 041
# contigs (≥ 5000 bp)	41	286
# contigs (≥ 10000 bp)	0	4
# contigs (≥ 25000 bp)	0	0
# contigs (≥ 50000 bp)	0	0
Largest contig	9599	21 340
Total length	70 328 401	61 975 300
Total length (≥ 0 bp)	159 787 436	226 059 830
Total length (≥ 1000 bp)	9 779 273	21 725 801
Total length (≥ 5000 bp)	255 388	1 833 031
Total length (≥ 10000 bp)	0	58 465
Total length (≥ 25000 bp)	0	0
Total length (≥ 50000 bp)	0	0
N50	649	841
N75	560	645
L50	40 124	24 195
L75	69 407	45 398
GC (%)	37.99	38.37
Mismatches		
# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Quast online

Sabethes belisarioi (DNA)


 Worst Median Best

☒ Show heatmap

Statistics without reference	contigs_megahit	contigs_spades
# contigs	232 277	162 675
# contigs (≥ 0 bp)	461 398	790 940
# contigs (≥ 1000 bp)	32 793	47 328
# contigs (≥ 5000 bp)	77	504
# contigs (≥ 10000 bp)	8	12
# contigs (≥ 25000 bp)	4	0
# contigs (≥ 50000 bp)	2	0
Largest contig	53 880	16 534
Total length	178 157 607	151 990 665
Total length (≥ 0 bp)	265 785 529	337 426 015
Total length (≥ 1000 bp)	44 077 930	71 951 081
Total length (≥ 5000 bp)	658 308	3 295 865
Total length (≥ 10000 bp)	235 006	138 051
Total length (≥ 25000 bp)	177 118	0
Total length (≥ 50000 bp)	104 182	0
N50	750	966
N75	611	697
L50	85 579	51 445
L75	151 753	97 795
GC (%)	36.23	36.95
Mismatches		
# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Quast online

Sabethes belisarioi (RNA)

Worst Median Best

☒ Show heatmap

Statistics without reference contigs_megahit contigs_spades

# contigs	186 837	87 613
# contigs (≥ 0 bp)	515 160	967 832
# contigs (≥ 1000 bp)	11 236	21 618
# contigs (≥ 5000 bp)	32	141
# contigs (≥ 10000 bp)	5	9
# contigs (≥ 25000 bp)	3	3
# contigs (≥ 50000 bp)	1	1
Largest contig	78 261	57 665
Total length	126 892 826	76 683 681
Total length (≥ 0 bp)	252 836 108	319 439 516
Total length (≥ 1000 bp)	14 190 149	30 584 444
Total length (≥ 5000 bp)	371 424	1 031 940
Total length (≥ 10000 bp)	196 293	200 587
Total length (≥ 25000 bp)	146 474	109 955
Total length (≥ 50000 bp)	78 261	57 665
N50	657	901
N75	567	676
L50	74 907	29 806
L75	127 101	54 294
GC (%)	36.22	36.92

Mismatches

# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Quast online

Sabethes bipartipes (DNA)


 Worst Median Best

☒ Show heatmap

Statistics without reference	contigs_megahit	contigs_spades
# contigs	158 131	143 406
# contigs (≥ 0 bp)	316 521	269 602
# contigs (≥ 1000 bp)	66 854	74 148
# contigs (≥ 5000 bp)	256	1020
# contigs (≥ 10000 bp)	4	29
# contigs (≥ 25000 bp)	0	0
# contigs (≥ 50000 bp)	0	0
Largest contig	17 587	19 517
Total length	175 034 031	188 504 997
Total length (≥ 0 bp)	226 732 567	226 246 078
Total length (≥ 1000 bp)	110 060 323	139 265 162
Total length (≥ 5000 bp)	1 585 606	6 540 258
Total length (≥ 10000 bp)	54 643	343 982
Total length (≥ 25000 bp)	0	0
Total length (≥ 50000 bp)	0	0
N50	1227	1574
N75	820	975
L50	46 463	38 264
L75	90 314	76 289
GC (%)	41.34	41.11
Mismatches		
# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Quast online

Sabethes cyaneus (DNA)


 Worst Median Best

☒ Show heatmap

Statistics without reference	contigs_megahit	contigs_spades
# contigs	69 523	90 985
# contigs (≥ 0 bp)	247 123	289 833
# contigs (≥ 1000 bp)	13 188	26 531
# contigs (≥ 5000 bp)	160	522
# contigs (≥ 10000 bp)	0	16
# contigs (≥ 25000 bp)	0	0
# contigs (≥ 50000 bp)	0	0
Largest contig	8769	13 782
Total length	58 694 021	88 177 625
Total length (≥ 0 bp)	115 543 135	145 487 470
Total length (≥ 1000 bp)	20 683 103	43 635 190
Total length (≥ 5000 bp)	976 352	3 403 118
Total length (≥ 10000 bp)	0	179 159
Total length (≥ 25000 bp)	0	0
Total length (≥ 50000 bp)	0	0
N50	819	992
N75	633	702
L50	22 841	26 987
L75	43 375	53 606
GC (%)	43.18	42.95
Mismatches		
# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Quast online

Sabethes tarsopus (DNA)


 Worst Median Best

☒ Show heatmap

Statistics without reference contigs_megahit contigs_spades

# contigs	59 679	78 143
# contigs (≥ 0 bp)	209 359	272 099
# contigs (≥ 1000 bp)	10 393	17 387
# contigs (≥ 5000 bp)	317	753
# contigs (≥ 10000 bp)	2	15
# contigs (≥ 25000 bp)	0	0
# contigs (≥ 50000 bp)	0	0
Largest contig	11 806	17 510
Total length	50 977 634	71 745 056
Total length (≥ 0 bp)	99 807 588	128 856 525
Total length (≥ 1000 bp)	18 173 428	30 591 906
Total length (≥ 5000 bp)	1 953 606	4 866 996
Total length (≥ 10000 bp)	23 296	186 898
Total length (≥ 25000 bp)	0	0
Total length (≥ 50000 bp)	0	0
N50	807	892
N75	622	656
L50	18 598	22 993
L75	36 744	46 672
GC (%)	40.88	40.82

Mismatches

# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

Quast online

Sabethes quasicyaneus (DNA)


 Worst Median Best

☒ Show heatmap

Statistics without reference contigs_megahit contigs_spades

# contigs	265 455	227 829
# contigs (≥ 0 bp)	605 400	509 145
# contigs (≥ 1000 bp)	68 073	89 703
# contigs (≥ 5000 bp)	213	897
# contigs (≥ 10000 bp)	0	25
# contigs (≥ 25000 bp)	0	0
# contigs (≥ 50000 bp)	0	0
Largest contig	9634	16 202
Total length	233 891 396	246 792 276
Total length (≥ 0 bp)	348 605 621	331 613 338
Total length (≥ 1000 bp)	97 517 098	150 162 867
Total length (≥ 5000 bp)	1 320 724	5 846 292
Total length (≥ 10000 bp)	0	287 257
Total length (≥ 25000 bp)	0	0
Total length (≥ 50000 bp)	0	0
N50	898	1195
N75	671	788
L50	88 603	65 188
L75	164 353	129 125
GC (%)	41.13	40.83

Mismatches

# N's	0	0
# N's per 100 kbp	0	0

ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 63048-1	Data da Emissão: 21/05/2018 16:27	Data para Revalidação*: 20/06/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO	CPF: 763.103.702-78
Título do Projeto: Análise comparativa do microbioma de mosquitos do gênero Sabethes e caracterização genômica de Sabethes chloropterus provenientes da região amazônica brasileira	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de mosquitos da família Culicidae para estudos de biologia molecular	05/2018	05/2022

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Ana Cecília Ribeiro Cruz	Professora coordenadora	227.568.842-00	4845886 SEGUP-PA	Brasileira
2	Joaquim Pinto Nunes Neto	Coordenar as coletas e identificações	653.361.512-20	3187523 PC-PA-PA	Brasileira
3	Adriana Ribeiro Carneiro	Professora orientadora	680.209.022-87	3489297 segup-PA	Brasileira
4	Hélio Augusto Cardoso Saraiva	Coleta e identificação	047.412.502-53	1384104 SEGUP-PA	Brasileira
5	Hamilton Antonio de Oliveira Monteiro	Coleta e identificação	102.347.992-34	5362077 SEGUP-PA	Brasileira
6	FRANCISCO CORREA CASTRO	Coleta e identificação	045.203.782-49	2561274 SSP-PA-PA	Brasileira
7	JOSE WILSON ROSA JUNIOR	Coleta e identificação	948.269.272-15	5392359 SSP-PA	Brasileira
8	Sandro Patroca da Silva	Sequenciamento e análise dos dados	681.531.202-04	3424384 SSP-PA	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 97561124



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 63048-2	Data da Emissão: 01/11/2019 11:08:53	Data da Revalidação*: 01/08/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ANDRESSA DE OLIVEIRA ARAGÃO	CPF: 763.103.702-78
Título do Projeto: Análise comparativa do microbioma de mosquitos do gênero Sabethes e caracterização genômica de Sabethes chloropterus provenientes da região amazônica brasileira	
Nome da Instituição: Universidade Federal do Pará	CNPJ: 34.621.748/0001-23

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de mosquitos da família Culicidae para estudos de biologia molecular	05/2018	05/2022

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Adriana Ribeiro Carneiro	Professora orientadora	680.209.022-87	Brasileira
2	Ana Cecília Ribeiro Cruz	Professora coorientadora	227.568.842-00	Brasileira
3	Joaquim Pinto Nunes Neto	Coordenar as coletas e identificações	653.361.512-20	Brasileira
4	Hamilton Antonio de Oliveira Monteiro	Coleta e identificação	102.347.992-34	Brasileira
5	Hélio Augusto Cardoso Saraiva	Coleta e identificação	047.412.502-53	Brasileira
6	FRANCISCO CORREA CASTRO	Coleta e identificação	045.203.782-49	Brasileira
7	JOSE WILSON ROSA JUNIOR	Coleta e identificação	948.269.272-15	Brasileira
8	Sandro Patroca da Silva	Sequenciamento e análise dos dados	681.531.202-04	Brasileira

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0630480220191101

Página 1/3