

A MICROBIOTA INTESTINAL DE *Aedes aegypti* PROTEGE OS
INSETOS CONTRA INFECÇÕES POR FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS

JOSIANE PESSANHA RIBEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Maio – 2022

A MICROBIOTA INTESTINAL DE *Aedes aegypti* PROTEGE OS
INSETOS CONTRA INFECÇÕES POR FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS

JOSIANE PESSANHA RIBEIRO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Dr. Richard Ian Samuels

Coorientador: Dr. Adriano Rodrigues de Paula

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Maio – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R484 Ribeiro, Josiane Pessanha.

A microbiota intestinal de *Aedes aegypti* protege os insetos contra infecções por fungos entomopatogênicos / Josiane Pessanha Ribeiro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

98 f.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2023.

Orientador: Richard Ian Samuels.

1. Fungo. 2. patógeno. 3. virulência. 4. bactéria. 5. mosquito. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

A MICROBIOTA INTESTINAL DE *Aedes aegypti* PROTEGE OS
INSETOS CONTRA INFECÇÕES POR FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS

JOSIANE PESSANHA RIBEIRO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção
do título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 30 de maio de 2022.

Comissão Examinadora:



Dra. Flávia Borges Mury (UFRJ/Macaé)



Dr. José Roberto da Silva (UFRJ/Macaé)



Dr. Francisco José Alves Lemos (UENF/CBB/LBT)



Dr. Richard Ian Samuels (UENF/CCTA/LEF - Orientador)

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria”.

(Paulo Freire)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela alegria desta conquista. Por ter me fortalecido ao ponto de superar as dificuldades e alcançar esta etapa tão importante da minha vida;

Ao professor Dr. Richard Ian Samuels pela acolhida no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), orientação, confiança e oportunidade de realizar este trabalho;

Ao Dr. Adriano Rodrigues de Paula pelos ensinamentos, os quais foram, são e serão muito importantes para mim e para a minha vida profissional;

À Pós-Doc e amiga Leila Eid Imad da Silva, pela colaboração, incentivo e companheirismo no decorrer de todo este trabalho;

Aos Pós-Doc Ricardo de Oliveira Barbosa Bitencourt, Aline Teixeira Carolino e Thaís Berçot pela colaboração e ensinamentos no decorrer do presente estudo;

À doutora Simone Gomes, pela amizade, e colaboração na correção do manuscrito de qualificação;

Ao doutorando Anderson Ribeiro pela amizade e colaboração com a estatística da presente pesquisa;

A toda equipe do laboratório de Entomologia e Fitopatologia, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores da Comissão Examinadora: Dra. Flávia Borges Mury, Dr. José Roberto da Silva, Dr. Francisco José Alves Lemos, e, também, aos

Professores Suplentes: Dra. Aline Teixeira Carolino e Dr. Carlos Peres Silva pela dedicação e colaboração com a presente pesquisa;

Ao programa de pós-graduação em produção Vegetal, aos professores desse programa e aos seus funcionários pela colaboração;

A FAPERJ pelo apoio financeiro, o qual foi essencial para o andamento da presente pesquisa;

Agradeço de maneira grandiosa a minha mãe Sônia, meu irmão Sérgio, minha tia (Ana), meus filhos (Pedro e Alice), minha enteada (Emilly), meu sobrinho (Matheus) e meu esposo (Clássio) por todo carinho e compreensão;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

Resumo.....	ix
Abstract.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Características biológicas e morfológicas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	5
2.2. Vitelogênese e ovogênese em <i>A. aegypti</i>	9
2.3. Embriogênese em <i>Aedes aegypti</i>	11
2.4. Papel fisiológico da microbiota intestinal em insetos.....	12
2.4.1. Composição da microbiota intestinal em mosquitos.....	13
2.5. Ação dos antibióticos carbenicilina e tetraciclina em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	16
2.6. Doenças transmitidas pelo mosquito <i>Aedes aegypti</i>	19
2.6.1. Dengue.....	19
2.6.2. Chikungunya	20
2.6.3. Zika.....	21
2.7. Métodos utilizados para o controle de populações de mosquitos vetores.....	23
2.7.1. Inseticidas sintéticos.....	23

2.7.2. Controle alternativo.....	25
2.7.3 Inseticidas biológicos.....	27
2.8. Ação dos fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos.....	29
2.8.1. Uso de fungos entomopatogênicos para o controle de mosquitos.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Criação e manipulação dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	34
3.2. Cultivo de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	36
3.3. Alimentação dos mosquitos com sacarose + antibiótico.	37
3.4. Alimentação dos mosquitos com sangue.....	37
3.5. Manipulação dos mosquitos.....	38
3.6. Bioensaio 01 - Avaliação de diferentes concentrações de <i>M. anisopliae</i> contra fêmeas de <i>A. aegypti</i>	38
3.7. Bioensaio 02 - Virulência de <i>M. anisopliae</i> contra fêmeas de <i>A. aegypti</i> tratadas com antibiótico.....	39
3.8. Bioensaio 03 - Avaliação da sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> tratadas com fungo <i>M. anisopliae</i> a diferentes períodos após a oferta do antibiótico carbenicilina.....	40
3.9. Bioensaio 4 - Avaliação da influência da alimentação de sacarose + antibiótico carbenicilina no repasto sanguíneo de fêmeas de <i>A. aegypti</i>	41
3.10. Bioensaio 5 - Influência da infecção fúngica na oviposição de fêmeas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com sacarose ou com sacarose + antibiótico carbenicilina....	41
3.11. Bioensaio 6 - Viabilidade de ovos de <i>A. aegypti</i> oriundos de fêmeas alimentadas com sacarose ou com sacarose + antibiótico carbenicilina e infectadas com <i>M. anisopliae</i>	43
3.12. Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Bioensaio 01 - Avaliação de diferentes concentrações de <i>M. anisopliae</i> contra fêmeas de <i>A. aegypti</i>	45
4.2. Bioensaio 02 - Suscetibilidade de fêmeas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com sacarose ou sacarose + antibiótico ao fungo <i>M. anisopliae</i>	47
4.3. Bioensaio 03 - Sobrevivência de fêmeas de <i>A. aegypti</i> expostas ao fungo <i>M. anisopliae</i> em diferentes períodos após ingestão de dieta com carbenicilina.....	50

4.4. Bioensaio 4 - Avaliação da influência de alimentação de dietas com antibiótico no repasto sanguíneo de fêmeas de <i>A. aegypti</i>	55
4.5. Bioensaio 5 - Influência da infecção fúngica na oviposição de fêmeas de <i>A. aegypti</i> alimentadas apenas com sacarose ou sacarose + antibiótico carbenicilina.....	55
4.6. Bioensaio 6 - Viabilidade de ovos de <i>A. aegypti</i> oriundos de fêmeas alimentadas com sacarose ou com sacarose + antibiótico e infectadas com <i>M. anisopliae</i>	56
4.7. Bioensaio 6.1 - Avaliação de formação de pupas e emergência de adultos oriundos de ovos produzidos por fêmeas <i>A. aegypti</i> expostas aos diferentes tratamentos.....	57
5. DISCUSSÃO.....	60
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	68
7. BIBLIOGRAFIA	69

RESUMO

Ribeiro, J.P. D. Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio de 2022. A microbiota intestinal de *aedes aegypti* protege os insetos contra infecções por fungos entomopatogênicos. Orientador: Dr. Richard Ian Samuels. Coorientador: Dr. Adriano Rodrigues de Paula.

O mosquito *Aedes aegypti* possui grande importância médica por ser o principal vetor de uma gama de arboviroses. Estudos têm mostrado que bactérias presentes no intestino de mosquitos podem proteger o inseto contra patógenos invasores no trato alimentar. No entanto, pouco se sabe sobre as interações entre microbiota intestinal e fungos entomopatogênicos que infectam o inseto via penetração do tegumento. Esse estudo teve como objetivo verificar a influência da microbiota intestinal na sobrevivência e no desenvolvimento de fêmeas de *A. aegypti* infectadas com o fungo *Metarhizium anisopliae*. Para isso, diferentes concentrações de *M. anisopliae* contra fêmeas de *A. aegypti* foram avaliadas. Os antibióticos carbenicilina e tetraciclina, isolados ou em combinação, foram administrados aos mosquitos por três dias consecutivos, através de alimentação artificial, misturados com sacarose a 10%. Após a ingestão de antibiótico seguido de infecção fúngica, testes foram realizados para verificar a suscetibilidade de fêmeas do mosquito *A. aegypti* com ou sem microbiota ao fungo *M. anisopliae*. A sobrevivência de fêmeas *A. aegypti* tratadas com fungo a diferentes períodos após a oferta do antibiótico carbenicilina e, a influência da alimentação de sacarose + antibiótico carbenicilina no repasto sanguíneo de fêmeas de *A. aegypti* também

foram avaliadas. A infecção fúngica, nos diferentes testes, foi realizada via pulverização usando uma torre de Potter e, a sobrevivência das fêmeas foi avaliada por sete dias. Experimentos também foram realizados para se observar o efeito da infecção fúngica na viabilidade dos ovos e na formação de pupas e adultos oriundos de fêmeas alimentadas ou não com o antibiótico carbenicilina. O presente estudo foi realizado em condições controladas de laboratório. A concentração de *M. anisopliae* selecionada e utilizada na presente pesquisa foi de 1×10^6 conídios/mL. Obteve-se significativamente menor taxa de sobrevivência quando fêmeas foram alimentadas com antibiótico: carbenicilina + tetraciclina (0%), tetraciclina (16,7%) e carbenicilina (38,8%) e subsequentemente infectadas com o fungo, comparado com fêmeas alimentadas somente com sacarose e infectadas com fungo (65,6% de sobrevivência) ou controles (acima de 91% de sobrevivência). Os efeitos do tratamento com antibiótico não foram permanentes, uma vez que, a taxa de sobrevivência dos mosquitos alimentados com sacarose + antibiótico tornou-se igual à de mosquitos alimentados somente com sacarose em um período de nove dias após ingestão de carbenicilina. A taxa de fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico que ingeriram sangue (78,8%) foi significativamente igual à de fêmeas alimentadas somente com sacarose (87,7%). Fêmeas alimentadas somente com sacarose + sangue ou com sacarose + antibiótico carbenicilina + sangue e pulverizadas com Tween (TW) (controles) apresentaram média de oviposição acima de 81 ovos/fêmea. Foi observado no tratamento sacarose + sangue e infectadas com fungo, uma redução no número de ovos postos por fêmea (68,7 ovos/fêmea). Um declínio ainda maior foi verificado no tratamento sacarose + antibiótico carbenicilina + sangue e posteriormente infectadas com fungo (44,3 ovos/fêmea). Como efeito indireto, a viabilidade dos ovos resultantes de fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico carbenicilina + sangue foi reduzida resultando em uma menor taxa de eclosão larval (47,9%) do que fêmeas alimentadas somente com sacarose + sangue e infectadas com fungo (68,5% de eclosão larval) e controles (acima de 94,3% de eclosão larval). Das larvas oriundas de ovos de fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico carbenicilina + sangue e infectadas com fungo, 52,55% se desenvolveram em pupas, e destas todas emergiram em mosquitos adultos. Estes resultados indicam que a ingestão de

antibiótico por mosquitos *A. aegypti* aumenta a suscetibilidade do inseto ao fungo *M. anisopliae* reduzindo a taxa de sobrevivência do mosquito. A falta da microbiota intestinal pode ter um efeito negativo no desenvolvimento dos mosquitos que sobreviverem à exposição ao fungo. Alimentadores de sacarose + antibiótico poderão ser utilizados em armadilhas contendo fungo, aumentando a susceptibilidade do inseto ao entomopatógeno. Isso pode ser uma nova ferramenta para o controle biológico de *A. aegypti*.

Palavras-chave: Fungo, patógeno, virulência, bactéria, mosquito.

ABSTRACT

Ribeiro, J.P. D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. May, 2022. The intestinal microbiota of *Aedes aegypti* protects insects Against entomopathogenic fungal infections. Advisor: Prof. Richard Ian Samuels. Co-advisor: Adriano Rodrigues de Paula.

The *Aedes aegypti* mosquito has great medical importance as it is the main vector of a range of arboviruses. Studies have shown that bacteria present in the gut of mosquitoes can protect the insect against invading pathogens in the food tract. However, little is known about the interactions between intestinal microbiota and entomopathogenic fungi that infect the insect via penetration of the tegument. This study aimed to verify the influence of the intestinal microbiota on the survival and development of *A. aegypti* females infected with the fungus *Metarhizium anisopliae*. For this, different concentrations of *M. anisopliae* against females of *A. aegypti* were evaluated. The antibiotics carbenicillin and tetracycline, alone or in combination, were administered to the mosquitoes for three consecutive days, through artificial feeding, mixed with 10% sucrose. After antibiotic ingestion followed by fungal infection, tests were performed to verify the susceptibility of female *A. aegypti* mosquitoes with or without microbiota to the fungus *M. anisopliae*. The survival of *A. aegypti* females treated with the fungus at different periods after the offer of the antibiotic carbenicillin and the influence of sucrose + antibiotic carbenicillin feeding on the blood meal of *A. aegypti* females were also evaluated. The fungal infection, in the different tests, was carried out via spraying using a Potter tower and the survival of the females was evaluated for seven days. Experiments were also carried

out to observe the effect of fungal infection on the viability of eggs and on the formation of pupae and adults from females fed or not with the antibiotic carbenicillin. The present study was carried out under controlled laboratory conditions. The concentration of *M. anisopliae* selected and used in the present research was 1×10^6 conidia/mL. A significantly lower survival rate was obtained when females were fed with antibiotic: carbenicillin + tetracycline (0%), tetracycline (16,7%) and carbenicillin (38,8%) and subsequently infected with the fungus, compared to females fed only with sucrose and infected with fungus (65,6% survival) or controls (over 91% survival). The effects of antibiotic treatment were not permanent, as the survival rate of mosquitoes fed sucrose + antibiotic became equal to that of mosquitoes fed sucrose alone within nine days of ingestion of carbenicillin. The rate of females fed sucrose + antibiotic that ingested blood (78,8%) was significantly equal to that of females fed only with sucrose (87,7%). Females fed only with sucrose + blood or sucrose + carbenicillin antibiotic + blood and sprayed with Tween (TW) (controls) showed an average oviposition rate above 81 eggs/female. It was observed in the treatment sucrose + blood and infected with fungus, a reduction in the number of eggs laid per female (68,7 eggs/female). An even greater decline was verified in the treatment sucrose + carbenicillin antibiotic + blood and later infected with fungus (44,3 eggs/female). As an indirect effect, the viability of eggs resulting from females fed with sucrose + carbenicillin antibiotic + blood was reduced resulting in a lower rate of larval hatching (47,9%) than females fed only with sucrose + blood and infected with fungus (68,5% larval hatching) and controls (above 94,3% larval hatching). Of the larvae from eggs of females fed with sucrose + antibiotic carbenicillin + blood and infected with fungus, 52,55% developed into pupae, and all of these emerged into adult mosquitoes. These results indicate that antibiotic ingestion by *A. aegypti* mosquitoes increases the insect's susceptibility to the fungus *M. anisopliae*, reducing the mosquito survival rate. The lack of gut microbiota can have a negative effect on the development of mosquitoes that survive exposure to the fungus. Sucrose + antibiotic feeders can be used in traps containing fungus, increasing the susceptibility of the insect to the entomopathogen. This could be a new tool for the biological control of *A. aegypti*.

Keywords: fungus, pathogen, virulence, bacterium, mosquito.

1. INTRODUÇÃO

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor de vírus, causadores de importantes doenças humanas como dengue, febre amarela urbana, chikungunya e Zika, portanto é considerado um problema de saúde pública global (Ministério da Saúde, 2022). O sucesso vetorial deste inseto ocorre devido a capacidade de se alimentar de sangue, sua antropofilia, seus hábitos urbanos domésticos e alta eficiência na transmissão viral (Barata et al., 2001). Inúmeros fatores têm contribuído para dificultar o controle do mosquito *A. aegypti*, tais como: mudanças climáticas, urbanização descontrolada, expansão do comércio internacional e dispersão da população através de viagens (Monath, 2001; Lounibos, 2002).

Desde o começo do século XX, os inseticidas químicos são utilizados para reduzir populações de *A. aegypti*, porém, apresentam efeitos tóxicos ao homem e selecionam populações de mosquitos resistentes. A resistência deste inseto aos inseticidas sintéticos organofosforados e piretroides foi mostrada em vários estudos (Macoris et al., 2003; Montella et al., 2007; Lima et al., 2011, Nakazato et al., 2021).

Na busca por métodos alternativos aos inseticidas sintéticos, o controle biológico tem potencial para redução de populações de insetos vetores. Ele é seguro à saúde humana e ao meio ambiente ao compará-lo aos inseticidas químicos (Bale et al., 2008). Isolados de vírus, bactérias e fungos entomopatogênicos têm sido verificados como altamente virulentos contra insetos vetores de doenças (Becnel et al., 2001; Pereira et al. 2009; Costa et al., 2010). Uma alternativa que vem sendo utilizada para redução de populações do mosquito *A. aegypti* é o *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), um bacilo com potente ação

larvicida, por sua produção de endotoxinas proteicas (Ritchie et al., 2010). Contudo, apesar de o Bti ser eficaz na redução do número de mosquitos do gênero *Aedes*, essa bactéria precisa ser ingerida para matar o inseto alvo, portanto, Bti é ineficaz para o controle de ovos, pupas e o estágio adulto (Lacey et al., 2007; Pigott e Ellar, 2007; Ahmad Zaki et al., 2020).

Os fungos entomopatogênicos são potenciais candidatos para o controle de mosquitos (Gomes et al., 2015; Imad-Silva et al., 2017; Bitencourt et al., 2021). Eles apresentam vantagens em relação às toxinas bacterianas, visto que, acarretam infecção via penetração no tegumento, não necessitando ser ingeridos pelos insetos para que a infecção ocorra (Costa et al., 2010, Samuels et al., 2016).

Os fungos também podem causar infecção via ingestão, no entanto, normalmente infectam o hospedeiro via tegumento (Alves e Pereira, 1998). Por essa característica, os fungos são capazes de infectar todas as fases de desenvolvimento de insetos (Alves e Pereira, 1998). O controle de todos os estágios do ciclo de vida do mosquito é importante para reduzir o número de adultos que transmitem doenças para a população humana (Zara et al., 2016).

Pesquisas têm mostrado que fungos entomopatogênicos apresentam atividade ovicida em mosquitos. Luz et al. (2007) verificaram que os fungos dos gêneros *Paecilomyces*, *Isaria*, *Penicillium* e *Metarhizium* foram eficientes contra ovos de *A. aegypti*, diminuindo significativamente a taxa de eclosão larval. Albernaz et al. (2009) observaram que o fungo *M. anisopliae* formulado em óleo vegetal foi altamente virulento contra ovos de *A. aegypti* em umidade relativa (UR) maior que 98%. Estudos em ovos de *Aedes sp.* infectados com conídios de *M. anisopliae* formulados em Tween apresentaram menor taxa de eclosão de larvas comparado com controles em 95% UR (Ribeiro et al., 2018).

Os fungos *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* também são altamente virulentos contra larvas de *A. aegypti* (Silva et al., 2004; Pereira et al., 2009, Gomes et al., 2015; Carolino et al., 2021, Bitencourt et al., 2021) e contra larvas de *Anopheles* (Bukhari et al., 2010). Um estudo recente demonstrou a virulência do fungo *M. anisopliae* contra pupas de *A. aegypti* quando aplicado na forma de blastosporos, reduzindo significativamente a taxa de sobrevivência (Carolino et al., 2019).

Vários trabalhos também foram realizados em mosquitos adultos e demonstraram que os fungos entomopatogênicos são altamente virulentos contra essa fase de desenvolvimento (Scholte et al., 2006, Mnyone et al., 2011; Paula et al., 2011; 2013; 2019; 2021; Imad-Silva, 2015; 2017; Samuels, et al., 2016).

Em ensaios realizados em laboratório, fêmeas de *Anopheles gambiae* (Mnyone et al., 2011) e de *A. aegypti* (Paula et al., 2011) alimentadas com sacarose foram mais suscetíveis ao fungo *M. anisopliae* que fêmeas alimentadas com sangue, sugerindo que o estado nutricional pode influenciar na suscetibilidade do mosquito ao fungo. Paula et al. (2013) observaram que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue só foram suscetíveis ao fungo *M. anisopliae* 96h após a digestão sanguínea.

Outro estudo verificou que *M. anisopliae* reduziu a fecundidade em *An. gambiae* (Scholte et al., 2006). A infecção por *B. bassiana* diminuiu o repasto sanguíneo de fêmeas do gênero *Anopheles* e prejudicou a maturação do protozoário *Plasmodium chaboudi* (Blanford et al., 2005). Estes fungos também foram virulentos contra fêmeas de *A. aegypti* reduzindo o repasto sanguíneo e a sobrevivência do mosquito (Darbro, et al., 2012; Paula et al., 2013; 2021).

Um fator a ser considerado no controle microbiano de insetos é a interação entre a microbiota intestinal e a infecção por fungos entomopatogênicos (Wei et al., 2017). Em insetos, existe uma ampla variedade de espécies bacterianas (Dillon e Dillon, 2004) que desempenham papéis importantes na fisiologia do hospedeiro, por exemplo, auxiliar no processo de digestão sanguínea e fecundidade (Gaio et al., 2011), no sistema de defesa do inseto contra inimigos naturais (Dale e Moran, 2006) e na interação com agentes patogênicos, aumentando (Wei et al., 2017) ou diminuindo (Zhang et al., 2018) a susceptibilidade dos insetos.

Em estudo realizado usando fêmeas de *Anopheles stephensi*, foi verificado que a remoção da microbiota intestinal com antibióticos tornou os mosquitos menos susceptíveis à infecção por *B. bassiana* (Wei et al., 2017). Ao contrário, na barata *Blattella germanica* a remoção das bactérias intestinais facilitou a infecção dos entomopatógenos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Zhang et al., 2018).

O presente estudo teve como objetivo verificar a influência da microbiota intestinal na sobrevivência e no desenvolvimento de fêmeas de *A. aegypti* infectadas com o fungo *Metarhizium anisopliae*. A redução da microbiota intestinal

através da ingestão de antibiótico, seguido de infecção fúngica, poderia auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle de *A. aegypti*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Características biológicas e morfológicas do mosquito *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti* (Diptera Culicidae) (Linnaeus) pertence à família Culicidae e é originário do Egito (Tauil, 2002). Este inseto encontra-se distribuído por quase todo o mundo, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais (AgênciaBrasil, 2015). O mosquito está bem adaptado a zonas urbanas, mais precisamente ao domicílio humano, onde consegue reproduzir-se e pôr os seus ovos em pequenas quantidades em recipientes contendo água, que preferivelmente estejam sombreados e no peridomicílio (Neves, 2004).

Este inseto é o agente transmissor de vários vírus causadores de doenças. Três dessas viroses (dengue, febre amarela urbana e Zika), são causadas por vírus do gênero *Flavivirus*, Família Flaviridae (Sim e Dimopoulos, 2010). Já a doença chikungunya é causada por um vírus do gênero *Alphavirus* pertencente à família Togaviridae (Murphy et al., 1995).

O mosquito *A. aegypti* é um inseto holometabólico, ou seja, desenvolve-se através de metamorfose completa (Santos, 2022). O adulto é escuro, possuindo faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais, e um desenho em forma de lira no mesonoto (FUNASA, 2001). Fêmeas de *A. aegypti*, assim como os machos, se alimentam de substâncias açucaradas, no entanto, as fêmeas necessitam ingerir sangue de vertebrados para o desenvolvimento do processo reprodutivo (Edman, 1992). Do sangue provêm aminoácidos essenciais que irão contribuir para a síntese

de vitelo (vitelogênese) e conseqüentemente, a formação dos ovos (ovogênese) (Harrington et al., 2001; Grimes, 1980). O repasto sanguíneo pode também contribuir para aumentar a longevidade das fêmeas (Consoli e Oliveira, 1994; Tauil, 2001).

O controle deste inseto é difícil, por ser muito versátil na escolha dos locais onde deposita seus ovos, que são extremamente resistentes à dessecação, podendo sobreviver por vários meses, até que a chegada de água propicie a eclosão das larvas. Uma vez imersos, as larvas eclodem dos ovos, e dão origem às pupas, das quais surge o inseto adulto (Consoli e Oliveira, 1994) (Figura 1).

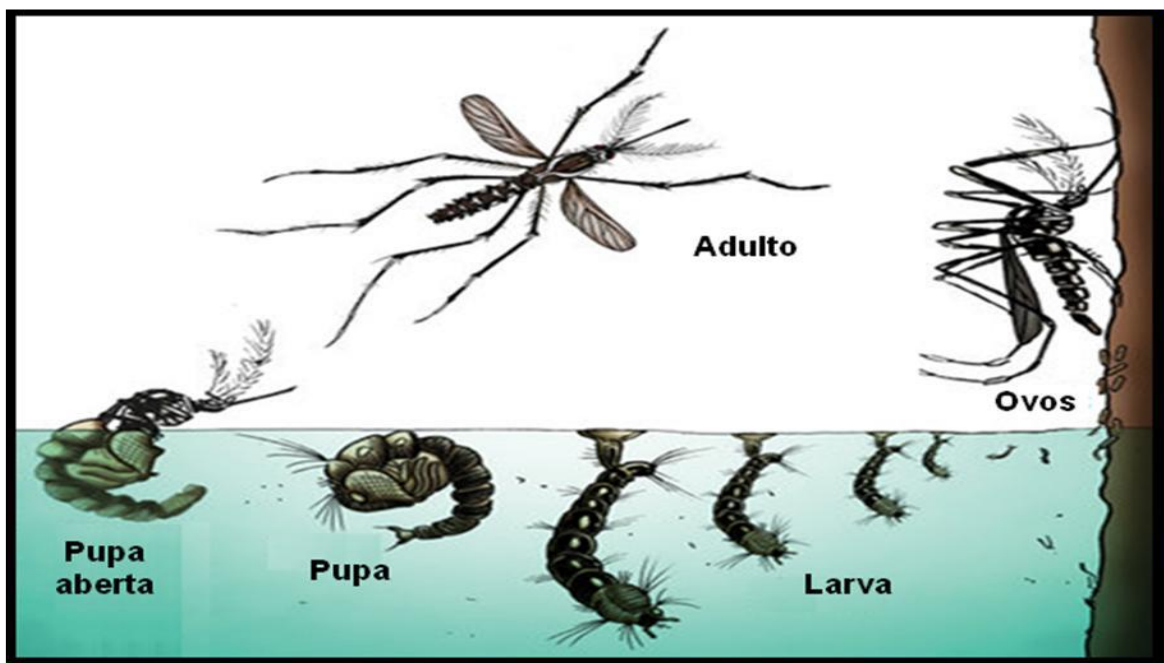


Figura 1. Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*. Adaptado de Esper (2016).

O tubo digestivo dos mosquitos é formado por uma camada de células epiteliais e é dividido em três regiões: intestino anterior, médio e posterior. Ele se inicia na boca (região anterior) e se estende até o ânus (região posterior) (Consoli e Oliveira, 1994), conforme esquematizado na Figura 2.

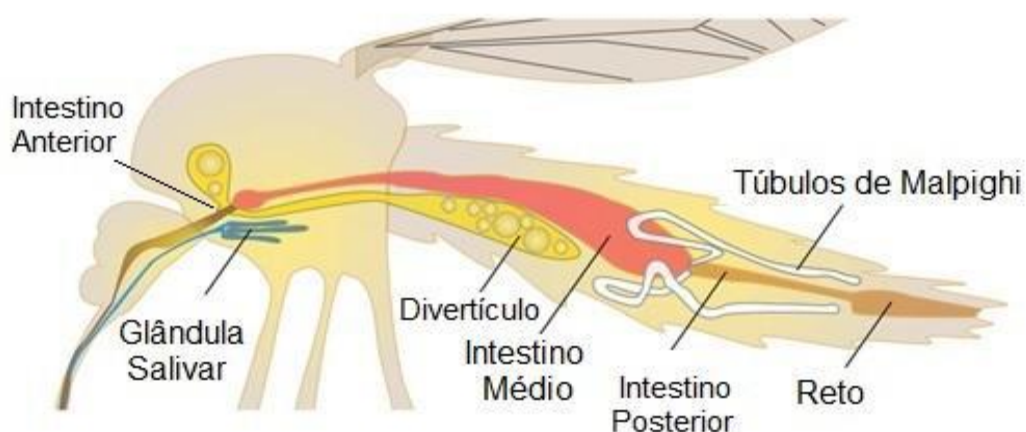


Figura 2 - Tubo digestório do mosquito *Aedes aegypti*. Adaptado de Hine et al. (2014).

O intestino anterior está envolvido principalmente com a ingestão, condução e armazenamento de alimentos. É formado pelas bombas cibarial e faringiana, (êmbolos de sucção), pelo esôfago, pelos divertículos dorsais e ventral, que reservam carboidratos e pela válvula de estomodel, que direciona carboidrato e sangue ingeridos pela fêmea. Em sua parte anterior, encontra-se a probóscide, um aparelho bucal perfurante usado para alimentação (Consoli e Oliveira, 1994).

Durante a ingestão de sangue, a válvula estomodel abre-se e o sangue é encaminhado e armazenado no intestino médio; no entanto, na ingestão de alimentos ricos em açúcares, esta válvula permanece fechada e o alimento é encaminhado para o divertículo ventral, onde ocorre a digestão inicial através de enzimas da glândula salivar. Em seguida, estes açúcares são liberados gradativamente para o intestino médio, onde sua digestão é finalizada. Esse mecanismo da válvula de estomodel, proporciona à fêmea, a capacidade para manter o intestino médio vazio e pronto para receber o repasto sanguíneo (Thompson 1905, Romoser, 1996; Consoli e Oliveira, 1994).

O intestino médio, é a parte do tubo intestinal, que consiste no sítio da digestão do sangue em mosquitos, um processo que dá início a eventos fisiológicos importantes, tais como a vitelogênese e a reprodução. Ele se constitui em um tubo simples (ventrículo), altamente elástico e revestido internamente por um epitélio colunar de borda estriada, adaptado à secreção e absorção. É considerado o

principal sítio de interação entre o inseto e os patógenos que ele transmite (Consoli e Oliveira, 1994; Silva et al., 2012).

Na parte posterior do intestino médio localiza-se um esfíncter, a válvula pilórica, após a qual ligam-se os túbulos de Malpighi, envolvidos na excreção. Esses túbulos, se localizam no limite entre a porção média e a porção posterior do intestino. Cada túbulo possui fundo cego e se insere nas lacunas do corpo, de onde retiram as impurezas e as descarregam no intestino posterior para serem eliminadas com as fezes. O alimento não digerido no intestino médio é direcionado para o intestino posterior que reabsorve seletivamente água, alguns íons e aminoácidos, produzindo uma urina hiper ou hiposmótica, que é secretada junto ao bolo fecal (Phillips et al., 1986; Klowden, 2013).

Durante o processo de ingestão de sangue, forma-se no tubo intestinal, uma camada de material acelular, quitinoso, secretado pelas células do epitélio digestivo, e que constitui a matriz ou membrana peritrófica (MP). Essa membrana separa o sangue ingerido das células do epitélio intestinal, formando dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (localizado dentro da MP) e o espaço ectoperitrófico (espaço fora da MP) (Consoli e Oliveira, 1994, Silva et al., 2012) (Figura 3).

Essa membrana é permeável às enzimas proteolíticas secretadas pelas células intestinais e também aos produtos da digestão. Quando a digestão se aproxima do seu final, a membrana é degradada e eliminada do organismo juntamente com as fezes (Billingsley e Lehane, 1996).

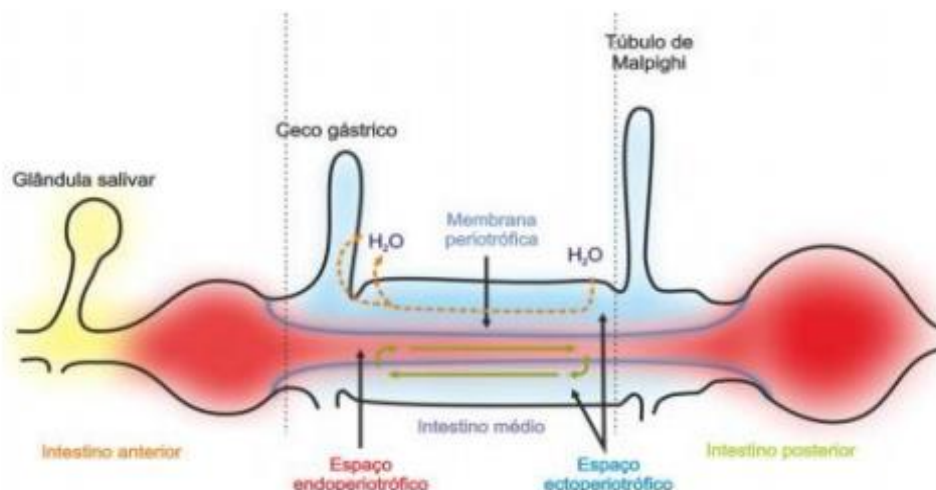


Figura 3 - Representação da membrana peritrófica no tubo intestinal de insetos.
Adaptado de Silva et al. (2012).

2.2. Vitelogênese e ovogênese em *A. aegypti*

O processo de vitelogênese (produção e acúmulo de substâncias de reserva nutritiva, essenciais ao desenvolvimento dos embriões), no mosquito *A. aegypti* pode ser dividido em duas fases: pré-vitelogênica e vitelogênica. A fase pré-vitelogênica, ocorre nos três primeiros dias após a emergência das fêmeas adultas, onde o corpo gorduroso e os ovários são amadurecidos pela atuação do hormônio juvenil III (JHIII). Somente após esses três dias (72 h), a fêmea se encontra apta a realizar a ingestão sanguínea, podendo dar início à fase vitelogênica. Contudo, em caso de impossibilidade de ingestão sanguínea, a fêmea pode entrar em um estado de espera até que ela consiga se alimentar com sangue e iniciar o período vitelogênico (Attardo et al., 2005; Attardo e D'Amico, 2011).

Durante a alimentação sanguínea, uma fêmea de *A. aegypti* pode ingerir uma quantidade de sangue, de 3 a 5 vezes o seu peso corpóreo (Alvarenga, 2005). A digestão do sangue, resulta na liberação de peptídeos e aminoácidos no lúmen intestinal dos mosquitos (Pascoa et al., 2002). Estes nutrientes, são necessários para a vitelogênese, atuando como sinalizadores para o cérebro e para o corpo gorduroso dos mosquitos, o qual está envolvido em diversos processos metabólicos (Hansen et al, 2004; Raikhel et al., 2002). Neste tecido, a ecdisona é convertida em 20 – hidroxiecdisona, que então, ativa a expressão de genes que codificam as principais proteínas precursoras de vitelo (vitelogenina, carboxipeptidase

vitelogenina, catepsina B vitelogenina e Lipoforina) (Raikhel et al., 2002) (Figura 4). Essas proteínas, são secretadas na hemolinfa e, em seguida, são incorporadas nos ovócitos em desenvolvimento (Raikhel et al., 2002; Attardo e D'Amico, 2011), como esquematizado na Figura 4.

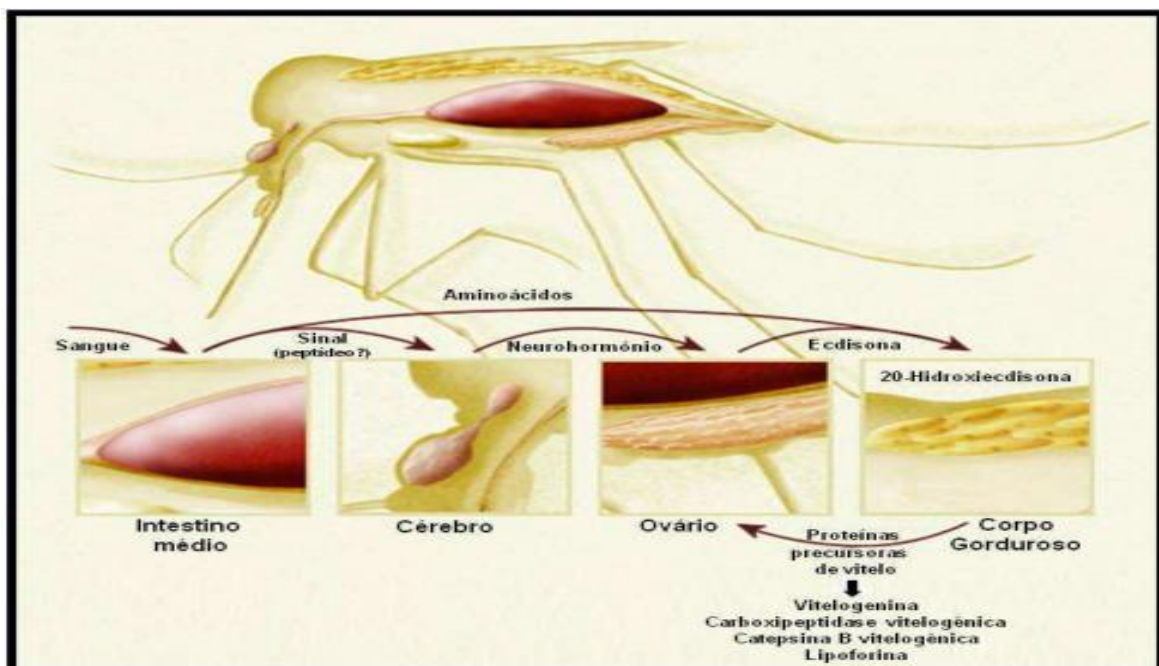


Figura 4 - Vitelogênese em *Aedes aegypti* - Após a ingestão de sangue, o cérebro do mosquito recebe um sinal para secretar um neuro-hormônio que estimula os ovários a produzirem ecdisona. Este hormônio, ao penetrar no corpo gorduroso, é convertido em 20 – hidroxiecdisona que ativa a expressão de genes que codificam proteínas precursoras de vitelo. Aminoácidos livres resultantes da digestão sanguínea, também são necessários para ativar o corpo gorduroso na síntese de proteínas precursoras de vitelo. Adaptado de Attardo e D'Amico (2011).

O ciclo gonotrófico é finalizado 72 horas após alimentação sanguínea, momento em que as fêmeas se encontram aptas para a postura de ovos (Raikhel, 2002; Attardo et al., 2005, Attardo e D'Amico, 2011).

As fêmeas de *A. aegypti* podem depositar centenas de ovos ao final do ciclo gonadotrófico (Clements, 1922). A alta capacidade reprodutiva desta espécie resulta na dificuldade de controlar populações deste mosquito. A utilização de

métodos de controle biológico, que possam, direta ou indiretamente afetar a fase de ovogênese deste inseto, constitui um ponto interessante para elaboração de novos métodos de controle do mosquito *A. aegypti*.

2.3. Embriogênese em *Aedes aegypti*

Em mosquitos, as formas adultas são dioicas (sexos separados), e só estão prontas para realizar a cópula após o endurecimento do tegumento corporal e, no caso dos machos, após o giro de 180° da genitália externa, que ocorre 24 horas depois da emergência (Forattini et al, 2002). Após a cópula, os espermatozoides ficam armazenados em uma estrutura denominada espermateca, no interior do corpo da fêmea. Esses gametas saem desse reservatório e realizam a fecundação, no momento em que os ovócitos são liberados para oviposição. Assim, o ovo é fecundado, imediatamente antes da postura, e a oviposição é considerada o momento do início da embriogênese (Chapman, 1998).

Uma vez depositados no ambiente, os ovos dos mosquitos se desenvolvem sem necessidade de proteção materna (Gilbert e Raunio et al., 1997; Zeh et al., 1989). Dependendo do gênero, os ovos podem ser depositados em locais úmidos, bem próximo da linha d'água (gênero *Aedes*) ou diretamente sobre a superfície da água (gêneros *Culex* e *Anopheles*, por exemplo) (Clements et al., 1992). A duração da embriogênese no mosquito *A. aegypti*, depende da temperatura em que os ovos se desenvolvem. Quando mantidos úmidos a 25°C, os embriões completam seu desenvolvimento com 77,4 horas, e, a 28°C se desenvolvem em 61,6 a 62 horas (Farnesi et al., 2009, Vital et al., 2010).

A eclosão das larvas acontece imediatamente após a finalização da embriogênese, desde que, se encontrem em ambiente favorável ao desenvolvimento. Contudo, se o ovo estiver em ambiente desfavorável, o embrião entra em dormência e pode permanecer viável por mais de 12 meses (Silva e Silva et al., 1999). Esta viabilidade é possível devido à aquisição de resistência embrionária à dessecação, um mecanismo biológico que se acredita envolver a formação e maturação da cutícula serosa, uma camada que cobre o embrião (Rezende, et al., 2008).

2.4. Papel fisiológico da microbiota intestinal em insetos

Os insetos são hospedeiros de uma vasta multiplicidade de microrganismos, os quais podem colonizar, crescer e se reproduzir, principalmente, no sistema reprodutivo e no trato digestivo. Esta colonização, de um modo geral, confere benefícios ao hospedeiro, ocorrendo assim uma relação mutualista (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Estes microrganismos podem influenciar a fisiologia dos insetos, contribuindo para a digestão, nutrição, desenvolvimento, reprodução, imunidade, comportamento e resistência a colonização por patógenos (Lilburn et al., 2001; Lemke et al., 2003; Dillon e Dillon, 2004, Zhang et al., 2018).

A mosca tsé-tsé (Hill e Campbell, 1973) e os triatomíneos (Yassin, 2005) são colonizados por bactérias importantes em seu ciclo de vida, sendo por isso, consideradas simbioses obrigatórias. A presença dessas bactérias é essencial para a maturação sexual desses insetos (Nogge, 1976). Os triatomíneos abrigam em seu intestino a bactéria *Rhodococcus rhodnii*, que produz os nutrientes necessários para complementar a dieta sanguínea (Yassin, 2005), rica em proteínas e aminoácidos essenciais, porém deficiente em carboidratos, lipídios e vitaminas do complexo B (Ribeiro, 1996). A mosca tsé-tsé abriga simbioses intracelulares com funções similares às do triatomíneo, ou seja, complementar uma dieta carente de alguns nutrientes (Hill e Campbell, 1973; Nogge, 1976).

Bactérias do gênero *Asaia* têm sido descritas como simbioses em *A. stephensi* (Flavia et al., 2007) e em *A. aegypti* (Crotti et al., 2009). Estas bactérias são importantes para esses insetos, pois, colonizam o intestino e outros tecidos e são transmitidas verticalmente (Crotti et al., 2009; Flavia et al., 2007). Algumas possíveis atividades biológicas importantes para mosquitos, como detoxificação de inseticidas, metabolismo de nitrogênio e regulação do pH intestinal, já foram descritas para *Asaia sp.* (Song et al., 2022).

Bactérias residentes intestinais de mosquitos podem ter um importante papel na epidemiologia de doenças infecciosas humanas, uma vez que podem interferir com o desenvolvimento de patógenos importantes. Bactérias gram-negativas do trato digestivo de *Anopheles*, reduzem, a transmissão da malária (Seitz et al., 1987; Beier et al., 1994; Dong et al., 2009). A remoção da microbiota intestinal com antibióticos em *Aedes* torna o mosquito mais suscetível à infecção pelo vírus da dengue (Xi et al., 2008).

Segundo Gaio et al. (2011), a redução de bactérias do intestino médio em *A. aegypti* afeta a digestão do sangue, reduzindo a disponibilidade de proteínas aos mosquitos, isso ocorre, devido a uma lise mais lenta das hemácias, afetando a fecundidade do mosquito.

Algumas bactérias específicas têm sido correlacionadas com um efeito direto na diminuição da infecção por patógenos, reduzindo a competência vetorial de mosquitos. É o caso da *Enterobacter sp.* (*Esp_Z*) em *An. gambiae* (Cirimotich et al., 2011) e da *Chromobacterium* (*Csp_P*) em *A. aegypti* (Ramirez et al., 2014), que reduzem significativamente a suscetibilidade às infecções por *Plasmodium falciparum* e DENV, respectivamente. Entretanto, pesquisas recentes mostraram que bactérias intestinais também podem promover ou auxiliar a infecção de agentes patogênicos (Narasimhan et al. 2014).

Uma bactéria encontrada no intestino médio, *Serratia odorifera*, aumenta a infecção por vírus da dengue no mosquito *A. aegypti* (Apte-Deshpande et al., 2012) e pelo protozoário causador da malária em mosquitos *Anopheles* (Pei et al., 2015). A interação entre o fungo entomopatogênico *B. bassiana* e a microbiota intestinal acelera a morte do mosquito *A. stephensi* (Wei et al., 2017). A infecção por *B. bassiana* regulou negativamente as respostas imunológicas do intestino do mosquito, pela ação da toxina oosporina produzida pelo fungo, causando disbiose (desequilíbrio) da microbiota intestinal e translocação da bactéria *Serratia marcescens* do intestino para a hemocele 96 horas após infecção fúngica, onde se transformaram de simbiontes intestinais assintomáticos para patógenos hemoceléticos causando a morte acelerada do mosquito pela interação fungo-bactéria (Wei et al., 2017).

Em contrapartida, Zhang et al., (2018) verificaram que a microbiota intestinal da barata alemã *Blattella germanica* pode desempenhar um papel crucial na proteção das baratas contra o fungo *M. anisopliae*. Eles verificaram que a mortalidade das baratas com bactérias intestinais foi menor que a das baratas sem bactérias (Zhang et al., 2018).

2.4.1. Composição da microbiota intestinal em mosquitos

A composição da microbiota em insetos depende de alguns fatores, como o sexo, o estágio de desenvolvimento e o ambiente de interação (Minard et al.,

2013). No intestino, as condições fisiológicas e químicas dos seus compartimentos e os recursos disponíveis para aquisição por bactérias também são fatores importantes (Engel e Moran 2013).

O hábito de alimentação sanguínea por mosquitos fêmeas, por si só, já é um fator que diferencia a microbiota presente no intestino de mosquitos machos e fêmeas. Durante o processo de digestão sanguínea, a microbiota intestinal de mosquitos passa por mudanças acentuadas, com a redução da diversidade e aumento da carga bacteriana (Gusmão et al., 2010; Wang et al., 2011; Coon et al., 2014).

A formação da MP durante a digestão sanguínea, limita algumas famílias bacterianas específicas no espaço ectoperitrófico, devido à afinidade destas bactérias com a MP ou com as células epiteliais do intestino. No final do processo de digestão sanguínea a MP vai sendo eliminada do inseto, levando junto a maior parte das bactérias, responsáveis pela diversidade no ambiente intestinal (Rodgers et al., 2017).

De acordo com Lindh et al., (2008), bactérias são adquiridas principalmente nos ambientes aquáticos em que as larvas dos mosquitos se alimentam e se desenvolvem. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos específicos de aquisição destes micro-organismos, fatores que selecionem bactérias específicas e se há transmissão delas para as próximas fases de desenvolvimentos dos mosquitos.

Pesquisas demonstram que larvas de mosquitos nascem desprovidas de qualquer colonização bacteriana em seus intestinos, o qual é imediatamente colonizado por bactérias presentes no criadouro (Merritt et al., 1992; Coon et al., 2014, Coon et al., 2016b).

Em trabalho realizado por Coon et al. (2016b) foram encontradas similaridades no microbioma intestinal de larvas de diferentes espécies desenvolvidas no mesmo criadouro, assim como foram verificadas diferenças no microbioma entre larvas de mesma espécie, mas desenvolvidas em criadouros diferentes (Coon et al., 2016b).

Em estudo realizado por Crotti et al., (2009) foi demonstrado que bactérias do gênero *Asaia* foram transmitidas da fêmea para a prole (transmissão vertical), em mosquitos *Anopheles*. Estudos verificaram a transmissão de bactérias

intestinais entre estádios larvais (transestadial) (Briones et al., 2008; Damiani et al., 2010; Coon et al., 2014) e horizontal (Flavia et al., 2007) em mosquitos. No entanto, ainda são poucas as evidências destes fenômenos, bem como a explicação fisiológica de como eles ocorrem.

Estudos vêm confirmando, que a microbiota intestinal do mosquito *A. aegypti* é composta por uma grande variedade de bactérias (Gusmão et al., 2010; Zouache et al., 2011, David et al., 2016). Os principais gêneros bacterianos identificados por Gusmão et al. (2010) em mosquitos *A. aegypti* adultos da linhagem Rockefeller foram: *Serratia*, *Klebsiella*, *Asaia*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Kluveray* e *Pantoea*. *Serratia* foi dominante em todos os ensaios de isolamento, representando 54,5% do total de microrganismos. Esta pesquisa identificou também dois gêneros de leveduras no intestino médio de *A. aegypti*, *Pichia* e *Cândida*.

Em estudo realizado em mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus selvagens*, coletados em três regiões geográficas distintas de Madagascar, Zouache et al., (2011), identificaram Proteobacteria e Firmicutes como os principais filos encontrados. Os gêneros bacterianos predominantes foram: *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium* e *Enterobacter*. Esse estudo mostrou que a diversidade bacteriana diferiu significativamente por habitat, enquanto a uniformidade foi similar.

Em pesquisa realizada por David et al. (2016), em *A. aegypti* de campo e de laboratório, os gêneros predominantemente identificados foram: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* e *Stenotrophomonas*. Houve evidências de uma microbiota estável ao longo da vida do mosquito adulto, visto que, a maioria dos grupos bacterianos identificados foram detectados tanto no intestino médio de *A. aegypti* de populações de laboratório quanto de selvagens. Esse estudo mostrou também que tanto o regime alimentar quanto a idade estavam associados à abundância de alguns grupos bacterianos no intestino médio do mosquito.

A composição, dinâmica e diversidade das bactérias do intestino médio do mosquito *A. stefensi*, infectado e não infectado pelo fungo *B. bassiana*, em diferentes tempos (0, 12, 36, 60 e 84 horas) após infecção, foram avaliadas (Wei et al., 2017). Esta pesquisa verificou que, antes da infecção, as bactérias do intestino médio, do mosquito, eram diversas e predominavam bactérias de seis filos: Proteobactéria, Firmicutes, Actinobactéria, Bacterioidetes, Fusobactéria e

Cyanobactéria. A abundância de Proteobactéria e Firmicutes mudou dinamicamente ao longo do tempo de infecção, possivelmente por causa de mudanças na fisiologia do mosquito causadas pelo fungo. Os filos Proteobactéria (*Acinetobacter*, *Photobacterium* e *Asaia*), Firmicutes (*Streptococcus*) e Actinobactéria (*Rhodococcus*) aumentaram em abundância ao longo do tempo nos mosquitos não infectados (Wei et al., 2017).

Por outro lado, a infecção fúngica diminuiu a diversidade e aumentou a carga bacteriana em comparação com mosquitos não infectados. Foi observado que, 36h após infecção, o único filo que predominou em mosquitos infectados com *B. bassiana* foi Proteobactéria, resultando em colonização quase exclusiva por três gêneros: *Acinetobacter*, *Serratia* e *Asaia*. *Serratia* aumentou significativamente nos mosquitos infectados pelo fungo. Esse gênero não foi dominante em mosquitos não infectados. Estes resultados sugerem que a infecção fúngica pode alterar a composição e diversidade bacteriana do intestino médio de mosquitos (Wei et al., 2017).

Apesar da ampliação dos estudos relativos aos mosquitos vetores nos últimos anos, muitas questões fundamentais referentes ao aspecto da interação microbiota-inseto-patógenos permanecem, ainda, sem resposta. A interferência na microbiota intestinal de *A. aegypti* pela ingestão de antibiótico, antes da infecção fúngica, poderia potencializar a ação do entomopatógeno na sobrevivência do mosquito, e auxiliar no entendimento das interações deste vetor com sua microbiota e com infecção por patógenos fúngicos.

2.5 Ação dos antibióticos carbenicilina e tetraciclina em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Antibióticos são produtos naturais ou sintéticos que atuam matando ou impedindo o desenvolvimento de bactérias (Walsh, 2003). Os antibióticos ativos sobre bactérias (antibacterianos) podem ser classificados em dois grupos: Bactericidas e bacteriostáticos, utilizando-se como critério a sua forma de ação. Bactericidas, são aqueles que causam alta taxa de mortalidade das bactérias e bacteriostáticos são responsáveis por impedir o crescimento microbiano, ou seja,

manter as bactérias na fase estacionária de crescimento (Pankey e Sabath, 2004; Guimarães et al., 2010).

Os mecanismos de ação dos antibióticos são variados, podendo ser citados: a inibição da biossíntese de ácidos nucleicos (RNA e DNA); a inibição da síntese de proteínas, a inibição na biossíntese da parede celular, a interferência na permeabilidade da membrana citoplasmática, a inibição da síntese do ácido folínico, entre outros (Suaréz e Gudíol, 2009). A penicilina, por exemplo, é um antibiótico de atividade bactericida que apresenta como mecanismo de ação, o bloqueio do sítio ativo da enzima transpeptidase. Esta, é utilizada por bactérias na produção de suas paredes celulares (Walsh, 2003; Suaréz e Gudíol, 2009). O bloqueio dessa enzima inibe a síntese da parede celular, provocando a morte da bactéria (Walsh, 2003; Suaréz e Gudíol, 2009).

A classe das penicilinas é constituída por antimicrobianos que apresentam um amplo espectro de atividade antibacteriana e excelente perfil de segurança, uma vez que atuam na enzima transpeptidase, única em bactérias (Guimarães et al., 2010).

Um outro exemplo de mecanismo de ação antibiótica pode ser verificado na tetraciclina. Este antimicrobiano constitui uma classe de antibióticos (tetraciclina) (Sanar, 2022). As tetraciclina, apresentam atividade bacteriostática, sendo capaz de inibir a síntese de proteínas através da ligação com a subunidade 30S dos ribossomos, impedindo a ligação do RNA transportador. Conseqüentemente, a adição de novos aminoácidos para o crescimento da cadeia proteica é bloqueada, inibindo a replicação da bactéria (Pupo et al., 2006, Nussbaum et al., 2006).

A utilização de antibióticos para reduzir bactérias intestinais em mosquito *A. aegypti* fêmeas, foi investigada por Gaio et al. (2011). Neste estudo, a administração oral de diferentes antibióticos, (carbenicilina, tetraciclina, espectinomicina, gentamicina e canamicina) mostrou uma alta eficiência dos antibióticos carbenicilina e tetraciclina em reduzir a microbiota intestinal do *A. aegypti*. Tratamentos com tetraciclina ou carbenicilina reduziram 93% e 97% o número de bactérias viáveis no intestino médio do mosquito, respectivamente. Quando o coquetel de antibióticos foi administrado aos mosquitos, ocorreu uma redução de cerca de 99% das bactérias do intestino médio, resultado semelhante

aos tratamentos usando carbenicilina ou tetraciclina isoladamente (Gaio et al., 2011).

No presente estudo foram utilizados dois antibióticos: carbenicilina e tetraciclina. O antimicrobiano carbenicilina, é um fármaco de largo espectro bactericida. Ele pertence à classe das penicilinas, e mostra-se, altamente efetivo contra bactérias gram-negativas, especialmente dos gêneros: *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Proteus*. Contudo, não é muito eficaz contra as bactérias gram-positivas (Santana, 2012; Katzung, 2014).

As tetraciclinas, por sua vez, apresentam um amplo espectro antimicrobiano. Estas, são bastante eficazes frente a diversas bactérias aeróbicas e anaeróbicas Gram-positivas e Gram-negativas e, também, contra alguns protozoários (Patrick, 2005; Wright et al., 2003, Tavares 1996). As tetraciclinas recebem essa denominação devido à sua estrutura química, formada por quatro anéis (DrugBank, 2021) (Figura 5).

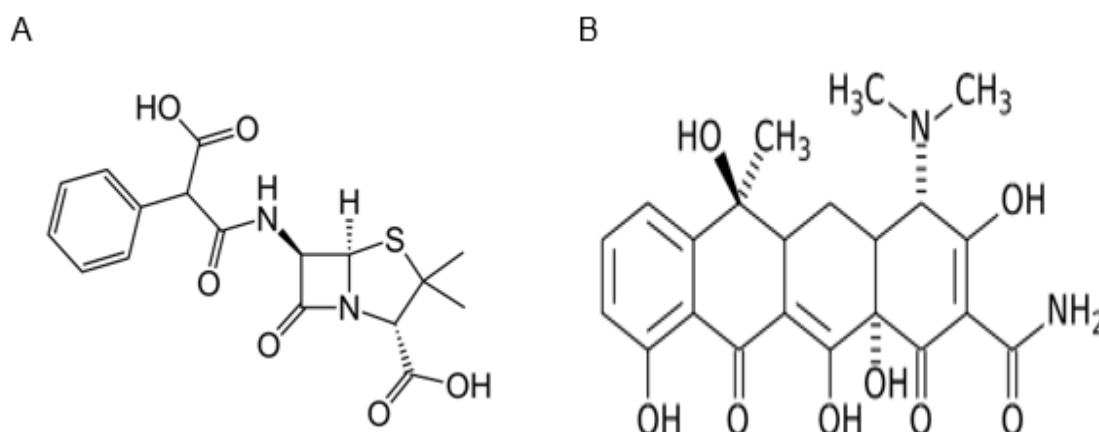


Figura 5 - Estrutura dos antibióticos carbenicilina e tetraciclina: A - Carbenicilina; B - Tetraciclina. Adaptado de DrugBank, (2021).

2.6. Doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*

2.6.1. Dengue

A dengue é uma arbovirose reemergente que vem se constituindo em importante problema de saúde pública no mundo, (Claro, 2004). Conheciam-se quatro sorotipos distintos do agente etiológico do vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), que podem se apresentar como: dengue assintomática, clássica, hemorrágica e choque da dengue (Secretaria de Saúde, 2022). No ano de 2013 um grupo de pesquisa anunciou a descoberta de um novo sorotipo presente no soro de um paciente, o DENV-5 (Mustafa et al., 2015). Contudo, esse foi um caso isolado, acredita-se que não houve transmissão do DENV-5 entre humanos e, que o vírus, circula somente entre primatas (Mustafa et al., 2015; Beuy e Viroj, 2016).

A transmissão do vírus ocorre através da picada de fêmea do mosquito *A. aegypti* infectada. Quando o vírus penetra na corrente sanguínea do indivíduo sadio, ele passa a se multiplicar em órgãos específicos, como o baço, o fígado e os tecidos linfáticos. Esse período é conhecido como incubação e dura de quatro a sete dias. Logo após, o vírus volta à corrente sanguínea, gerando a viremia que tem início ligeiramente antes do aparecimento dos primeiros sintomas (Schatzmay et al., 1986).

Com a instabilidade da vacina Dengvaxia e a dificuldade de imunizar toda a população, os casos de dengue vêm preocupando os brasileiros no decorrer dos anos (Tuasaude, 2021). Nos últimos seis anos (2016 - 2021) foram registrados 5.008.998 casos prováveis da doença com 2.708 óbitos (Ministério da Saúde 2017; 2018; 2019; 2020; 2021; 2022) (Tabela 1).

Nos dois últimos anos (2020 e 2021) foi observada uma queda no número de registros de casos da doença no Brasil. Essa redução deve-se, aos esforços de ações de controle do mosquito *A. aegypti*, após epidemia de dengue ocorrida no ano de 2019 (Ministério da Saúde, 2020) e, também, ao fato de a dengue se apresentar como uma doença sazonal, com oscilação de casos e aumento a cada três/quatro anos, em média (Portal.fiocruz, 2021).

Outro fato, que também pode ter influenciado no declínio de registros de casos, nos anos de 2020 e 2021, foi o impacto direto da pandemia do Covid-19, seja com a transferência de recursos humanos e materiais para o combate ao Covid-19, ou com possíveis subnotificações (Portal.fiocruz, 2021).

O ano de 2021 apresentou os menores números de casos de dengue em 21 anos, desde que os dados começaram a ser contabilizados pela Secretaria Municipal de Saúde, no ano 2000 (Diário do Rio, 2021). No presente ano (2022), até a semana epidemiológica 10, já foram registrados 161.605 casos, e 29 pessoas morreram por dengue. Diante desse cenário, torna-se cada vez mais necessário a implementação de ações para redução de casos da doença no país (Ministério da Saúde, 2021; 2022).

2.6.2. Chikungunya

Chikungunya é considerada uma arbovirose de alta morbidade, causada por um vírus do gênero *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae*. Este vírus é transmitido aos seres humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*. As manifestações clínicas dessa doença são semelhantes às da dengue, porém, mais duradouras (Schilte et al., 2013).

O principal sintoma que diferencia a chikungunya da dengue são as fortes dores nas articulações (poliartralgia persistente), especialmente em tornozelos, cotovelos e punhos, que podem levar à incapacidade dos indivíduos acometidos pela doença chikungunya, por um longo período (fase crônica), apresentando elevada taxa de morbidade e conseqüente redução da produtividade e da qualidade de vida (Campbell et al., 2015; Guia de Vigilância em Saúde, 2019).

Embora quadros severos não sejam comuns, manifestações neurológicas (encefalite, meningoencefalite, mielite, síndrome de Guillain Barré), manifestações cutâneas bolhosas e miocardite podem trazer gravidade aos casos (Powers e Logue, 2007). Estes, quando ocorrem, podem evoluir para óbito (Ministério da Saúde, 2022).

Até recentemente, a transmissão de chikungunya estava restrita ao ciclo silvestre, o primeiro caso desta doença foi registrado na Tanzânia em 1953. Existem dados da ocorrência de casos confirmados em países europeus e na região leste do Caribe (Sudeep e Parasharb, 2008).

No Brasil, o primeiro caso de chikungunya foi relatado no ano de 2010, casos de transmissão autóctone (ocorrida dentro do território nacional) foram confirmados em setembro de 2014. Em 2015, foram registrados 37.779 casos prováveis da

doença, sendo 12.849 casos confirmados, resultando em cinco óbitos (Ministério da Saúde, 2016).

Nos últimos seis anos (2016 - 2021) foram registrados 844.085 casos prováveis da doença, resultando em 618 mortes (Ministério da saúde 2017; 2018; 2019; 2020; 2021; 2022) (Tabela 1). No presente ano (2022), até a semana epidemiológica 10, foram registrados 13.092 casos prováveis de chikungunya no país, com um óbito comprovado (Ministério da Saúde, 2022) .

O quadro crônico da doença interfere na qualidade de vida do indivíduo, com grande impacto econômico devido à redução da produtividade das pessoas infectadas. Ainda não existe vacinação para combater o vírus da chikungunya (Thiboutot et al., 2010). Sendo assim, o controle do inseto vetor torna-se imprescindível para a prevenção da doença.

2.6.3. Zika

Zika é uma doença causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus* pertencente à família Flaviviridae (Duffy et al., 2009). Este vírus é transmitido aos seres humanos pela picada do mosquito *A. aegypti* causando, a doença Zika. Outros meios de transmissão, como transfusão sanguínea, via sexual e forma vertical foram relatados (Guia de Vigilância em Saúde, 2017).

A nomenclatura designada ao vírus Zika (ZIKAV) deriva da sua descoberta na floresta Zika em Uganda onde o vírus foi isolado pela primeira vez em macacos Rhesus no ano de 1947 (Dick et al., 1952; Pinto Junior et al., 2015). Por muito tempo o vírus foi descrito como causador de infecções humanas esporádicas na África e Ásia. A primeira epidemia da doença Zika ocorreu no ano de 2007 na Ilha Yap, na Micronésia (Duffy et al., 2009), onde foram registrados 185 casos, dos quais 49 foram confirmados (WHO, 2015).

Em 2013 na Polinésia Francesa foram registrados cerca de 10.000 casos de Zika, dos quais 70 foram graves com complicações neurológicas ou autoimunes (OPAS, 2015). Em 2014, casos de Zika foram notificados na Nova Caledônia, Ilhas Cook (Polinésia) e Ilha de Páscoa (Chile), sendo detectada assim, a circulação do vírus nas Américas (WHO, 2015).

No Brasil, suspeita-se que sua entrada tenha se dado durante a Copa do Mundo de 2014, quando o país recebeu turistas de várias partes do mundo,

inclusive de áreas atingidas de forma mais intensa pelo vírus, como a África, onde surgiu e da Ásia (Katsuna et al., 2014).

No primeiro semestre de 2015, já havia casos confirmados em estados de todas as regiões do país. Com sintomas mais brandos que os da dengue e os da chikungunya, a doença Zika chegou a ser ignorada pelas autoridades de saúde. Porém, houve evidências de que a infecção pelo vírus esteja associada a casos mais graves, como microcefalia congênita (quando adquirido por gestante - afetando o feto) e síndrome de Guillain-Barré, que, embora sejam condições raras, aumentaram de maneira incomum no país no ano de 2015 (G1, 2015; Darlington, 2015).

Em abril de 2015, foi confirmada a transmissão autóctone do vírus Zika no Brasil. Nesse mesmo ano iniciaram os registros de bebês nascidos com microcefalia em áreas afetadas pelo vírus. No ano de 2016, foi confirmada a relação entre infecção pelo vírus Zika e microcefalia em bebês (Ministério da Saúde, 2018). Neste mesmo ano foram registrados 216.245 casos prováveis da doença, dos quais 130.701 foram confirmados, destes, 11.052 ocorreram em gestantes. Houve oito casos de óbito no ano de 2016 no país (Ministério da Saúde, 2016; 2017).

Nos últimos seis anos (2016 a 2021) foram registrados 266.509 casos prováveis de Zika no Brasil com 20 óbitos confirmados (Tabela 1). Até a semana epidemiológica 10 do presente ano (2022), foram registrados 756 casos prováveis de Zika no Brasil, e nenhum óbito foi registrado. Contudo, ainda não existe vacinação para combater o vírus causador de Zika (Ministério da Saúde, 2022), assim, o controle do mosquito vetor se faz necessário para a prevenção da doença.

Tabela 1- Número de casos de arboviroses no Brasil entre os anos de 2016 e 2021

Ano	Dengue		Chikungunya		Zika	
	Casos prováveis	Óbitos	Casos prováveis	Óbitos	Casos prováveis	Óbitos
2016	1.483.623	700	277.882	240	216.245	11
2017	251.711	185	185.854	192	17.594	1
2018	265.934	201	87.687	45	8.680	5
2019	1.544.987	840	132.205	101	10.768	3
2020	928.000	541	64.605	26	7.070	0
2021	534.743	241	95.852	14	6.143	0
Total	5.008.998	2.708	844.085	618	266.509	20

2.7. Métodos utilizados para o controle de populações de mosquitos vetores

2.7.1. Inseticidas sintéticos

Entre as estratégias desenvolvidas para o controle de mosquitos estão a melhoria do saneamento básico e a redução de número de criadouros de mosquitos. Tais atividades contribuem para a redução da infestação de mosquitos principalmente em períodos de epidemias (Forattine, 1962; Tauil, 2006; Secretaria de Vigilância Sanitária, 2018). Essas ações são, frequentemente, acompanhadas pelo uso de inseticidas sintéticos (Marcondes, 2001).

Os inseticidas sintéticos são classificados em 32 grupos, sendo: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides, os grupos mais utilizados no controle de insetos (Bisset, 2002). Os Inseticidas organoclorados são altamente resistentes aos mecanismos de decomposição dos sistemas biológicos. Dentre os compostos mais conhecidos estão o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), cujas propriedades foram descobertas em 1939 por Paul Müller, se tornando um fator primordial para a saúde pública no controle de vetores. Com alta letalidade, o DDT atravessa com facilidade o exoesqueleto dos insetos afetando o sistema nervoso central. Contudo, no ano de 1946 surgiram os primeiros problemas relacionados à resistência aos inseticidas organoclorados. Este grupo de inseticida

foi proibido devido à sua persistência no ambiente por longos períodos e pela bioacumulação em tecidos de animais e de seres humanos. (Becker et al., 2010).

O grupo dos organofosforados, malathion e temephos, constitui uma das alternativas ao uso do DDT por serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos dos animais, apresentando baixa toxicidade (Braga e Valle, 2007a). Apresentam, porém, como principal desvantagem, a instabilidade química, o que torna obrigatória a renovação periódica de sua aplicação (Palchick, 1996).

O malathion é usado principalmente na forma de aerossol para controle de pragas urbanas, mosquitos adultos e insetos na agricultura (Becker et al., 2010).

O temephos registrado nos EUA em 1965, para utilização em agricultura e controle de mosquitos, é o único larvicida desse grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquitos, recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para uso em água potável (Chavasse e Yap, 1997). É eficaz para todos os estágios larvais de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* com grande potencialidade para reduzir populações de *A. aegypti* (Becker et al., 2010). Entretanto, foi constatada por Campos e Andrade (2001), a resistência de larvas de *A. aegypti* ao organofosforado temephos.

Os carbamatos têm sido usados em controle de insetos vetores que apresentam resistência aos organoclorados. Sua comercialização teve início por volta dos anos 60 (Braga e Valle, 2007a). O propoxur é um dos inseticidas desse grupo de compostos mais comumente usados (Hemingway e Ranson, 2005; Becker et al., 2010). Assim como os organofosforados, os carbamatos apresentam efeito rápido e amplo espectro de ação sobre os insetos, o que favorece o uso desses inseticidas, embora organismos não-alvo possam ser prejudicados no processo (Braga e Valle, 2007a).

Os inseticidas sintéticos piretroides, foram descobertos em 1977, sendo moléculas análogas às piretrinas extraídas de flores de *crisântemo* (Irac, 2018). Apesar de apresentarem baixa toxicidade para aves e mamíferos, são altamente tóxicos para espécies aquáticas, já que são solúveis em água (Palchick, 1996). Além disso, apresentam custo elevado (Guzman et al., 2010). Contudo, esses inseticidas são muito utilizados para o manejo de mosquitos adultos, ou como larvicidas (Braga e Valle, 2007b; Becker et al., 2010). Porém, seu uso excessivo pode selecionar populações de insetos resistentes ao inseticida (FUNASA, 2001;

Medeiros, 2021), e de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency - USEPA*) USEPA), os produtos à base de piretroides também podem apresentar um risco de curto e longo prazo para os seres humanos (Silveira, 2020).

Diante disso, a busca por alternativas de controle de mosquitos com diferentes modos de ação se faz necessária.

2.7.2. Controle alternativo

Diversas tecnologias estão sendo utilizadas no Brasil e no mundo com a finalidade de reduzir populações de mosquitos vetores de doenças. Diferentes estratégias de ação estão sendo pesquisadas, tais como o uso de mosquitos transgênicos (Araújo et al., 2015) e a inserção da bactéria *Wolbachia* no mosquito *A. aegypti* (Moreira et al.; 2009; Dutra et al., 2015).

A liberação de mosquitos geneticamente modificados (GM) tem por objetivo reduzir ou mesmo eliminar espécies de mosquitos por meio do desenvolvimento de genes letais ou capazes de tornar os insetos estéreis (Carvalho et al., 2014; Araújo et al., 2015). A empresa britânica Oxitec é responsável pela liberação comercial de mosquitos transgênicos *A. aegypti* no Brasil, visando à eliminação desta espécie. Essa estratégia tem sido testada no país, desde o ano de 2010 (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2021).

Os mosquitos GM, apresentam dois tipos de genes: Um gene autolimitante, que impede que a prole fêmea do mosquito sobreviva até a idade adulta e um gene marcador fluorescente que brilha sob uma luz vermelha especial. Isso permite que os pesquisadores identifiquem mosquitos transgênicos na natureza (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2021).

Os ovos produzidos em laboratório por mosquitos geneticamente modificados carregam os genes marcadores autolimitantes e fluorescentes. Durante as pesquisas em campo, estes ovos são liberados em uma área específica. Uma vez que eclodirem e se desenvolverem até a fase adulta, os mosquitos machos, se encontram aptos para acasalar com fêmeas selvagens e passar os genes letais aos descendentes. A prole feminina, por sua vez, morre antes

de se tornar adulta. O resultado esperado é que o número de *A. aegypti* na área diminua (Lima, 2017).

Com a utilização dessa ferramenta no Brasil, a esperança do Ministério da Saúde era reduzir a população de mosquitos em 90%. Contudo, isso funcionou durante o teste de campo. Depois de 18 meses após o final do experimento, a população de mosquitos selvagens, voltou a crescer alcançando proporções anteriores ao teste (Schmidt, 2019).

Uma outra abordagem que vem sendo proposta como forma alternativa de controle de populações de mosquitos é a utilização da bactéria *Wolbachia pipientis* (Werren et al., 2008). Esta bactéria está presente em mais de 60% dos insetos no ambiente, no entanto, não é encontrada naturalmente em *A. aegypti* (Walker et al., 2011; Dutra et al., 2015). É uma bactéria endossimbionte, Gram-negativa, encontrada em vários tecidos do hospedeiro, incluindo os órgãos reprodutivos (ovários e testículos), sendo considerada a bactéria intracelular mais abundante do planeta (Zug et al., 2012).

Normalmente, a bactéria *Wolbachia* é transmitida de forma vertical através da linhagem materna, sendo disseminada de forma eficiente através das células germinativas. Contudo, a transmissão horizontal (lateral) intertáxons, também pode ocorrer. Isso pode ser uma explicação para a vasta distribuição da bactéria entre organismos filogeneticamente diferentes (Zug et al., 2012).

Atualmente, a bactéria *Wolbachia* tem atraído um considerável interesse devido às alterações reprodutivas causadas em seus hospedeiros, e também, pelo potencial de aplicação em insetos transmissores de doenças (Werren et al., 2008). A alteração reprodutiva mais frequentemente induzida pela bactéria *Wolbachia* é a incompatibilidade citoplasmática. Esse fenômeno ocorre quando um macho infectado copula com uma fêmea não infectada, ou infectada com uma cepa diferente de *Wolbachia*. Com isso, a fêmea torna-se incapaz de produzir uma prole viável, apresentando como resultado, a não eclosão dos ovos. Contudo, quando uma fêmea infectada copula com um macho que não apresenta infecção, a prole é bem-sucedida, porém, estará infectada também. Quando ambos os sexos estão infectados, estes produzem uma prole viável, porém, infectada (Hoffmann; Turelli, 1988; Werren et al., 2008).

No Brasil, o método *Wolbachia* é conduzido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) com apoio financeiro do Ministério da Saúde. O projeto de pesquisa *Eliminar dengue* utiliza essa abordagem genética visando reduzir as arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti*. Neste programa, a *Wolbachia* é introduzida em mosquitos *A. aegypti* (machos e fêmeas) e em seguida, estes insetos são liberados no campo para copularem com os mosquitos selvagens (Dutra et al., 2015). Com o tempo, espera-se que as gerações descendentes do *A. aegypti* estejam infectadas com a *Wolbachia*, reduzindo a transmissão da dengue (Walker et al., 2011) e outras arboviroses (Van et al., 2012).

Pesquisas têm mostrado que mosquitos *A. aegypti* infectados com *W. pipientis* tornam-se menos eficientes para realizarem refeições de sangue, devido aos danos provocados nos tecidos dos insetos, diminuindo também o tempo de vida do mosquito (Turley et al.; 2009). A *Wolbachia* também restringe a replicação do vírus da dengue e da Zika (Flaviviridae) em *A. aegypti* (McLean et al., 2018).

Apesar das vantagens, esta estratégia necessita que as infecções com *Wolbachia* sejam mantidas em níveis elevados dentro das populações naturais, bem como continuar a restringir a replicação viral. Sendo assim, o sucesso em longo prazo e em grandes áreas é um desafio (Bull et al., 2013).

Neste sentido, os inseticidas biológicos representam uma importante alternativa para o controle de vetores de doenças, já que têm demonstrado alta potencialidade contra transmissores de arbovírus e de outros parasitas (Debach e Rosen, 1991; Scholte et al., 2004; Paula et al., 2018).

2.7.3 Inseticidas biológicos

Com a finalidade de se desenvolver estratégias de controle biológico os cientistas vêm investigando a ação de diferentes organismos como vírus, bactérias e fungos, além de, parasitas e predadores contra populações de insetos (Lenteren e Godfray, 2004).

Os inseticidas biológicos vêm adquirindo grande importância no controle de insetos vetores de doenças para humanos. A alta patogenicidade apresentada por alguns microrganismos (vírus, bactérias e fungos), a eficiente capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente, a não toxicidade para vertebrados e para o ambiente e o caráter enzoótico, são características que favorecem esse tipo de

estratégia na redução de populações de insetos indesejáveis em níveis que não provoquem prejuízos (Alves e Faria, 2010).

Isolados de vírus, bactérias e fungos entomopatogênicos têm sido verificados como altamente virulentos contra insetos vetores de doenças (Becnel et al., 2001; Pereira et al. 2009; Costa et al., 2010). A maioria dos vírus patogênicos para artrópodes vetores foram isolados em espécies da ordem Lepidoptera, contudo, estes também, já foram isolados de várias outras ordens de artrópodes, inclusive a Diptera, onde foram encontrados normalmente em larvas de mosquitos (Silveira et al., 2004). De acordo com Becnel et al., (2001), os baculovirus (CuniNPV) são vírus com alta infectividade para todos os estádios larvais dos mosquitos *Culex nigripalpus* e *Culex quinquefasciatus*. Este baculovírus (CuniNPV) infecta e destrói o intestino médio das larvas causando a infecção e a morte em até 96 horas.

As bactérias são os agentes de controle biológico de mosquitos mais utilizados em todo o mundo. *Bacillus thuringiensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (Bs) são bactérias Gram-positivas que apresentam efeito inseticida. Estas duas espécies produzem endotoxinas proteicas. Os cristais proteicos quando ingeridos pelas larvas, são solubilizados no intestino liberando toxinas que destroem as células epiteliais do intestino médio levando-as a morte (Neto et al., 1985; Polanczyk et al., 2003; Costa et al., 2010).

A eficiência de Bti contra larvas de várias espécies de mosquitos foi verificada (Lacey, 2007). A bactéria Bti é eficiente contra larvas dos gêneros *Aedes* e *Culex* sendo menos ativa contra o gênero *Anopheles*. Também possui ação tóxica contra larvas de mosquitos da família dos Simúlídeos (borrachudos), insetos transmissores de doenças como a oncocercose.

Outro agente microbiano, com potencial aplicação em controle biológico, são os fungos entomopatogênicos. Estes, representam o maior grupo de patógenos de insetos (Messias, 1989; Onofre et al., 2002). Os fungos apresentam vantagens em relação aos vírus e às bactérias, já que podem infectar os insetos através de ingestão ou contato externo dos conídios com a cutícula (Alves e Pereira, 1998). Diferentemente, os vírus e as bactérias atuam somente por ingestão, ou seja, precisam ser ingeridos para que suas toxinas exerçam atividade no inseto (Costa et al., 2010).

Os fungos entomopatogênicos possuem a característica de serem de fácil dispersão, já que, após esporularem no corpo dos cadáveres, os conídios são facilmente transportados pelo vento, pela chuva, ou pelo contato com outros insetos, para locais distantes (Alves e Pereira, 1998). Além disso, possuem grande capacidade de supressão de populações de pragas e vetores e facilidade de cultivo *in vitro* (Strasser et al., 2000).

2.8. Ação dos fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos

Fungos entomopatogênicos foram os primeiros patógenos utilizados no controle biológico de pragas (Alves e Pereira, 1998). Esses patógenos são responsáveis por cerca de 80% das doenças em insetos (Robbs & Bittencourt 1998). A patogenicidade e virulência desses microrganismos dependem de sua capacidade em aderir a cutícula, germinar, penetrar e colonizar o corpo do hospedeiro (St. Leger et al., 1991). O fungo, é capaz ainda, de causar a morte do inseto e realizar a exteriorização de suas estruturas, além de produzir esporos (conídios) sobre o corpo do hospedeiro (St. Leger et al., 1991; Alves e Pereira, 1998; Samuels et al., 2016).

Os fungos são capazes de infectar insetos em todos os estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Alves e Pereira, 1998, Carolino et al., 2014; 2019, 2021). A produção de micotoxinas por fungos também contribui para a morte do hospedeiro, além de reduzir o potencial reprodutivo e a eclosão de ovos (Kaaya e Hedimbi, 2012).

A maioria das pesquisas referem-se a duas espécies de fungos: *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Samuels et al., 2016; Paula et al, 2018, Ribeiro et al; 2018). Essas duas espécies de fungo, causam doenças fatais em insetos, denominadas: muscardine branca (*B. bassiana*) e muscardine verde (*M. anisopliae*), devido à grande quantidade de conídios brancos e verdes, respectivamente, cobrindo o cadáver do inseto (Alves e Pereira, 1998).

Em razão da grande variabilidade genética existente em uma mesma espécie fúngica, estudos de seleção de cepas ou isolados e avaliação dos mais virulentos para o controle de insetos pragas e vetores têm sido realizados (Alves e Pereira, 1998; Barros et al., 2010; Pereira et al., 2009; Almeida et al., 2016).

A patogenicidade e virulência dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram demonstrados no controle de vários insetos, tais como: cupins (Fernandes e Alves, 1991), triatomíneos (Luz e Fargues, 1998; Lazzarini, et al. 2006), moscas (Wright et al., 2004, Moraes et al., 2010), pulgas (de Melo et al., 2006) e mosquitos (Silva et al., 2005, Scholte et al., 2007; Paula et al., 2011).

2.8.1. Uso de fungos entomopatogênicos para o controle de mosquitos

Tem sido verificado que *M. anisopliae* e *B. bassiana* têm potencial para serem utilizados no controle de vetores de doenças (Scholte, et al., 2004). Dados da literatura descrevem a atividade dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra ovos, larvas, pupas e adultos de mosquitos (Luz et al; 2007; Pereira et al., 2009; Paula et al., 2013, Carolino et al., 2019, Bitencourt et al., 2021). Esses fungos têm sido bem estudados para uso contra *C. quinquefasciatus*, *An. gambiae*, *Aedes albopictus* e *A. aegypti* (Alves et al., 2002; Scholte et al., 2005; Scholte et al., 2007; Paula et al., 2018).

O fungo *Penicillium citrinum* foi encontrado infectando ovos de *A. aegypti*, podendo atuar como agente de controle (Russell et al. 2001). Em condições de laboratório, Luz et al. (2007) mostraram a atividade ovicida de vários gêneros de fungos entomopatogênicos (*Isaria*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Metarhizium*). Neste estudo, foi verificado que os ovos infectados com *Metarhizium* apresentaram apenas 11% de viabilidade (Luz et al., 2007).

Albernaz et al. (2009) observaram que o fungo *M. anisopliae* formulado em óleo vegetal foi altamente virulento contra ovos de *A. aegypti* em umidade >98%. Em pesquisa realizada por nosso grupo, foi verificado que, ovos de *Aedes sp.* infectados com o fungo *M. anisopliae*, apresentaram menor taxa de eclosão larval (34,5%), comparado com controles, os quais apresentaram taxa de eclosão de larvas acima de 95%. Este estudo mostrou que, um período de exposição de cinco dias, dos ovos de *Aedes sp.* ao fungo *M. anisopliae*, em alta umidade, foi eficiente para reduzir a taxa de eclosão larval deste mosquito (Ribeiro et al., 2018).

A atividade larvicida de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em mosquitos, também, tem sido demonstrada por vários autores (Silva et al.,2004; Pereira et al., 2009; Bukhari et al., 2010; Gomes et al., 2015; Carolino et al., 2021).

Em pesquisa realizada por Silva et al. (2004), foi verificado que isolados de *M. anisopliae* causaram alta taxa de mortalidade em larvas de segundo instar do mosquito *A. aegypti*. Pesquisa realizada por Pereira et al. (2009) utilizando oito isolados do fungo *M. anisopliae* e dois de *B. bassiana* para controle de larvas de *A. aegypti*, demonstrou que, entre os fungos avaliados, *M. anisopliae* (CG 144 e ESALQ 818) e *B. bassiana* (CG 24) foram os mais eficientes, apresentando altas taxas de mortalidade larval. Das larvas expostas à infecção fúngica, apenas 20% originaram pupas, contudo, estas não completaram seu ciclo de desenvolvimento (Pereira, et al., 2009).

Em bioensaio realizado, com diferentes estádios larvais de *An. gambiae* e *An. stephensi* com conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, foi demonstrado que, ambos os fungos foram altamente virulentos, causando altas taxas de mortalidade larval (Bukhari et al., 2010).

Em outro trabalho, foi verificado que, as taxas de sobrevivência de larvas de *A. aegypti*, foram reduzidas para 24% ($S_{50} = 3$ dias) ao usar uma concentração de 1×10^9 conídios mL^{-1} do fungo *M. anisopliae* associado com 1 % de óleo de nim (Gomes et al; 2015).

Em recente pesquisa, foi demonstrado que, conídios do fungo *M. anisopliae* produzidos em grãos de arroz, foram altamente virulentos, reduzindo rapidamente as taxas de sobrevivência de larvas do mosquito *A. aegypti*, causando 100% de mortalidade larval no 2º dia de exposição (Carolino et al., 2021).

Em pesquisa realizada por Carolino et al. (2019), foi demonstrada a virulência dos esporos do fungo *M. anisopliae* contra pupas do mosquito *A. aegypti* quando aplicado na forma de blastosporos, resultando em significativa redução na taxa de sobrevivência das pupas.

Quanto ao controle de mosquitos adultos, várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de reduzir populações desses insetos (Scholte et al., 2004; Blanford et al. 2005; Scholte et al., 2006; Paula et al., 2008; 2011; García-Munguía et al., 2011; Carolino et al.; 2014; Imad Silva, 2015; Paula et al., 2021).

Um estudo realizado em condições de laboratório, com diferentes concentrações de conídios de *M. anisopliae* em *An. gambiae*, mostrou que fêmeas tratadas com o fungo contaminaram machos durante o voo de acasalamento, e que, possivelmente, o macho infectado dissemina o fungo para outras fêmeas.

(Scholte et al., 2004). Em trabalho semelhante, García-Munguía et al. (2011) mostraram que mosquitos *A. aegypti* machos infectados com *B. bassiana* transmitiram o fungo para fêmeas durante o voo nupcial, causando 90% de mortalidade dos mosquitos em 15 dias.

Outros estudos mostram que, fêmeas de *A. stephensi* previamente inoculadas com o protozoário *Plasmodium chaboudi*, apresentaram redução no repasto sanguíneo e na transmissão do protozoário quando infectadas com o fungo *B. bassiana* (Blanford et al. 2005), e, fêmeas de *An. gambiae* infectadas com *M. anisopliae* apresentaram significativa diminuição da alimentação sanguínea e também da fecundidade (Scholte et al., 2006).

Em pesquisa realizada por Paula et al. (2008) verificou-se a suscetibilidade de fêmeas *A. aegypti* adultas à infecção por *M. anisopliae* e *B. bassiana*, quando os mosquitos foram expostos a um pano preto impregnado com fungo e pendurado em gaiolas grandes. Os resultados mostraram uma alta infectividade dos mosquitos, com 70% de redução da sobrevivência.

Em outro trabalho, foi observada uma alta virulência do fungo *M. anisopliae* contra fêmeas de *A. aegypti*, quando *M. anisopliae* foi associado ao inseticida sintético Imidacloprid (Paula et al., 2011). Trabalho semelhante também relatou, alta eficiência da combinação do fungo *M. anisopliae* com óleo vegetal ou com óleo sintético isoparafina, resultando em alta redução na taxa de sobrevivência de fêmeas *A. aegypti* (Carolino et al.; 2014).

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* também foram eficientes quando impregnados em pano preto, suspenso, com auxílio de um arame, no interior de uma armadilha denominada "PET". Esta armadilha foi altamente eficiente para reduzir as taxas de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* em condição de semicampo (Imad Silva, 2015). Paula et al., (2021) relataram a eficiência do fungo *M. anisopliae* quando utilizado na forma de blastosporos contra *A. aegypti* adulto.

Neste trabalho, foi verificado que blastósporos foram mais virulentos que conídios para fêmeas adultas de *A. aegypti* quando pulverizados sobre os insetos. Os blastósporos também foram virulentos quando aplicados em panos pretos nos quais os mosquitos pousavam e se infectavam. Um suplemento de óleo vegetal também auxiliou na virulência dos blastosporos, por facilitar a adesão ao tecido e proporcionar um microclima propício para a germinação.

Um outro estudo avaliou a ação do fungo *B. bassiana* na presença e na ausência de microbiota intestinal no mosquito *A. stephensi*, e verificou que a infecção fúngica em mosquitos com microbiota intestinal normal, pode facilitar a ação do entomopatógeno, resultando em menor taxa de sobrevivência do mosquito (Wei et al., 2017).

Nesta perspectiva, os fungos entomopatogênicos se mostram promissores para o controle de mosquitos vetores, contudo, alterações na microbiota natural do inseto, pode ser uma estratégia viável para a utilização de fungos entomopatogênicos de forma mais eficiente. Sendo assim, a presente pesquisa visa investigar a influência da microbiota intestinal na sobrevivência e no desenvolvimento de fêmeas de *A. aegypti* infectadas com o fungo *Metarhizium anisopliae*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação e manipulação dos mosquitos *Aedes aegypti*

Os experimentos foram realizados no insetário do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF), no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Os ovos do mosquito *A. aegypti* utilizados no presente estudo foram coletados utilizando armadilhas denominadas ovitrampas feitas de vaso de plástico preto de 700 mL com 250 mL de água de torneira e 4 palhetas de Eucatex Duratex[®] (SP, Brasil) no tamanho de 10 x 3 cm fixadas na borda do vaso por um elástico (Figura 6A).

As ovitrampas foram colocadas em residências, no bairro Parque Califórnia, no município de Campos dos Goytacazes - RJ, onde foram deixadas no ambiente em locais sombreados por 5 dias. Após esse período, as ovitrampas foram recolhidas e levadas ao laboratório, onde as palhetas foram retiradas e colocadas em bandejas para secarem por 48h à temperatura ambiente.

A eclosão das larvas foi estimulada por imersão total das palhetas em bandejas de 5000 mL contendo 2000 mL de água desclorada (Figura 6B). Foram adicionados em cada bandeja, 10 grãos de ração de pássaros Alcon Club, Alcon[®] (SC, Brasil) para alimentação das larvas (Figura 6C).

As pupas foram transferidas para copos de plástico (250 mL) contendo 150 mL de água, o qual foi inserido dentro de gaiolas de criação (30 x 30 x 30 cm)

(Figura 6D). Após emergirem, adultos foram alimentados diariamente com sacarose a 10%, oferecida em um recipiente de vidro transparente de 30 mL contendo um pavio amarelo de feltro em seu interior (Figura 6D).

As gaiolas contendo os mosquitos foram mantidas em ambiente com temperatura e umidade controladas (26 °C; UR 75%; fotoperíodo 12: 12 D/N). Para a manipulação dos mosquitos foi utilizada uma corrente de dióxido de carbono durante 30 segundos para adormecê-los (conforme Paula et al., 2008).

Com auxílio de uma pinça fina, as fêmeas foram selecionadas, quantificadas e colocadas em placas de Petri para serem utilizadas nos tratamentos.



Figura 6: Esquema das etapas realizadas em laboratório para criação do mosquito *Aedes aegypti*: A - Armadilha ovitrampa para coleta de ovos de *A. aegypti*; B - Palhetas de Eucatex com ovos imersas na água para eclosão das larvas; C - Larvas do mosquito *Aedes aegypti* em bandeja; D - Mosquitos adultos em gaiolas com alimentador de sacarose, Ribeiro. (2022).

3.2. Cultivo de conídios de *Metarhizium anisopliae*

O isolado ESALQ 818 de *M. anisopliae* foi obtido da coleção da ESALQ Piracicaba-SP e mantido na coleção de fungos entomopatogênicos do LEF. O fungo foi originalmente isolado de uma amostra de solo em Piracicaba (SP).

O isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio sólido SDA (Dextrose 10g; peptona 2,5 g; extrato de levedura 2,5 g; ágar 20g e água destilada 1L) e mantido em câmara BOD com temperatura e umidade controladas (27 °C; UR 75%). Após 15 dias, o isolado foi armazenado a 4 °C.

Visando produzir uma maior quantidade de conídios para conduzir os ensaios biológicos, o isolado foi cultivado em arroz de acordo com Carolino et al. (2014, 2021). Erlemeyers de 250 mL contendo 25 g de arroz parboilizado cru + 10 mL de água destilada, fechados com algodão e papel alumínio, foram autoclavados durante 15 minutos a 1 atm (121°C).

Com o auxílio de uma colher estéril, os conídios foram retirados da placa de Petri e misturados no arroz através de movimentos circulares até obter uma distribuição uniforme dos conídios entre os grãos de arroz (Figura 7). Todo o processo de coleta de conídios foi realizado em câmara de fluxo laminado previamente desinfetada com álcool 70% e exposição à radiação UV durante 15 minutos. Em seguida, os Erlemeyers foram mantidos em BOD a 27 °C por 15 dias para germinação do fungo.

A fim de reduzir a umidade do fungo, o arroz com os conídios de *M. anisopliae* foi transferido para sacos de papel (09 x 18 cm), e colocados em uma incubadora Nova Ética® (SP, Brasil) com circulação de ar forçado a 30 °C por 48 horas.

Os conídios secos foram separados do arroz com o auxílio de uma máquina separadora de esporos MR-5 Mycoharvester® (ACIS, Reino Unido) e armazenados em geladeira a 4 °C para preparação das suspensões fúngicas utilizadas nos ensaios biológicos.

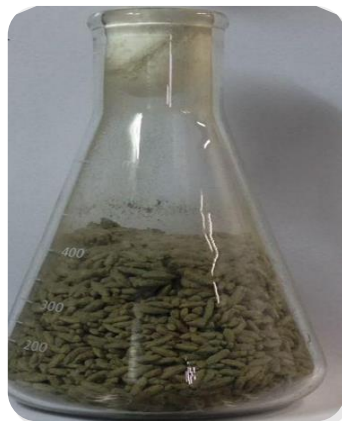


Figura 7. *Metarhizium anisopliae* cultivado em arroz, Ribeiro. (2022).

3.3. Alimentação dos mosquitos com sacarose + antibiótico

Para avaliar o efeito de *M. anisopliae* ESALQ 818 em adultos tratados ou não com antibiótico, os mosquitos foram previamente tratados com carbenicilina (Cb) ou tetraciclina (Tc) a 200 µg/mL Sigma-Aldrich® (St. Louis, Mo), ou com a combinação de ambos.

Os experimentos foram conduzidos em gaiolas de criação previamente separadas, onde grupos de adultos de ambos os sexos com 3 a 4 dias de idade foram separados e alimentados três dias consecutivos da seguinte maneira: grupo 1 (solução de sacarose estéril a 10%); grupo 2 (solução de sacarose estéril a 10% + CB); grupo 3 (solução de sacarose estéril a 10% + TC); grupo 4 (solução de sacarose estéril a 10% +CB+TC).

3.4. Alimentação dos mosquitos com sangue

Para alimentação com sangue, um camundongo da espécie Balb/c foi imobilizado em bolsa de nylon e exposto aos mosquitos dentro de gaiolas de criação por 30 minutos.

Em todos os testes com alimentação sanguínea, os mosquitos foram deixados por um período de 24h sem alimentação, para posterior ingestão de sangue. O protocolo para utilização de camundongos foi aprovado pelo comitê de Ética da UENF (Protocolo CEUA 248).

3.5. Manipulação dos mosquitos

Para conduzir os experimentos, os mosquitos adultos foram adormecidos pela exposição de uma corrente de dióxido de carbono durante 30 segundos. Depois de adormecidos, os machos foram descartados e as fêmeas foram transferidas, com o auxílio de uma pinça, para placas de Petri de 14 cm de diâmetro contendo em seu interior um disco de papel filtro esterilizado.

3.6. Bioensaio 01 - Avaliação de diferentes concentrações de *M. anisopliae* contra fêmeas de *A. aegypti*

O intuito desta etapa foi utilizar diferentes concentrações fúngicas e dentro destas, escolher uma que resultasse em alta porcentagem de sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* e, que ao mesmo tempo, fosse estatisticamente diferente da porcentagem de sobrevivência de mosquitos no tratamento controle, para que assim, fossem realizados experimentos posteriores nesses mosquitos.

Os conídios do isolado ESALQ 818 de *M. anisopliae* foram suspensos em 10 mL de solução de Tween 80 a 0,05%(TW). A suspensão foi quantificada e ajustada na concentração de 10^8 conídios/mL com auxílio de uma câmara de Neubauer (Alves e Pereira, 1998). Em seguida, as concentrações de 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 conídios/mL foram obtidas através de diluição seriada em TW (Alves e Pereira, 1998).

Aqui, grupos de 10 fêmeas (N=30) foram expostas a 1 mL de suspensão fúngica na concentração desejada utilizando o método de pulverização com o auxílio de uma Torre de Potter Burkard Scientific® (Uxbridige, UK). Nesta etapa as fêmeas foram previamente alimentadas somente com solução de sacarose a 10%. O grupo controle foi exposto somente a solução de Tween 80 a 0,05%.

Após a pulverização, as fêmeas foram transferidas para potes transparentes de plástico (11 cm x 6 cm) e mantidos em câmara com temperatura e umidade controladas [$27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$; UR>95%; fotoperíodo claro/escuro (12 h:12 h)]. Estes potes apresentam uma abertura na tampa que é coberta por organza branca para circulação de ar (Figura 8). Esses insetos foram alimentados diariamente com sacarose a 10% colocada em disco de papel filtro sobre o tecido organza.

O número total de fêmeas utilizadas nesse teste foi de 180 para cada repetição. As taxas de sobrevivência dos mosquitos foram avaliadas diariamente por 7 dias. Os testes foram realizados em três tempos distintos utilizando diferentes lotes de fungos e mosquitos.



Figura 8. Potinho de plástico utilizado nos testes, Ribeiro. (2022).

3.7. Bioensaio 02 - Virulência de *M. anisopliae* contra fêmeas de *A. aegypti* tratadas com antibiótico

Os mosquitos foram alimentados por 3 dias consecutivos com sacarose ou sacarose + antibiótico carbenicilina, em gaiolas de criação. Após esse período grupos de 10 fêmeas (N=30) foram expostas à suspensão fúngica a 1×10^6 conídios/mL (concentração previamente determinada e escolhida).

Neste teste foram realizados quatro tratamentos: (1) fêmeas alimentadas com sacarose (Sac) + antibiótico carbenicilina (Ant) e infectadas com o fungo (F) (SacAntF); (2) fêmeas alimentadas com sacarose e infectadas com o fungo (SacF); (3) fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico carbenicilina e tratadas com TW (controle (C)) (SacAntC) e (4) fêmeas alimentadas com sacarose e tratadas com TW (controle) (SacC).

Todo o protocolo de exposição fúngica e avaliação de sobrevivência foi realizado conforme o item 3.6. Os testes foram realizados em três tempos distintos utilizando diferentes lotes de fungos e mosquitos.

Além de carbenicilina, o mesmo protocolo foi conduzido utilizando o antibiótico tetraciclina em fêmeas de *A. aegypti* infectadas ou não com fungo, além disso, um terceiro ensaio biológico foi realizado em fêmeas previamente tratadas com a combinação dos dois antibióticos (carbenicilina + tetraciclina) a 200 µg/mL.

Estes ensaios biológicos foram realizados separadamente.

3.8. Bioensaio 03 - Avaliação da sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* tratadas com fungo *M. anisopliae* a diferentes períodos após a oferta do antibiótico carbenicilina

Aqui, os mosquitos *A. aegypti*, em gaiolas de criação, foram alimentados diariamente com sacarose ou com sacarose + carbenicilina. Após três dias, o antibiótico foi retirado e as fêmeas foram expostas à suspensão fúngica a 1×10^6 conídios/mL (grupo denominado 0 dias).

Depois, o mesmo protocolo de antibioticoterapia foi realizado para outros grupos, porém, os mosquitos foram expostos ao fungo em períodos distintos (3, 6 e 9 dias). Cada grupo teve o seu respectivo grupo controle onde as fêmeas foram expostas somente a solução de Tween a 0,05% (TW). Após a retirada do antibiótico, as fêmeas permaneceram sendo alimentadas com sacarose a 10%.

Os grupos foram divididos da seguinte forma: (1) fêmeas alimentadas com sacarose + carbenicilina e infectadas com o fungo (SacAntF); (2) fêmeas alimentadas com sacarose e infectadas com o fungo (SacF); (3) fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico carbenicilina e tratadas com TW (controle) (SacAntC) e (4) fêmeas alimentadas com sacarose e tratadas com TW (controle) (SacC).

Todo o protocolo de exposição fúngica e avaliação de sobrevivência foi realizado conforme o item 3.6. Os testes foram realizados em três tempos distintos utilizando diferentes lotes de fungos e mosquitos. O número de mosquitos utilizados neste experimento foi de 120 (N=120) para cada período.

3.9. Bioensaio 4 - Avaliação da influência da alimentação de sacarose + antibiótico carbenicilina no repasto sanguíneo de fêmeas de *A. aegypti*

Para avaliar se o antibiótico teve efeito no repasto sanguíneo dos mosquitos, dois tratamentos foram realizados: (1) Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico carbenicilina e (2) Fêmeas alimentadas com sacarose (controle).

Para cada tratamento foram utilizadas 30 fêmeas por gaiola. As fêmeas selecionadas foram alimentadas por três dias consecutivos com solução de sacarose ou com sacarose + antibiótico. No final do terceiro dia os alimentadores foram removidos das gaiolas e os mosquitos ficaram por 24 h sem alimento. Após esse período foi oferecido sangue de camundongo para esses insetos por 30 minutos.

Para verificar quais fêmeas se alimentaram de sangue, após a retirada do camundongo da gaiola, os mosquitos foram adormecidos com CO₂, acondicionados em placas de Petri e com auxílio de uma pinça foram maceradas/esmagadas em uma folha branca, uma a uma. Esse procedimento serviu para verificar a presença de sangue no canal alimentar das fêmeas.

Duas gaiolas foram usadas para cada tratamento. Foram necessárias 120 fêmeas por experimento. Três repetições foram realizadas.

3.10. Bioensaio 5 - Influência da infecção fúngica na oviposição de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou com sacarose + antibiótico carbenicilina

Aqui, os grupos foram separados da seguinte forma: (1) fêmeas alimentadas com sacarose (Sac) + antibiótico carbenicilina (Ant) + sangue (San) e pulverizadas com fungo (F) (SacAntSanF); (2) fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e pulverizadas com fungo (SacSanF); (3) fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico carbenicilina + sangue e pulverizadas somente com TW (SacAntSanC) e (4) fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e pulverizadas somente com TW (SacSanC).

Os mosquitos foram alimentados com solução de sacarose acrescida de carbenicilina conforme o item 3.7. Ao final do terceiro dia, os mosquitos foram submetidos a um jejum por 24 horas e em seguida foram alimentados com sangue

de camundongo por 30 minutos. Duas horas após a alimentação sanguínea, as fêmeas foram separadas dos machos conforme o item 3.5, e as fêmeas ingurgitadas foram separadas para experimentação. O ensaio biológico e análise de sobrevivência foram realizados conforme o item 3.7.

Dez fêmeas alimentadas com sangue permaneceram juntas por 60 h dentro do pote de plástico. Após esse período, as fêmeas foram individualmente transferidas para placas de Petri (6 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura). Cada placa de Petri foi invertida e o fundo da tampa foi revestido com um papel filtro umedecido com 700 μ L de uma solução contendo água desclorada misturada com 30% de água de criação (água retirada de bandeja de larvas que estimulam a postura de ovos). Fita adesiva foi utilizada para prender o papel filtro na borda da placa de Petri. Este procedimento foi adaptado de Valência et al. (1996).

As fêmeas foram mantidas individualmente em Placa de Petri em local com temperatura e umidade controladas [$27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR>95%; fotoperíodo claro/escuro (12 h:12 h)] (Figura 9). Após o período de 24 h, 300 μ L de água desclorada foram adicionados a cada placa de Petri para manter a umidade no papel filtro.

Como as fêmeas ovipositam no período de 3 a 5 dias após alimentação sanguínea (Forattini, 2002), as placas de Petri foram retiradas da BOD no sexto dia após o repasto sanguíneo. Em seguida, as fêmeas foram descartadas, o papel filtro contendo os ovos foi removido para quantificação e, em seguida, o número de ovos depositados por fêmea foi contado com auxílio de um microscópio estereoscópio (Labomed[®]) e registrado.

No final do experimento a média de oviposição foi calculada considerando o número total de ovos dividido pelo número total de fêmeas de cada grupo. Foram utilizadas para quantificação dos ovos, 16 fêmeas por repetição (4 por grupo) e os testes foram realizados em três tempos distintos utilizando diferentes lotes de fungos e mosquitos. Os papéis filtro foram identificados, os ovos foram secos por 120h em câmara climatizada (para garantir a completa embriogênese) e armazenados para conduzir o próximo experimento.



Figura 9 - Câmera climatizada (BOD) - com placas de Petri revestidas com papel filtro usado para oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti*, Ribeiro. (2022).

3.11. Bioensaio 6 - Viabilidade de ovos de *A. aegypti* oriundos de fêmeas alimentadas com sacarose ou com sacarose + antibiótico carbenicilina e infectadas com *M. anisopliae*

Após a realização dos experimentos do item 3.10, os ovos de cada grupo foram transferidos para placas de Petri contendo 10 mL de água desclorada e 2 grãos de ração de pássaro.

As placas de Petri foram mantidas em local com temperatura e umidade controladas ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR >95%). Após 48 h, foi contado o número de larvas por placa de Petri. Em seguida, as larvas foram separadas em grupos de 20 larvas por placa de Petri e foram mantidas na BOD.

Após as larvas transformarem-se em pupas, estas foram contabilizadas (o número foi registrado) e transferidas para gaiolas de criação. Depois de 48 h, o número de adultos emergidos das pupas foi registrado em cada um dos quatro tratamentos.

3.12. Análise estatística

As curvas de sobrevivência foram comparadas usando o Log-Rank Test (Elandt e Johnson, 1980) em 95% de nível de significância. Este método foi conduzido pelo GraphPad Prism® 8.0 Software (Motulsky, 2003). Primeiramente foram analisadas as repetições de cada tratamento, com o objetivo de verificar se as curvas de sobrevivência entre as repetições eram homogêneas. Não ocorrendo diferenças significativas, as três repetições de cada experimento foram agrupadas (“pooled”), dando-se início a análise das curvas de sobrevivência entre os tratamentos.

O tempo médio de sobrevivência (S_{50}) dos mosquitos também foi avaliado pelo GraphPad Prism, usando o método de Kaplan-Meier (Blanford et al., 2005). As comparações das médias de sobrevivência dos mosquitos *A. aegypti* foram calculadas usando análise de variância (ANOVA) realizada no software IBM SPSS® statistics 27. Quando um efeito significativo dos grupos foi observado os dados foram analisados por teste *post-hoc* Duncan com $P < 0,05$ como critério para significância.

A porcentagem da aptidão sanguínea de fêmeas alimentadas ou não com antibiótico foi analisada utilizando o programa Excel (Gonçalves, 2016). E, a avaliação ANOVA foi realizada utilizando o IBM SPSS®.

Tanto as médias de oviposição, quanto a porcentagem de ovos viáveis, de formação de pupas e de adultos foram calculadas utilizando o programa Excel (Gonçalves, 2016). A ANOVA foi utilizada para comparar as médias de oviposição, ovos viáveis, formação de pupas e de adultos através do programa IBM SPSS®. Quando um efeito significativo dos grupos foi observado os dados foram analisados por teste *post-hoc* Duncan com $P < 0,05$ como critério para significância.

4. RESULTADOS

4.1. Bioensaio 01 - Avaliação de diferentes concentrações de *M. anisopliae* contra fêmeas de *A. aegypti*

Os mosquitos expostos às concentrações de 1×10^8 e 1×10^7 conídios/mL apresentaram 100% mortalidade no sétimo dia de avaliação do teste (Figura 10).

Os mosquitos expostos à concentração de 1×10^6 conídios/mL apresentaram 67,7% de sobrevivência no sétimo dia de avaliação (Tabela 2), sendo estatisticamente significativo ($\chi^2 = 30,97$; $P < 0.0001$) em comparação ao controle que apresentou 98,9% das fêmeas vivas ao final da análise (Figura 10).

Embora significativamente diferente ($\chi^2 = 8.8$; $P = 0.0030$) do resultado do tratamento controle (98,9% de sobrevivência), a concentração de 1×10^5 conídios/mL apresentou taxa de sobrevivência alta (87%) e não foi utilizada nos testes com fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com antibiótico. Já a taxa de sobrevivência da concentração de 1×10^4 conídios/mL (96,6%) foi estatisticamente igual ($\chi^2 = 1.021$; $P < 0.0001$) ao tratamento controle como demonstrado na Figura 10.

Os insetos tratados com as concentrações de 1×10^8 conídios/mL e 1×10^7 conídios/mL apresentaram uma S_{50} de 2 e 4 dias, respectivamente, enquanto para as demais concentrações não foi possível calcular S_{50} nos sete dias de avaliação (Tabela 2).

Com o intuito de escolher a menor concentração fúngica que apresentasse potencial de reduzir a sobrevivência do mosquito em comparação ao grupo

controle, a concentração de 1×10^6 conídios/mL foi selecionada para conduzir os testes posteriores.

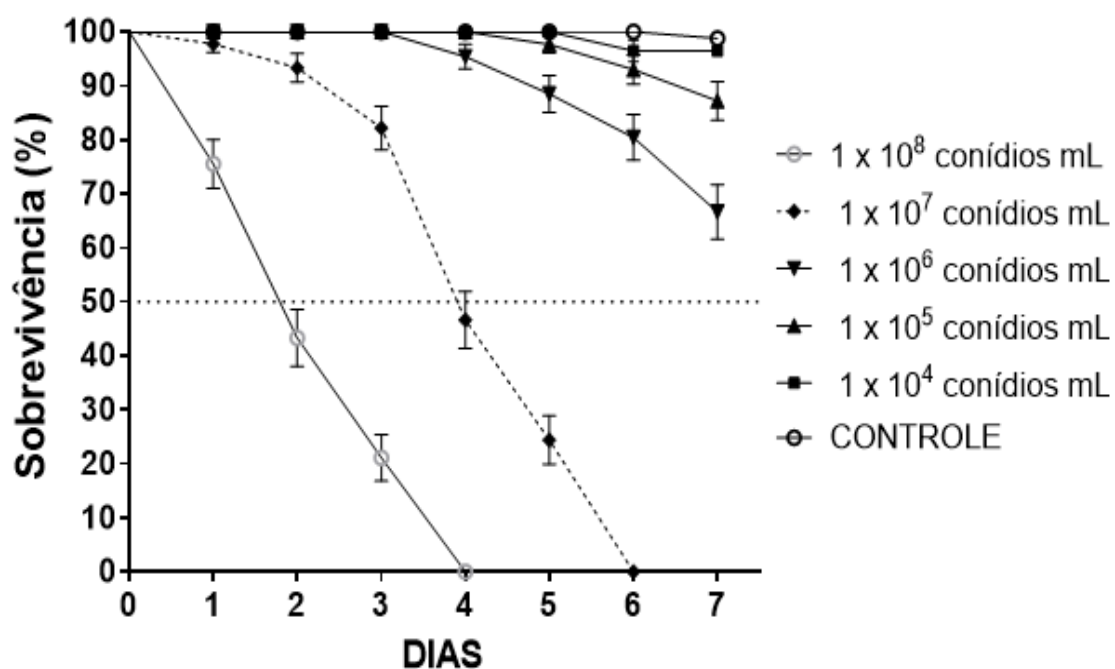


Figura 10 - Sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* tratadas com diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae* (de 1×10^4 a 1×10^8 conídios/mL).

Tabela 2 - Media de sobrevivência (% \pm DP) de fêmeas de *A. aegypti* infectadas com diferentes concentrações do fungo *M. anisopliae*

Tratamentos	Sobrevivência \pm Desvio Padrão	S ₅₀
1×10^8 conídios mL ⁻¹	0 a	2
1×10^7 conídios mL ⁻¹	0 a	4
1×10^6 conídios mL ⁻¹	66,7 \pm 4,57 b	ND
1×10^5 conídios mL ⁻¹	87,8 \pm 1,90 c	ND
1×10^4 conídios mL ⁻¹	96,7 \pm 1,13 d	ND
Controle	98,9 \pm 0,38 d	ND

Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados no teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). ND: valor não determinado.

4.2. Bioensaio 02 - Suscetibilidade de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sacarose + antibiótico ao fungo *M. anisopliae*

Neste experimento foi verificado que as fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico apresentaram menor taxa de sobrevivência quando expostas ao fungo *M. anisopliae*, comparado com testes realizados com fêmeas alimentadas somente com sacarose e depois expostas ao fungo.

As fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico carbenicilina e expostas ao fungo apresentaram significativamente ($\chi^2=13.85$; $P<0.0002$) menor taxa de sobrevivência (38,9%) com relação ao grupo sacarose + fungo (66,7%) (Figura 11A).

Uma taxa de sobrevivência ainda menor (16,7%) (Tabela 3) foi verificada quando as fêmeas alimentadas com sacarose + tetraciclina foram expostas ao fungo *M. anisopliae* em comparação ao grupo de sacarose + fungo (63,3%) ($\chi^2=49,89$; $P<0.0001$) (Figura 11B).

Quando as fêmeas foram alimentadas com a combinação dos dois antibióticos (carbenicilina + tetraciclina) e expostas ao fungo, o percentual de sobrevivência foi de 0% (Tabela 3) depois de 7 dias de avaliação. Em contrapartida, as fêmeas alimentadas somente com sacarose e expostas ao fungo, apresentaram um percentual de 65,6% de sobrevivência no mesmo período ($\chi^2=98,74$; $P<0.0001$) (Figura 11C).

As fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico ou somente com sacarose e não expostas ao fungo (controles) apresentaram taxa de sobrevivência >91,1% independente do antibiótico utilizado (Tabela 3).

Devido à baixa taxa de sobrevivência apresentada pelas fêmeas de *A. aegypti* infectadas com fungo após ingestão do antibiótico tetraciclina (83,3% de mortalidade) e/ou da combinação de carbenicilina + tetraciclina (100% de mortalidade) em sete dias de avaliação, estes antibióticos não foram utilizados nos testes de oviposição nem nos experimentos subsequentes.

O antibiótico selecionado para as avaliações das fases de desenvolvimento do mosquito *A. aegypti* com ou sem microbiota e infectados ou não com fungo *M. anisopliae* foi o carbenicilina.

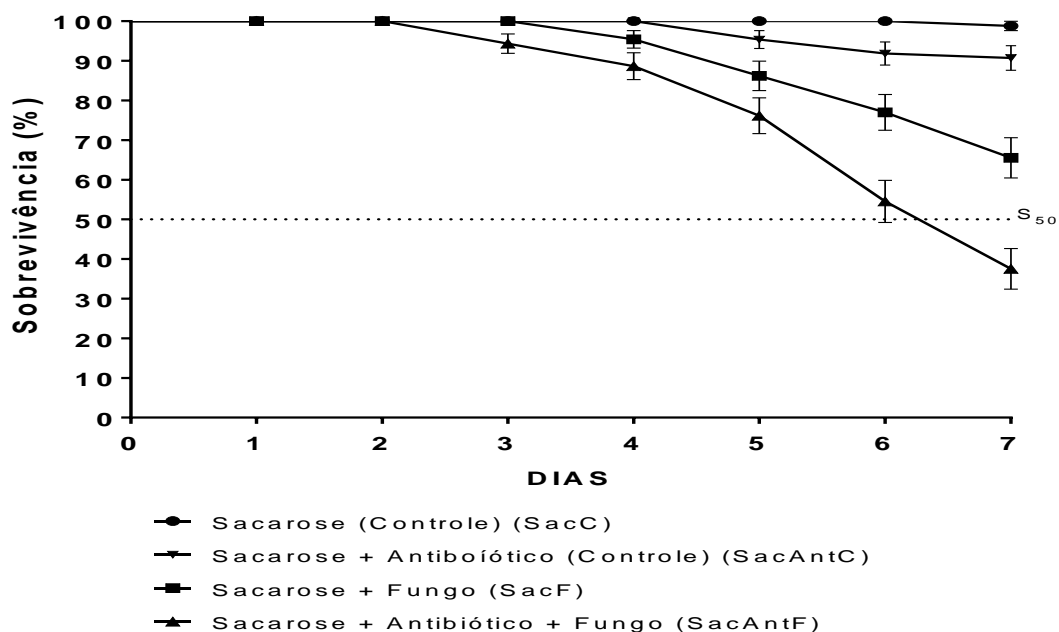


Figura 11A - Sobrevivência de fêmeas *A. aegypti* alimentadas com sacarose com ou sem adição do antibiótico carbenicilina e posteriormente expostas ao fungo *M. anisopliae*

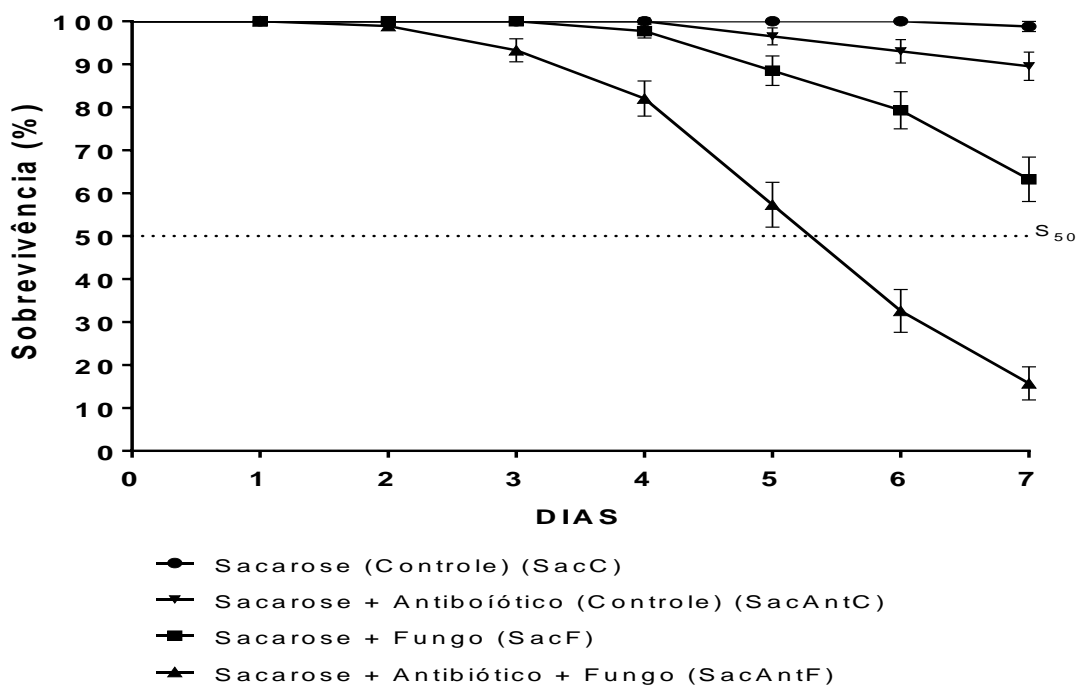


Figura 11B - Sobrevivência de fêmeas *A. aegypti* alimentadas com sacarose com ou sem adição do antibiótico tetraciclina e posteriormente expostas ao fungo *M. anisopliae*

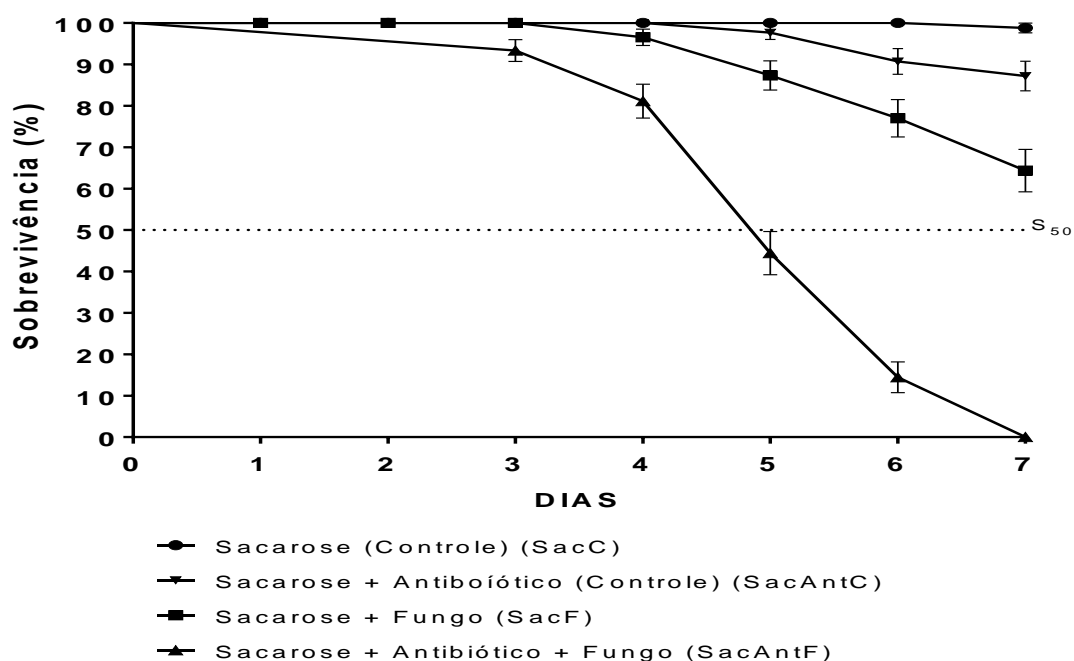


Figura 11C - Sobrevivência de fêmeas *A. aegypti* alimentadas com sacarose com ou sem adição do antibiótico carbenicilina + tetraciclina e posteriormente expostas ao fungo *M. anisopliae*.

Apenas fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico e infectadas com o fungo *M. anisopliae* (1×10^6 conídios/mL) apresentaram tempo médio de sobrevivência (S_{50}) em 7 dias de avaliação.

As fêmeas alimentadas somente com sacarose e infectadas com fungo apresentaram sobrevivência superior a 50% (66,7%, 63,3%, 65,6%) (Tabela 3), assim como os controles: fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico (acima de 88,9% de sobrevivência independente do antibiótico utilizado) e fêmeas alimentadas somente com sacarose (98,9% de sobrevivência), conforme demonstra a Tabela 3.

Tabela 3 - Média de Sobrevivência (%±Desvio Padrão) e Tempo Médio de Sobrevivência (S₅₀) de fêmeas *A. aegypti* alimentadas com sacarose ou sacarose + antibiótico carbenicilina, tetraciclina ou com a combinação de ambos os antibióticos e posteriormente infectadas com fungo

TRATAMENTO	SOBREVIVÊNCIA (%)	S ₅₀
Sacarose + carbenicilina + fungo	38,9 ± 7,36 a	7
sacarose + fungo	66,7 ± 4,39 b	ND
Sacarose + carbenicilina (controle)	91,1 ± 1,68 c	ND
sacarose (controle)	98,9 ± 0,47 d	ND
Sacarose + tetraciclina + fungo	16,7 ± 9,45 e	6
Sacarose + tetraciclina (controle)	90,0 ± 1,60 c	ND
sacarose + carbenicilina + tetraciclina + fungo	0 f	5
Sacarose + carbenicilina + tetraciclina (controle)	88,9% ± 2,29 c	ND

Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados no teste *post-hoc* de Duncan (5% probabilidade). ND: não determinado.

*Os testes realizados com fêmeas alimentadas somente com sacarose e infectadas ou não com o fungo *M. anisopliae* não apresentaram diferença significativa nos experimentos realizados com os diferentes antibióticos, assim não foram incluídos nessa tabela, sendo representados pelos resultados dos testes realizados com o antibiótico carbenicilina.

4.3. Bioensaio 03 - Sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* expostas ao fungo *M. anisopliae* em diferentes períodos após ingestão de dieta com carbenicilina

A Figura 12 mostra as curvas de sobrevivência diárias de fêmeas de *A. aegypti* expostas durante 3 dias a alimentadores de sacarose com ou sem o antibiótico carbenicilina e posteriormente expostas ao fungo em diferentes períodos de tempo (0, 3, 6 e 9 dias) após alimentação.

A Figura 12A demonstra a sobrevivência dos mosquitos que foram infectados com o fungo imediatamente após exposição do alimentador de sacarose + antibiótico (denominado “zero dias”).

No sétimo dia de avaliação, as fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico e pulverizadas com fungo (SacAntF) apresentaram taxa de

sobrevivência significativamente menor (38,9%) ($\chi^2=13.85$; $P<0.0002$), quando comparadas com fêmeas alimentadas apenas com sacarose e infectadas com o fungo (SacF) que foi 66,7% de sobrevivência.

Os tratamentos controle (sem exposição ao fungo) também apresentaram diferença estatística entre si. Fêmeas alimentadas apenas com sacarose e tratadas com TW (SacC) apresentaram taxa de sobrevivência (98,9%) maior do que as fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico e tratadas com TW (SacAntC) que apresentaram 91,1% de sobrevivência ($\chi^2=5.71$; $P<0.0169$).

As fêmeas expostas ao fungo no terceiro dia pós-alimentação com sacarose + antibiótico, apresentaram taxa de sobrevivência significativamente menor (41%) ($\chi^2=10.55$; $P=0.0012$), quando comparado com o mesmo teste com alimentação com sacarose sem antibiótico (65,6%). O tratamento controle SacAntC, apresentou taxa de sobrevivência significativamente menor (93,3%) comparada com SacC (98,9% de sobrevivência); ($\chi^2=3.661$; $P=0.0557$) como mostrado na Figura 12B.

Em testes realizados seis dias após alimentação com antibiótico, as fêmeas *A. aegypti* alimentadas com sacarose + carbenicilina e expostas ao fungo *M. anisopliae* apresentaram uma significativa redução na taxa de sobrevivência (46,7%) ($\chi^2=6.764$; $P=0.0093$), quando comparado ao grupo alimentado com sacarose + fungo (64,4%). Entretanto, o grupo controle SacAntC (não exposto ao fungo), apresentou 94,4% de sobrevivência, valor significativamente igual ao de fêmeas alimentadas somente com sacarose (98,9% de sobrevivência) ($\chi^2=3.658$; $P=0.0558$) (Figura 12C).

Pode-se verificar que quando as fêmeas de *A. aegypti* foram expostas ao fungo 9 dias após alimentação com sacarose ou sacarose + antibiótico carbenicilina, o grupo SacAntF não apresentou mais diferença significativa ($\chi^2=0.3876$; $P=0.5336$) na taxa de sobrevivência (60%), comparado com SacF (64,4% de sobrevivência).

Os testes realizados sem infecção fúngica (SacAntC e SacC) no período de 9 dias após ingestão de sacarose + antibiótico ou somente sacarose, também apresentaram taxas de sobrevivência significativamente iguais, 96,7% em SacAntC e 97,8% nas SacC ($\chi^2=0.2019$; $P<0.6532$) (figura 12D).

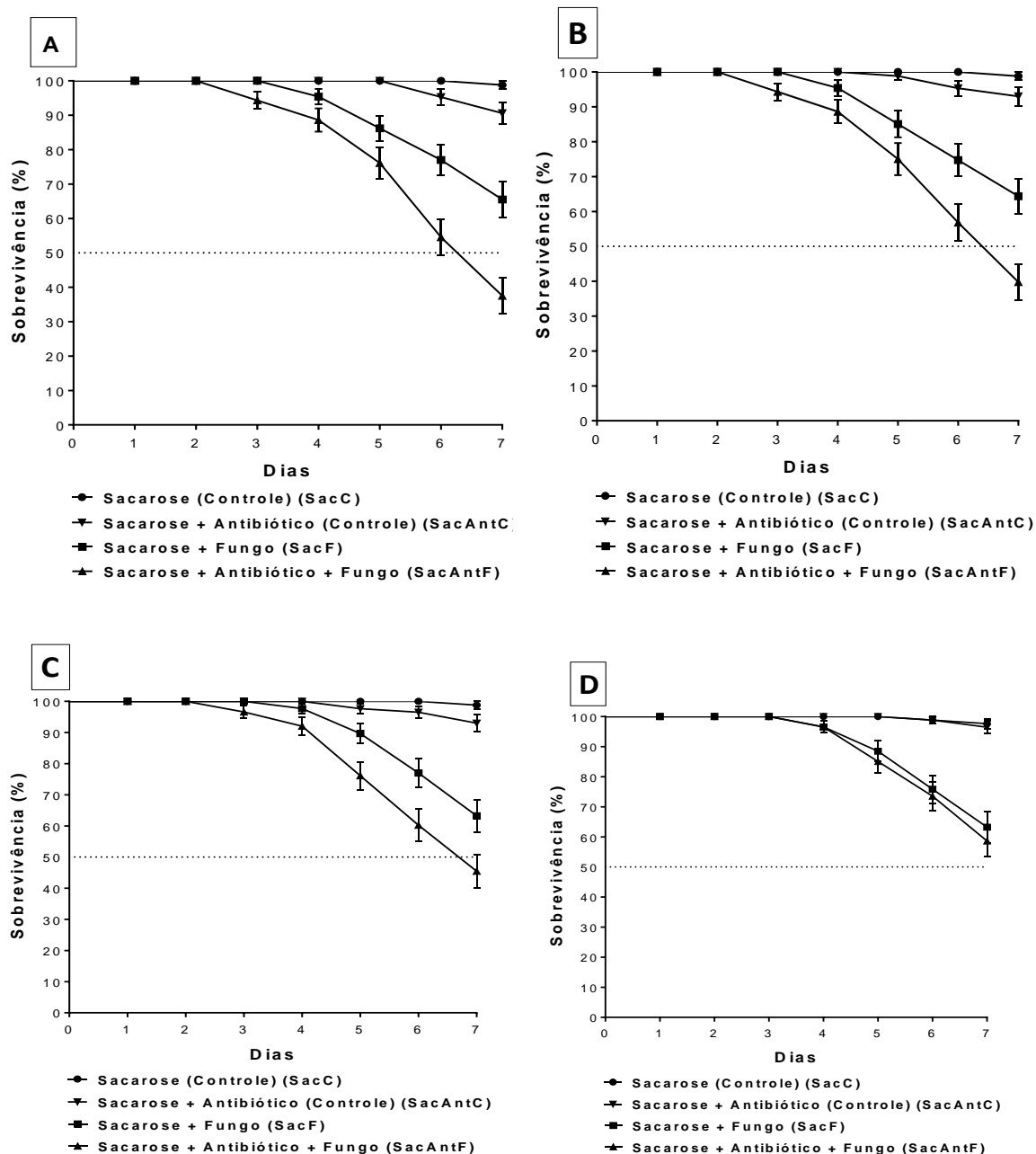


Figura 12 - Sobrevivência de fêmeas *A. aegypti* depois do tratamento com fungo *M. anisopliae* a diferentes períodos de tempo pós-ingestão de antibiótico. A - Zero dias; B - três dias; C - seis dias; D - nove dias. Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico e infectadas com fungo (SacAntF); Fêmeas alimentadas com sacarose e infectadas com fungo (SacF); Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico e tratadas com TW (controle) (SacAntC); Fêmeas alimentadas com sacarose e tratadas com TW (controle) (SacC).

Na avaliação de SacAntF foi verificado que a menor taxa de sobrevivência ocorreu quando as fêmeas foram infectadas imediatamente após (dia zero)

alimentação com sacarose + antibiótico (38,9% de sobrevivência) e a maior taxa de sobrevivência foi observada quando mosquitos foram tratados com fungo no 9º dia após alimentação com sacarose + antibiótico (60% de sobrevivência). Esse tratamento apresentou diferença significativa entre os quatro períodos (0, 3, 6 e 9 dias) ($F_{3,11} = 36,3$; $P < 0,01$). Já para SacF, foi observado que as taxas de sobrevivência desses mosquitos (65,5%, 65,5%, 64,4% e 64,4%) foram estatisticamente iguais ($F_{3,11} = 0,333$; $P > 0,01$) nos quatro períodos (Tabela 4).

Quando se avaliou o tratamento controle (SacAntC), foi verificado que a taxa de sobrevivência (96,7%) observada no 9º dia após alimentação com sacarose + antibiótico, foi estatisticamente maior comparada com as taxas (91,1%; 92,2% e 93,3%) dos períodos anteriores (0, 3 e 6 dias, respectivamente) ($F_{3,11} = 7,0$; $P < 0,01$). O tratamento controle (SacC) apresentou homogeneidade nos períodos de teste, resultando em mais de 97,8 % de sobrevivência, independente do período avaliado (Tabela 4).

Ao avaliar o tempo médio de sobrevivência (S_{50}), para mosquitos infectados com *M. anisopliae*, foi verificado que SacAntF nos períodos de 0, 3 e 6 dias após ingestão de sacarose + antibiótico, apresentou valor de S_{50} de 7 dias. Quando a infecção foi realizada no período de nove dias após ingestão de sacarose + antibiótico, o tratamento SacAntF não apresentou valor de S_{50} , sugerindo que a ação do antibiótico foi reduzida. As fêmeas alimentadas somente com sacarose e infectadas com o fungo (SacF) e os tratamentos controle (SacAntC e SacC) não apresentaram S_{50} nos 7 dias de avaliação (Tabela 4).

Tabela 4 - porcentagem de Sobrevivência (% ± Desvio Padrão) e Tempo Médio de Sobrevivência (S₅₀) de fêmeas de *A. aegypti* tratadas com o fungo *M. anisopliae* a diferentes períodos pós-ingestão de sacarose + antibiótico carbenicilina

Tratament os	0 dias		3 dias		6 dias		9 dias	
	Sobrevivênci a (%) ± DP	S ₅₀	Sobrevivênci a (%) ± DP	S ₅₀	Sobrevivênci a (%) ± DP	S ₅₀	Sobrevivênci a (%) ± DP	S ₅₀
Sacarose + Antibiótico + fungo	38,9 ± 7,36 aA	7	41,1 ± 6,75 aA	7	46,7 ± 6,54 aB	7	60,0 ± 5,67 aC	ND
Sacarose + Fungo	66,7 ± 4,39 bA	ND	65,6 ± 4,50 bA	ND	64,4 ± 5,35 bA	ND	64,4 ± 5,06 aA	ND
Sacarose + antibiótico (controle)	91,1 ± 1,95 cA	ND	93,3 ± 1,21 cAB	ND	94,4 ± 1,21 cAB	ND	96,7 ± 0,79 bB	ND
Sacarose (controle)	98,9 ± 0,35 dA	ND	98,9 ± 0,46 dA	ND	98,9 ± 0,35 cA	ND	97,8 ± 0,76 bA	ND

Valores seguidos de letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados no teste *post-hoc* de Duncan (5% de probabilidade). Letras minúsculas: estatística em coluna; letras maiúsculas: estatística em linha. Foram realizadas três repetições deste experimento.

4.4. Bioensaio 4 - Avaliação da influência de alimentação de dietas com antibiótico no repasto sanguíneo de fêmeas de *A. aegypti*

Não houve diferença significativa entre fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico e fêmeas alimentadas somente com sacarose quanto à aptidão por sangue. No total de fêmeas testadas, 78,8 % (± 23,6) que foram alimentadas previamente com sacarose + antibiótico, se alimentaram de sangue. Este valor foi estatisticamente igual ($P > 0,05$) à porcentagem de fêmeas de *A. aegypti* que foram alimentadas somente com sacarose e depois oferecido sangue (87,7% ± 26,3).

4.5. Bioensaio 5 - Influência da infecção fúngica na oviposição de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas apenas com sacarose ou sacarose + antibiótico carbenicilina

Fêmeas de *A. aegypti* infectadas com o fungo *M. anisopliae* (SacAntSanF e SacSanF) apresentaram menor média de oviposição quando comparado com os controles (SacAntSanC e SacSanC).

O tratamento no qual os mosquitos foram alimentados com sacarose + antibiótico + sangue e infectados com fungo (SacAntSanF) apresentou a menor média de oviposição (44,3 ovos/fêmea), comparado com os demais tratamentos SacSanF (68,7 ovos/fêmea), SacAntSanC (81,8 ovos /fêmea) e SacSanC (98,7 ovos/fêmea) ($F_{3,15} = 426,36$; $P < 0,01$) (Figura 13).

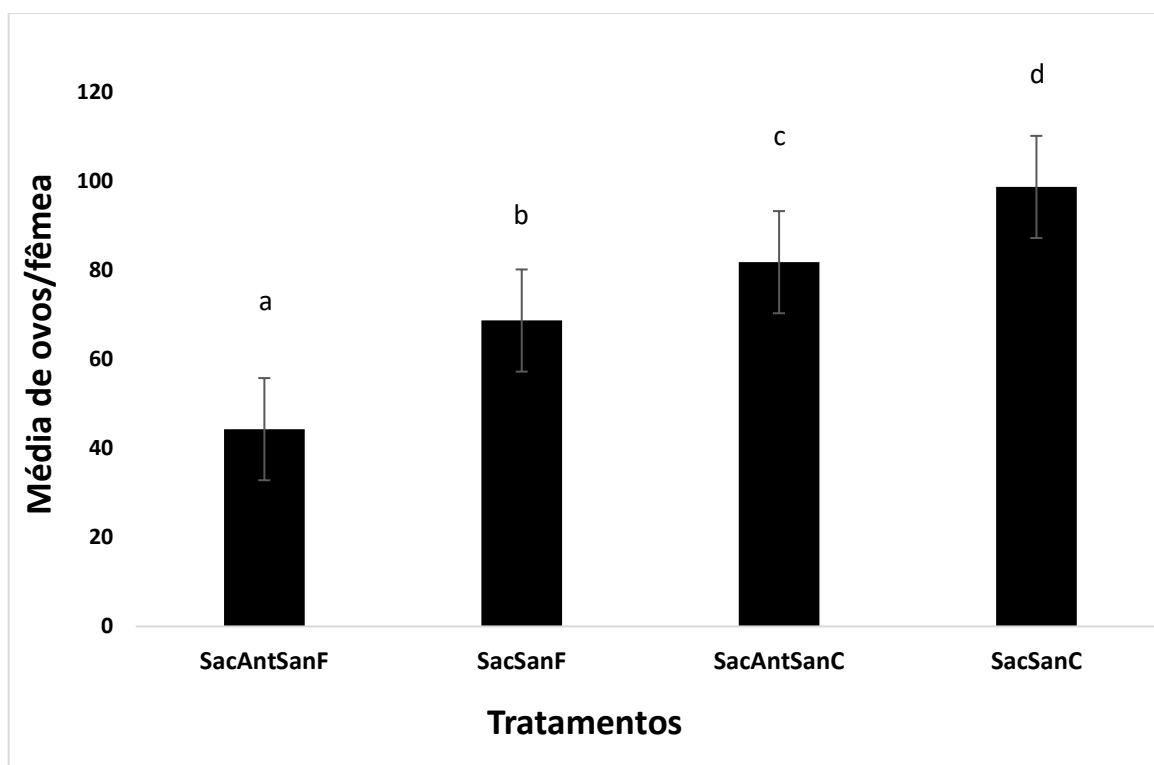


Figura 13 - Oviposição (média do número de ovos por fêmea ± DP) de *A. aegypti* após os seguintes tratamentos: Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e infectadas com fungo (SacAntSanF); Fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e infectadas com fungo (SacSanF); Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e tratadas com TW (SacAntSanC); Fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e tratadas com TW (SacSanC). Os valores com letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados entre si usando ANOVA seguido por teste post-hoc de Duncan (5% probabilidade).

4.6. Bioensaio 6 - Viabilidade de ovos de *A. aegypti* oriundos de fêmeas alimentadas com sacarose ou com sacarose + antibiótico e infectadas com *M. anisopliae*

Os ovos oriundos de fêmeas de *A. aegypti* infectadas com o fungo *M. anisopliae* (SacAntSanF e SacSanF) apresentaram menor taxa de eclosão larval quando comparados com os controles (SacAntSanC e SacSanC). Os ovos oriundos de fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e infectadas com fungo (SacAntSanF) apresentaram 47,9% de eclosão, e ovos oriundos de fêmeas alimentadas somente com sacarose + sangue e infectadas com fungo (SacSanF) apresentaram 68,5% de eclosão (Figura 14).

Estatisticamente, a porcentagem de larvas eclodidas de ovos oriundos de SacAntSanF foi significativamente menor (47,9% de eclosão), comparada com os outros três tratamentos (SacSanF, SacAntSanC e SacSanC, e) ($F_{3,15} 2724$; $P < 0,01$).

Nos ensaios para avaliar a viabilidade dos ovos colocados por mosquitos controle (SacAntSanC e SacSanC), não foi observada diferença significativa entre fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e tratadas com TW (SacAntSanC) (96,1% de eclosão larval) e fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e tratadas com TW (SacSanC) que apresentaram 96,4% de eclosão larval (Figura 14) ($F_{3,15} 2724$; $P > 0,01$) mostrando que o antibiótico não afetou a embriogênese do mosquito.

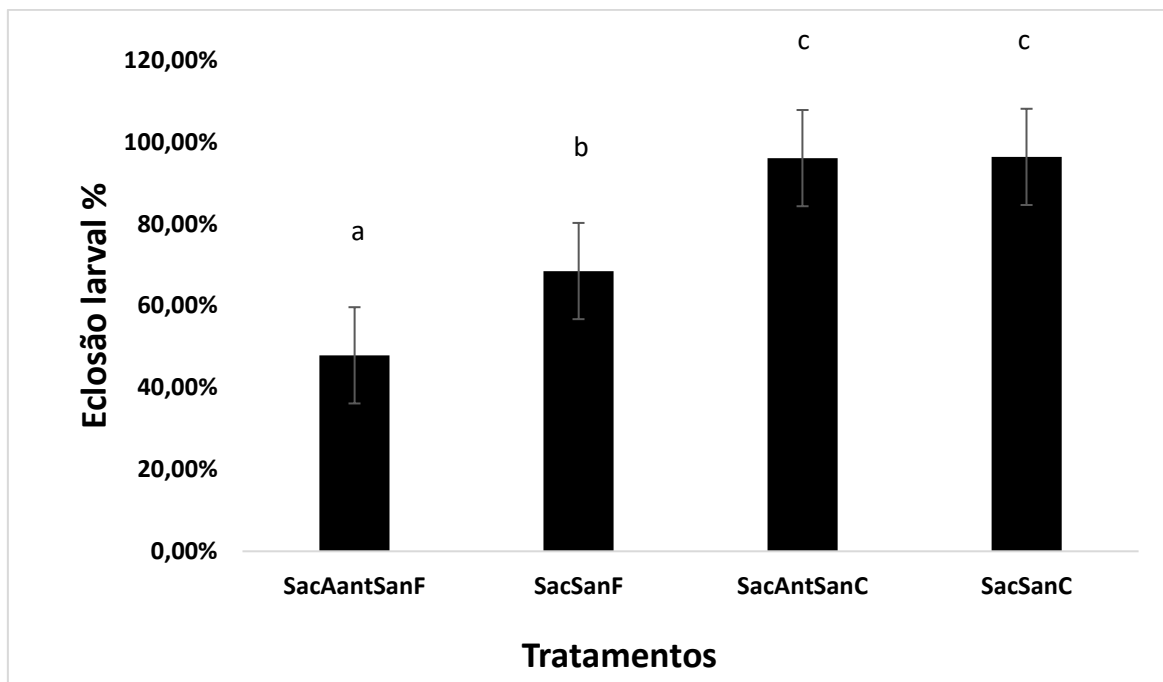


Figura 14 - Porcentagem de eclosão de larvas (\pm DP) oriundas de ovos postos por fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com diferentes dietas e tratadas com fungo *M. anisopliae*. Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e infectadas com fungo (SacAntSanF); Fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e infectadas com fungo (SacSanF); Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e tratadas com TW (controle) (SacAntSanC); Fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e tratadas com TW (controle) (SacSanC). Os valores com letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando ANOVA e teste post-hoc de Duncan (5% probabilidade).

4.7. Bioensaio 6.1 - Avaliação da formação de pupas e emergência de adultos oriundos de ovos produzidos por fêmeas *A. aegypti* expostas aos diferentes tratamentos

As larvas oriundas de fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e infectadas com fungo (SacAntSanF) apresentaram a menor taxa de formação de pupas (52,6% das larvas deram origem a pupas e 47,4% morreram) comparado com os demais tratamentos ($F_{3,15}$ 1214; $P < 0,01$) (Figura 15). Todas as pupas formadas neste tratamento se desenvolveram em adultos (Tabela 5).

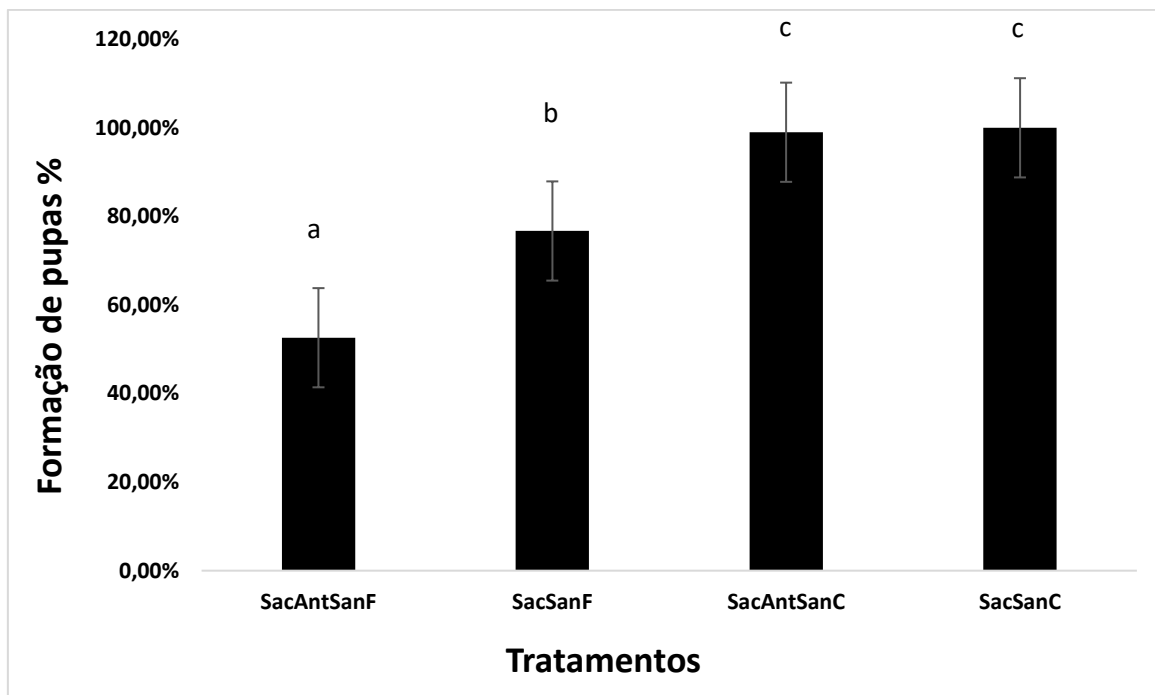


Figura 15 - Porcentagem de pupas formadas de larvas oriundas de ovos depositados por fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose + sangue ou sacarose + antibiótico + sangue e infectadas ou não com o fungo *M. anisopliae*. Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + e infectadas com fungo (SacAntSanF); Fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e infectadas com fungo (SacSanF); Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e tratadas com TW (controle) (SacAntSanC); Fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e tratadas com TW (controle) (SacSanC). Os valores com letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando ANOVA e teste post-hoc de Duncan (5% probabilidade).

A Tabela 5 mostra a média do total de ovos postos por 12 fêmeas de *A. aegypti* em cada tratamento. Dos 532 ovos colocados por fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e infectadas com fungo (SacAntSanF), foi observada significativamente uma menor taxa de eclosão larval (47,9%) quando comparado com a eclosão larval dos ovos postos por fêmeas nos demais tratamentos SacSanF (824 ovos: 68,5% de eclosão de larvas), SacAntSanC (981 ovos: 96,1% de eclosão larval) e SacSanC (1185 ovos: 96,4% de eclosão larval) ($F_{3,15} 1214$; $P < 0,01$).

Das larvas oriundas de ovos do tratamento de fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e infectadas com fungo (SacSanF), 76,7% formaram pupas, e

dessas pupas, todas se desenvolveram em adultos. Entretanto, 23,3% das larvas morreram antes de formarem pupas (Tabela 5).

A porcentagem de larvas que eclodiram de ovos produzidos por fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e tratadas com TW que se transformaram em pupas foi de 99,0%. Destas pupas, 100% emergiram em mosquitos adultos. Todas as larvas que eclodiram dos ovos produzidos por fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e tratados com TW sobreviveram e se desenvolveram em pupas e adultos (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de ovos, taxa de eclosão de larvas, mortalidade larval, formação de pupas e emergência de adultos oriundos de fêmeas de *A. aegypti*

Tratamentos	Total de oviposição	% de larvas eclodidas	% de mortalidade larval	% de formação de pupas	% de emergência de adultos
SacAntSanF	532a	47,9%a	47,4%a	52,6%a	100%a
SacSanF	824b	68,5%b	23,3%b	76,7%b	100%a
SacAntSanC	981c	96,1%c	1%c	99,0%c	100%a
SacSanC	1185d	96,4%c	0%c	100%c	100%a

Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e infectadas com fungo (SacAntSanF); Fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e infectadas com fungo (SacSanF); Fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e tratadas com TW (controle) (SacAntSanC); Fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e tratadas com TW (controle) (SacSanC). Os valores com letras diferentes indicam que os resultados foram estatisticamente diferentes quando comparados usando ANOVA e teste post-hoc de Duncan (5% probabilidade). A estatística está representada em coluna.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho reportou o impacto do isolado ESALQ 818 de *M. anisopliae* na sobrevivência de fêmeas de *A. aegypti* tratadas ou não com antibiótico. Além disso, o estudo apresentou resultados promissores do isolado fúngico sob a oviposição, a taxa de eclosão larval, bem como, o desenvolvimento de pupas e adultos.

Nossos resultados demonstraram o potencial adulticida do isolado ESALQ 818 de *M. anisopliae* contra *A. aegypti*. Os resultados mostraram que ocorreu uma redução de 100% na sobrevivência dos mosquitos em 4 dias de avaliação utilizando concentração de 1×10^8 conídios/mL.

Estudos de patogenicidade de *M. anisopliae* contra o mosquito *A. aegypti* adulto já mostraram que esse fungo é altamente virulento (Paula, 2008; Carolino et al., 2014, Imad-Silva et al., 2017). Paula, (2008) verificou que a infecção pelo método de pulverização utilizando-se a concentração de 1×10^8 conídios/mL, resultou em um valor de S_{50} de 2 dias.

Aqui verificamos, que a concentração de 1×10^6 conídios/mL de *M. anisopliae* resultou em uma queda na sobrevivência (67,7%) de *A. aegypti* adultos depois de 7 dias de avaliação. Esta concentração foi selecionada, uma vez que as concentrações mais altas mataram rapidamente as fêmeas de *A. aegypti*, o que inviabilizaria a condução dos experimentos envolvendo a ovogênese, entre outros.

Os resultados da presente pesquisa mostraram que fêmeas de *A. aegypti*, alimentadas com antibiótico, são mais suscetíveis ao fungo entomopatogênico *M.*

anisopliae do que fêmeas não tratadas com antibiótico. O intestino médio do mosquito *A. aegypti* abriga uma grande diversidade de microrganismos (Osei-Poku et al., 2012; Champion e Xu, 2017), bactérias em sua maioria (Flavia et al., 2007; Wang et al., 2011; Ramirez et al., 2012; Minard et al., 2013).

A propagação bem-sucedida de mosquitos em todo o mundo pode estar parcialmente associada à simbiose com microrganismos, especialmente bactérias (Zouache et al., 2011).

Estudos têm mostrado que a microbiota presente no intestino de mosquitos é importante para a digestão sanguínea (Gusmão et al., 2010; Gaio et al., 2011), fecundidade (Hill e Campbell 1973; Nogge, 1976; Gaio et al., 2011) e poderia fortalecer o sistema imunológico do inseto, aumentando indiretamente a proteção contra parasitas (Dong et al., 2009; Rodrigues et al., 2010; Barletta et al., 2017).

Bactérias intestinais de mosquitos podem ter um importante papel na proteção desses insetos contra parasitas ingeridos junto com sangue (Dong et al., 2009). Bactérias gram-negativas do intestino médio de *Anopheles* são conhecidas por reduzirem consideravelmente o número de oocistos do *Plasmodium* em mosquitos infectados com esse protozoário causador da malária (Seitz et al., 1987; Beier et al., 1994).

Pesquisas realizadas por Schlein et al. (1985) mostraram que a prevalência de microrganismos no trato digestivo de fêmeas de flebotomíneos possui efeito negativo na transmissão da leishmaniose em áreas endêmicas. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência da microbiota intestinal na sobrevivência e no desenvolvimento de mosquitos infectados, via tegumento, por fungos entomopatogênicos.

Nossos estudos indicam que mosquitos alimentados com antibiótico são mais suscetíveis à infecção fúngica. Estudos já mostraram que as vias de sinalização imunológica protegem os insetos da exposição contínua a patógenos invasores e micróbios oportunistas, além de regular a microbiota natural (Meister et al., 2009; Tawidian et al., 2019).

Em mosquitos, o papel da microbiota do intestino médio em influenciar a via do IMD foi demonstrado através da indução do gene de defesa REL2 no intestino médio e corpo gorduroso, uma vez que, a eliminação da microbiota natural ocasionada pela utilização do antibiótico, prejudicou a indução dessa via

imunológica na defesa contra patógenos (Barletta et al., 2017). Isso pode explicar o fato de, na presente pesquisa, os mosquitos com microbiota intestinal normal apresentarem uma taxa de sobrevivência (66,7%) significativamente maior do que mosquitos tratados com antibiótico (38,9% de sobrevivência).

A indução das vias de sinalização imunológica pode levar à produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), que neutralizam os patógenos invasores. Os AMPs são pequenos peptídeos produzidos pelos hemócitos, corpo gorduroso e intestino médio em resposta aos sinais recebidos no reconhecimento de um patógeno (Meister et al., 2009; Cabral et al., 2020).

Assim, os resultados encontrados neste estudo mostram que, a ausência da microbiota aumentou a suscetibilidade de *A. aegypti* ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, sugerindo que a presença da microbiota intestinal deve ajudar na defesa deste inseto contra infecção por patógenos, inclusive aqueles que infectam via penetração do tegumento.

Aqui, não foi avaliada a expressão gênica de peptídeos antimicrobianos (PAMPs) e nem a carga bacteriana intestinal, porém sugerimos, que após afetar negativamente a microbiota intestinal do mosquito *A. aegypti* com a antibióticoterapia, o sistema imunológico do mosquito não estaria sendo estimulado em todo seu potencial para barrar a infecção fúngica do isolado de *M. anisopliae*.

Além disso, o fungo poderia liberar toxinas como a destruxina e potencializar o parasitismo. Wei et al. (2017) avaliaram a suscetibilidade do mosquito *Anopheles stephensi* com ou sem microbiota, ao fungo *B. bassiana* e observaram que os mosquitos alimentados com antibiótico foram menos suscetíveis à infecção pelo entomopatógeno do que mosquitos com microbiota intestinal normal. O estudo demonstrou que mosquitos com microbiota normal e infectados com *B. bassiana* tiveram a resposta imune regulada negativamente. Isso provavelmente ocorreu devido à ação da toxina oosporina produzida pelo fungo, que causou um desequilíbrio na microbiota intestinal natural, com um significativo aumento da carga bacteriana no intestino e uma diminuição significativa na diversidade dessas bactérias. Também foi observada a translocação da bactéria *Serratia marcescens* do intestino para a hemocele, 96 horas após infecção fúngica, onde se transformou de simbionte intestinal assintomática para patógeno

hemocelético, causando a morte acelerada do mosquito pela interação fungo-bactéria.

Entretanto, é interessante enfatizar que os modelos científicos utilizados foram distintos, visto que, o presente estudo avaliou a suscetibilidade de fêmeas de *A. aegypti* com ou sem microbiota ao fungo *M. anisopliae* e, o estudo de Wei et al. (2017), avaliou *An. stephensi* expostos ao *B. bassiana*. Além disso, outros fatores podem impactar na suscetibilidade de mosquitos a fungos, como o fator nutricional ao qual o mosquito foi exposto (Paula et al., 2011). Portanto, espécies diferentes podem mostrar diferenças fisiológicas.

Interessantemente, Zhang et al. (2018) verificaram que a microbiota intestinal da barata alemã *Blattella germanica* pode desempenhar um papel crucial na proteção contra o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. Foi mostrado que a mortalidade causada pela infecção fúngica nas baratas com bactérias intestinais normais foi menor em relação às baratas tratadas com antibiótico para eliminar as bactérias intestinais.

Mais estudos são necessários para verificar a função das bactérias intestinais na proteção dos mosquitos contra patógenos. Em *Anopheles* e *Aedes*, a remoção da microbiota intestinal com antibióticos torna o mosquito mais suscetível à infecção pelo *Plasmodium*, parasita da malária (Beier et al., 1994) e pelo vírus da dengue (Xi et al., 2008) respectivamente. Bactérias do intestino protegem seus insetos hospedeiros contra patógenos invasores estimulando a resposta imune do hospedeiro (Dong et al., 2009) ou produzindo compostos antimaláricos (Cirimotch et al., 2011).

Neste trabalho, os antibióticos carbenicilina e tetraciclina foram administrados na dose de 200 µg/mL que segundo Gaio et al., (2011) é a dose de escolha para não afetar a sobrevivência dos mosquitos e reduzir cerca de 97% da carga bacteriana em *A. aegypti*. Todavia, alguns estudos relataram que mosquitos adultos são capazes de dramaticamente aumentar o número de bactérias intestinais após a aquisição de uma refeição de sangue (Moll et al., 2001; Gusmão et al., 2010).

No presente estudo mostramos que os efeitos do tratamento com antibiótico não foram permanentes, uma vez que, a taxa de sobrevivência dos mosquitos alimentados com sacarose + antibiótico tornou-se igual à de mosquitos alimentados somente com sacarose em um período de nove dias após ingestão de

carbenicilina. O antibiótico deve ter sido degradado durante o processo de digestão ou excretado nas fezes. Provavelmente, as bactérias restantes se multiplicaram rapidamente após as condições ótimas serem reestabelecidas (Moll et al., 2001).

De fato, os resultados encontrados na presente pesquisa mostram que a redução de bactérias, pela presença de antibiótico na dieta do mosquito, reduziu significativamente o número de ovos postos por fêmea de *A. aegypti*. E, de fato, estudos da fecundidade e da taxa de oviposição de mosquitos indicam que a presença da microbiota intestinal de *A. aegypti* é importante para a produção de ovos nesse inseto (Gaio et al., 2011; Coon et al., 2016a).

Pesquisas realizadas por Gaio et al. (2011) mostraram uma diminuição de 6 a 20% no número de oócitos maduros e uma redução de 14 a 22% na produção de ovos, quando as fêmeas de *A. aegypti* foram tratadas com diferentes antibióticos antes da alimentação de sangue. Aqui encontramos uma redução de 17,2% na taxa de oviposição de fêmeas alimentadas com o antibiótico carbenicilina e posteriormente alimentadas com sangue.

A redução da microbiota intestinal pode ter afetado a lise das hemácias, retardando a digestão das proteínas do sangue, privando os mosquitos de nutrientes essenciais para a produção de ovos (Gaio et al., 2011). Além disso, é importante ressaltar que muitas das bactérias intestinais produzem vitamina B para os mosquitos (Song et al., 2022). Nossos resultados confirmam que a microbiota de *A. aegypti* oriundo do campo, tem um papel importante no processo de produção de ovos.

Acredita-se que as bactérias intestinais de mosquitos são necessárias para que a digestão do sangue ocorra de forma mais eficiente (Gusmão et al., 2010; Gaio et al., 2011). Os aminoácidos resultantes da digestão sanguínea atuam como sinais para ativar a vitelogênese e são críticos para o desenvolvimento dos ovos (Attardo et al., 2005).

Entretanto, os efeitos negativos do tratamento com antibiótico na taxa de oviposição, não afetaram a taxa de eclosão larval nem a formação de pupas ou emergência de adultos oriundos de ovos postos por fêmeas alimentadas com sacarose + antibiótico, comparado com fêmeas alimentadas apenas com sacarose. Mais de 96% dos ovos postos eclodiram, sugerindo que o antibiótico não afetou a

embriogênese dos ovos e nem o desenvolvimento dos demais estágios de vida do mosquito.

De acordo com Kaaya e Hedimbi, (2012), a produção de toxinas por fungos altera a taxa de produção de ovos e de eclosão larval em insetos. De fato, em estudo realizado por Scholte et al. (2006), foi verificado que fêmeas de *An. gambiae* diminuíram a fecundidade depois de estarem infectadas com o fungo *M. anisopliae*.

Outro trabalho mostrou, que fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sangue e infectadas com o fungo *M. anisopliae* (1×10^7 conídios/mL), colocaram 63% menos ovos que os controles (Vieira, 2012). Na presente pesquisa, encontramos uma redução de 31% na taxa de oviposição de fêmeas infectadas com a concentração de 1×10^6 conídios/mL do mesmo fungo. A viabilidade desses ovos também foi reduzida, assim como a formação de pupas, mostrando o potencial desse microrganismo em reduzir populações de mosquitos.

Um estudo da viabilidade de ovos oriundos de insetos adultos infectados com fungo entomopatogênico foi realizado por Baleba et al. (2021) em uma mosca da espécie *Stomoxys calcitrans*. Os resultados mostraram que a taxa de eclosão das larvas oriundas de ovos produzidos por fêmeas dessa mosca, infectadas com *M. anisopliae*, foi significativamente menor (70% menos) comparado com fêmeas controle.

No atual trabalho encontramos uma redução de 28% na taxa de eclosão de larvas oriundas de ovos postos por fêmeas de *A. aegypti* infectadas com fungo. Nossos estudos também mostraram uma diminuição de 23% na taxa de sobrevivência dessas larvas.

Pesquisas anteriores de nosso grupo verificaram a atividade larvicida de *M. anisopliae* em *A. aegypti* (Pereira et al., 2009; Gomes et al., 2015; Paula et al., 2019). Contudo, nesses trabalhos, o fungo foi aplicado diretamente na água junto com a larvas, e, aqui foi avaliado o efeito do fungo nas fêmeas, nos ovos produzidos por fêmeas que sobreviveram à infecção e nas larvas que eclodiram de ovos postos por essas fêmeas.

Segundo Baleba et al. (2021), uma vez infectados por *M. anisopliae*, os insetos têm menor probabilidade de produzirem progênie viável para a próxima geração; contribuindo, portanto, para a redução de sua população.

Metarhizium anisopliae é promissor para utilização em manejo integrado de vetores. (Paula et al., 2011; Carolino et al., 2014; Imad-Silva et al., 2017). Aqui mostramos que quando as fêmeas foram alimentadas com sacarose + antibiótico e posteriormente infectadas com fungo, a taxa de sobrevivência desses insetos apresentou uma expressiva redução. Zhang et al. (2018) observaram uma redução na taxa de sobrevivência da barata alemã *B. germanica* sem microbiota e submetida à exposição fúngica.

Estudos mostraram que a presença da microbiota é um fator importante para a fecundidade de mosquitos (Hill e Campbell 1973; Nogge, 1976; Gaio et al., 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre a influência da interação entre a microbiota intestinal e patógenos fúngicos na produção de ovos em insetos.

Aqui mostramos, que a ingestão de sacarose + antibiótico + sangue seguida de infecção fúngica em fêmeas de *A. aegypti* resultou em uma diminuição de 35% na taxa de oviposição comparado com mosquitos alimentados somente com sacarose + sangue e infectados com fungo. Esses ovos também apresentaram menor viabilidade, resultando em uma taxa de eclosão larval significativamente menor (47,9%) comparado com fêmeas alimentadas apenas com sacarose + sangue e infectadas com fungo (68,5% de eclosão larval).

Contudo, é importante ressaltar, que os estudos aqui realizados registraram que, tanto na presença como na ausência da microbiota, a infecção por *M. anisopliae* foi capaz de interferir na embriogênese dos ovos.

Sabe-se que ao proliferar dentro da hemocele dos insetos, os fungos entomopatogênicos produzem toxinas como a destruxinas, que induzem a patogênese, paralisia, alterações celulares e disfunção do intestino médio, túbulos de Malpighi e tecidos musculares (Samuels et al., 1988; Kershaw et al., 1999; Schrank e Vainstein, 2010). Estes eventos estimulam a morte dos mosquitos entre dois a sete dias após a infecção com doses letais de fungo (Paula et al., 2011; 2013; Imad-Silva et al., 2017). No entanto, antes que a morte ocorra, várias reações incluindo a redução no desenvolvimento, propensão alimentar, reprodução e respostas imunológicas podem ser observadas em insetos infectados com baixa concentração fúngica (Scholte et al., 2006; Cabral et al., 2020; Baleba et al., 2021).

Verificamos que das larvas oriundas de ovos colocados por fêmeas alimentadas com sacarose + sangue e expostos ao fungo, 77% se desenvolveram

em pupas. Em contrapartida, quando as fêmeas foram alimentadas com sacarose + antibiótico + sangue e infectadas com fungo, apenas 53% das suas larvas evoluíram para pupas. Uma explicação para isso é apresentada por Cole, (2003); segundo o autor as toxinas dos fungos podem permanecer no inseto, sendo possível a ocorrência de danos em outras fases de desenvolvimento.

Contudo, de todas as pupas formadas, 100% emergiram em mosquitos adultos, independente do tratamento. Estudos relatam que a microbiota do intestino de larvas de mosquitos é totalmente eliminada no processo de remodelação do intestino durante a metamorfose e, assim, o microbioma do intestino médio de adultos tem que ser repovoado (Jupatanakul et al., 2014; Champion e Xu, 2017). Isso pode explicar o fato de todas as pupas emergidas se transformarem em insetos adultos. Pode explicar também, o fato da fertilidade de *A. aegypti* ser restaurada no segundo ciclo gonotrófico após a suspensão do antibiótico (Gaio et al., 2011). Além disso, fatores relacionados ao sistema imunológico do inseto podem estar sendo expressos positivamente na presença da flora intestinal (Patil et al., 2013; Barletta et al., 2017; Dada et al., 2018).

Considerando a possibilidade de aumentar a eficiência dos fungos no controle biológico de adultos de *A. aegypti*, poderemos investigar a utilização de armadilhas de atração de mosquitos adultos, impregnadas com fungo (Imad-Silva et al., 2017), e incluir no interior das armadilhas, alimentadores contendo sacarose + antibiótico. Assim, as fêmeas ao ingerirem o antibiótico ficariam mais suscetíveis à infecção fúngica e morreriam mais rapidamente, ou teriam uma redução na fecundidade, na viabilidade dos ovos e na formação de pupas. Essa estratégia poderia resultar em uma redução na incidência de doenças transmitidas por *A. aegypti*.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

- A melhor concentração do fungo *M. anisopliae* para manter uma porcentagem alta de mosquitos vivos foi 1×10^6 conídios/mL. Esta concentração foi apropriada para uso em testes para avaliar as consequências das infecções na presença ou ausência da microbiota intestinal;
- Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com antibiótico foram mais suscetíveis ao fungo *M. anisopliae* comparadas com fêmeas alimentadas somente com sacarose;
- O tratamento com antibiótico carbenicilina apresenta um efeito sobre a sobrevivência dos mosquitos mesmo quando os insetos foram expostos ao fungo até 6 dias após ingestão do antibiótico, indicando que a microbiota intestinal demora para recuperar, deixando o mosquito mais suscetível à infecção por um tempo prolongado;
- A alimentação com antibiótico não influenciou no repasto sanguíneo de fêmeas de *A. aegypti*;
- Fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose + antibiótico carbenicilina e infectadas com o fungo *M. anisopliae* apresentaram redução na taxa de oviposição;
- Ovos oriundos de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose + antibiótico carbenicilina e infectadas com o fungo *M. anisopliae* apresentaram taxa de eclosão larval reduzida;
- As larvas oriundas de ovos de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com sacarose + antibiótico e infectadas com o fungo *M. anisopliae* apresentaram menor taxa de

formação de pupas. No entanto, das larvas que conseguiram formar pupas, todas emergiram em mosquitos adultos.

7. BIBLIOGRAFIA

Agência Brasil (2015). *Aedes aegypti*: conheça a história do mosquito no Brasil e suas características. Disponível em:

<https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-12/aedes-aegypti-conheca-historia-do-mosquito-no-brasil-e-suas-caracteristicas>. Acesso em: 16/04/2022.

Ahmad Zaki, Z., Che Dom, N., Ahmed Alhothily, I. (2020). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Treatment on *Aedes* Population Using Different Applications at High-Rise Buildings. **Trop Med Infect Dis.** 5(2):67. Published 2020 May 1. doi:10.3390/tropicalmed5020067.

Albernaz, D. A. S., TA, M. H. H., Luz, C. (2009). Enhanced ovicidal activity of an oil formulation of the fungus *Metarhizium anisopliae* on the mosquito *Aedes aegypti*. **Medical and Veterinary Entomology.** 23:141-147. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00792.x.

Almeida, J. E. M., Filho A. B., Leite, L. G., Bartels, A. P. S., Bueno, R. N. S. (2016). Coleção de fungos entomopatogênicos: biodiversidade para o controle biológico de pragas na agropecuária brasileira. **RG News.** 2(1): 15-19.

Alvarenga, P. H. (2005). **Estudo dos mecanismos de ligação de heme à matriz peritrófica de *Aedes aegypti***. 154 f. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Alves, R. T.; Faria, M. (2010). *Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos*. 47 p.

Alves, S. B., Alves, L. F. A., Lopes, R. B., Pereira, R., Vieira, S. A. (2002). Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). **Journal Applied Entomology**; 126: 504-509.

Alves, S. B., Pereira, R. M. P. (1998). Produção de fungos entomopatogênicos. In: Alves, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ. p.845-867. ISBN: 85-7133-004-2.

Apte-Deshpande, A.; Paingankar, M., Gokhale, M. D., Deobagkar, D. N. (2012). *Serratia odorifera* a Midgut Inhabitant of *Aedes aegypti* Mosquito Enhances Its Susceptibility to Dengue-2 Virus. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0040401.

Araújo, H. R. C., Carvalho, D. O., Ioshino, R. S., Costa da Silva, A. L., Capurro, M. L. (2015). *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**. V.6, p.576-94.

Attardo, G. M., D'Amico, V. (2011). **Key Point Graphics**. Disponível em: <http://www.keypointgraphics.com/portfolio/pf_blood_meal_activation.jpg>. Acesso em: 10/02/2021.

Attardo, G. M., Hansen, I. A., RaikheL, A. S. (2005). Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, n. 7, p. 661-675.

Bale, J. S., Van Lenteren, J. C., Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transaction of the Royal Society B**. 363: 761-776. doi.org/10.1098/rstb.2007.2182.

Baleba, S. B. S., Agbessenou, A., Getahun, M. N., Akutse, K. S, Subramanian, S., Masiga, D. (2021). Infection of the Stable Fly, *Stomoxys calcitrans*, L. 1758 (Diptera: Muscidae) by the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) Negatively Affects Its

Survival, Feeding Propensity, Fecundity, Fertility, and Fitness Parameters. **Frontiers in Fungal Biology**. 2:637817. doi.org/10.3389/ffunb.2021.637817.

Barata, E. A. M. F., Costa, A. I. P., Chiaravalloti, N. F., Glasser, C. M., Barata, J. M. S., Natal, D. (2001). População de *Aedes aegypti* em área endêmica de dengue, sudeste do Brasil. **Revista Saúde Pública**. 35(3):237-242. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102001000300004>.

Barletta, A. B. F., Nascimento-Silva, M. C. L., Talyuli, O. A. C., Oliveira, J. H. M., Pereira, L. O. R., Oliveira, P. L., Sorgine, M. H. F. (2017). Microbiota Activates IMD Pathway and Limits Sindbis Infection in *Aedes aegypti*. **Parasites & Vectors**. 10: 103. doi:10.1186/s13071-017-2040-9.

Barros, N. M. Vargas, L.R.B.; Schrank, A.; Boldo, J.T.; Specht, A. Fungos como agente de controle de pragas. In: Esposito, E.; Azevedo, J. L. (2010). (Eds.). *Fungos - Uma introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia*. 2a ed. Caxias do Sul: EDUCS. p. 491-532.

Becker N., Petrić D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C. and Kaiser A. (2010). *Mosquitoes and their control*. 2^a Edition. Springer Verlag, Heidelberg. 579 p.

Becnel, J. J., White, S. E., Moser, B. A., Fukuda, T., Rotstein, M. J., Undeen, A. H., Cockburn, A. (2001). Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* e *C. quinquefasciatus*. **Journal of General Virology**. 82,275-282. doi: 10.1099/0022-1317-82-2-275.

Beier, M. S., Pumpuni, C. B, Beier, J. C., Davis, J. R. (1994). Effects of para-aminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal Medicine Entomology**. 31:561-565. doi: 10.1093/jmedent/31.4.561.

Beuy, J., Viroj, W. (2016). Fifth serotype of dengue virus: What we should prepare for? **Medical journal, Armed Forces India**, v. 72, n. 2, p. 194. doi:10.1016/j.mjafi.2015.11.015.

Billingsley, P. F.; Lehane, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Lehane, M. J., Billingsley, P. F. (1996). *Biology of the insect midgut*. 1ª edição. Londres: Chapman & Hall, p.86-114.

Bisset, J. A. (2002). Correct use of insecticides: management of resistance. **Revista Cubana Medicina Tropical**, Habana. 54: 202-219.

Bitencourt, R. de O. B., Mallet, J. R dos S., Mesquita, E., Gôlo, P. S., Fiorotti, J., Bittencourt, V. R. E. P., Pontes, G. E., Angelo, I. da C. (2021). Larvicidal activity, route of interaction and ultrastructural changes in *Aedes aegypti* exposed to entomopathogenic fungi. **Acta Trop.** 213:105732.
Doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105732.

Blanford, S., Chan, B. H. K., Jenkins, N. S., D. Turner, R. J., Read, A. F., Thomas, M. B. (2005). Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. **Science**. 308 :1638-1641.

Braga, I. A., Valle, D. (2007a). *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. **Epidemiologia e Serviço de Saúde** v.16 n.4.279-293.
<http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742007000400006>.

Braga, I. A., Valle, D. (2007b). *Aedes aegypti*: *Histórico de controle no Brasil*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Rio de Janeiro. 16: 113-118.

Briones, A. M., Shililu, J., Githure, J., Novak, R., Raskin, L. (2008). *Thorsellia anophelis* is the dominant bacterium in a Kenyan population of adult *Anopheles gambiae* mosquitoes. **The ISME Journal**. 2: 74-82.

Bukhari, T., Middelman, A., Koenraadt, C. J. M., Takken, W. Knols, B. G. L. (2010). Factors affecting fungus-induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. **Malaria Journal**. V. 9, p. 2-15.

Bull, J. J., Turelli, M. (2013). *Wolbachia* versus dengue: Previsões evolutivas. **Evolução, Medicina e Saúde Pública**. p. 197-207.

Cabral, S., de Paula, A., Samuels, R., da Fonseca, R., Gomes, S., Silva, J. R., Mury, F. (2020). *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Immune Responses with

Different Feeding Regimes Following Infection by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Insects**. 1;11(2):95. doi: 10.3390/insects11020095.

Campbell, L.P., Luther, C., Moo Llanes, D., Ramsey, J.M., Danis Lozano, R., Peterson, A.T. (2015). Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. **Philos Trans R. Soc B**. 370, 20140135.

Campos, J., Andrade, C.F.S. (2001). Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**. V. 35, p. 232-236.

Carolino A. T., Teodoro, T. B. P., Gomes, S. A., Silva, C. P., Samuels, R. I. (2021). Production of conidia using different culture media modifies the virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium* against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Vector Borne Diseases**. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.318315>.

Carolino, A. T., Paula, A. R., Silva, C. P., Butt, T. M., Samuels, R. I. (2014). Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**. 7(198): 1-7. doi.org/10.1186/1756-3305-7-198.

Carolino, A.T., Gomes, S. A., Teodoro, T. B. P., Mattoso, T. C., Samuels, R. I. (2019). As pupas de *Aedes aegypti* são altamente suscetíveis à infecção por blastósporos de *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**.13:1629-34.

Carvalho, D. O., Costa da Silva, A. L., Lees, R. S., Capurro, M. L. (2014). Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne diseases. **Acta Trop**. V. 132, P. 170-7.

Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Centro Nacional de Doenças Infecciosas Emergentes e Zoonóticas (NCEZID), Divisão de Doenças Transmitidas por Vetores (DVBD). (2021). Disponível em: <https://www.cdc.gov/mosquitoes/mosquito-control/community/sit/genetically-modified-mosquitoes.html>. Acesso em: 18/02/2022.

Champion, C. J., Xu, J. (2017). The impact of metagenomic interplay on the mosquito redox homeostasis. **Free Radical Biology Medicine**. 105:79-85. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.031.

Chapman, R. F. (1998). *The insects*. Structure and Function. 4^a ED. Cambridge University Press.

Chavasse, D. C., Yap, H. H. (1997). *Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance*. Geneve: WHO; WHO/CTD/WHOPES/97.2.

Cirimotich, C. M., Dong, Y., Clayton, A. M., Sandiford, S. L., Souza-Neto, J. A., Mulenga M, Dimopoulos G. (2011). Natural microbe-mediated refractoriness to Plasmodium infection in Anopheles gambiae. **Science**. 332:855-858. doi: 10.1126/science.1201618.

Claro, L. B. L., Tomassini, H. C. B., Rosa, M. L. G. (2004). Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. **Caderno de Saúde Pública**. 20: 1447-57.

Clements, A. N. (1992). *The biology of mosquitoes*. Development, nutrition and reproduction. London; Chapman and Hall.

Cole, L. (2003). *Programas de Pesticidas, Divisão de Prevenção*. Agência de Proteção Ambiental, Washington, United States of American.

Consoli, R. A. G. B., Oliveira, R. L. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. 1^a Ed. Rio de Janeiro. Fiocruz. p. 228.

Coon, K. L., Brown, M. R., Strand, M. R. (2016a). Gut bacteria differentially affect egg production in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**. 9: 375. doi.org/10.1186/s13071-016-1660-9.

Coon, K. L., Brown, M. R., Strand, M. R. (2016b) Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. **Molecular Ecology**. 25: 5806-5826.

Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R., Strand, M. R. (2014). Rely on their gut microbiota for development. **Molecular Ecology**. 23: 2727-2739. doi: 10.1111/mec.12771.

Costa, J. R. V., Rossi, J. R., Marucci, S. C., Alves, E. C., Volpe, H. X. L., Ferraudo, A. S., Lemos, M. V. F., Desiderio, J. A. (2010). Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**. 39 (5): 757-766. doi:10.1590/S1519-566X2010000500015.

Crotti, E., Crotti, E., Damiani, C., Pajoro, M., Gonella, E., Rizzi, A., Ricci, I., Negri, I., Scuppa, P., Rossi, P., Ballarini, P., Raddadi, N., Marzorati, M., Sacchi, L., Clementi, E., Genchi, M., Mandrioli, M., Bandi, C., Favia, G., Alma, A., Daffonchio, D. (2009). *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of crosscolonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. **Environmental Microbiology**. 11: 3252-3264.

Dada, N., Sheth, M., Liebman, K., Pinto, J., Lenhart, A. (2018). Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors. **Scientific Reports**. 8(1):1006539. doi: 10.1038/s41598-018-20367-4.

Dale, C., Moran, N. A. (2006). Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. **Cell**. 126: 453-65.

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

Darbro, J. M., Johnson, P. H., Thomas, M. B., Ritchie, S. A., Kay, B. H., Ryan, P. A. (2012). Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-Field conditions Am. The **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 86: 656-664

Darlington, S. (2015). "Brazil warns against pregnancy due to spreading virus" CNN [S.I.] Consultado em 23 de dezembro de 2015.

David, M. R. Santos, L. M. B. dos; Vicente, A. C. P., Maciel, R. de F., R. (2016). Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.119: 577-587.
<https://doi.org/10.1590/0074-02760160238>.

De Melo, D. R, Reis, R. C, Bittencourt, V. R. (2006). In vitro patogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, on the tick *Boophilus microplus* (Canestrini 1887). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**. V. 15, p. 157-162.

Debach, P., Rosen, D. (1991). *Biological control by natural enemies*. Cambridge University Press. 2 ed. 456, p.

Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., Haddow, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal society of tropical medicine and Hygiene**. 46: 509-520.

Dillon, R. J.; Dillon, V. M. (2004). The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**. 49: 71-92.

Dong, Y., Manfredini, F., Dimopoulos, G. (2009). Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLoS Pathogens**.5(5):1000423. doi.org/10.1371/journal.ppat.1000423.

DrugBank (2021). Estrutura da Tetraciclina. Disponível em: <https://www.souenfermagem.com.br/termos-tecnicos/tetraciclinas>. Acesso em: 08/02/2022.

Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., Hayes, E. B. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. Journal of Medicine*. 360: 2536-2543.

Dutra, H. L., Santos, L. M., Caragata, E. P., Silva, J. B., Villela, D. A., Maciel de Freitas, R. (2015). From lab to field: the influence of urban landscapes on the invasive potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. V. 9: e0003689.

Edman, J. D., Strickman, D., Kittayapong, P., Scott, T. W. (1992). Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand rarely feed on sugar. **Journal of Medicine Entomology**. 29: 1035-1038.

Elandt-Johnson, R.C., Johnson, N. L. (1980). *Survival models and data analysis*. New York: John Wiley and Sons. ISBN: 978-0-471-03174-1.

Engel, P.; Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. **FEMS Microbiol Review**. 37: 699-735.

Esper, P. M. (2016). Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Disponível em: <<http://pauloomarcio.deviantart.com/art/Aedes-aegypti-2617160162011>>. Acesso em: 26/05/2020.

Farnesi, L. C., Martins, A. J., Valle, D., Rezende, G. L. (2009). Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. 104 (1): 124-126. Doi: 10.1590/S0074-02762009000100020.

Fernandes, P. M., Alves, S. B (1991). Controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832). Isoptera: (Termitidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em condições de campo. An **Soc Entomol Brasil**. V. 20, p. 45-49.

Flavia, 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. (2007). Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. 104:9047-9051. doi: 10.1073/pnas.0610451104.

Forattini, O. P. (1962). *Entomologia médica*. São Paulo: Edusp, V. 1.

Forattini, O. P. (2002). *Culicidologia médica*. São Paulo: Edusp. V.2, 864 p.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). (2001). Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. Ministério da Saúde. 3ª ed. Ver. Brasília, p. 83.

G1. Globo (2015). Casos confirmados de microcefalia chegam a 863, segundo ministério. Disponível em: <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2016/03/casos-confirmados-de-microcefalia-chegam-863-segundo-ministerio.html>. Acessado em: 18/03/2016.

Gaio, A. O.; Gusmão, D. S.; Santos, A. V.; Berbert-Molina, M. A.; Pimenta, P. F.; Lemos, F. J. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.). **Parasites & Vectors**. 4: 105. doi: 10.1186/1756-3305-4-105

García-Munguía, A. M., Hernández, J. A. G., Tellez, E. A. R., Pérez, M. A. R., Filiberto Reyes-Villanueva, F. R. (2011). Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. **Parasites & Vectors**. 4: 24.

Gilbert, S. F., Raunio, A. M. (1997). *Embryology: Constructing the Organism*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. ISBN 0-87893-237-

Gomes, S. A., Paula, A. R., Ribeiro, A., Moraes, C. O. P, Santos, J. W. A. B., Silva C. P., Samuels, R. I. (2015). Neem oil increases the efficiency of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites & Vectors**. 8(669):1-8. doi.org/10.1186/s13071-015-1280-9.

Gonçalves, B. B. S. (2016). **Softwares de apoio à pesquisa científica: levantamento e análise de características**. Monografia - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 57. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/165459>. Acesso em: 26/04/2021.

Grimes, A. J. (1980). *Humand Red Cell Metabolism*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

Guia de Vigilância em Saúde (2017). Ministério da Saúde: 2º edição. Vol. único. Brasília.

Guia de vigilância em saúde (2019). Ministério da saúde. 3ª edição. Vol. único, Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 18/01/2022.

Guimarães, D. O., Momesso, L. S. e Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 667-679.

Gusmão, D. S., Santos, A. V., Marini, D. C., Bacci, M., Berbert-Molina, M. A., Lemos, F. J. A. (2010). Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. **Acta, Tropical**.115: 275-281.

Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy P., Farrar, J., Gubler, D.J. (2010) Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol. Suppl** 12:S7-16.

Hansen, I. A., Attardo, G. M., Park, J. H., Peng, Q., Raikhel, A. S. (2004). Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U S A., v. 101, n. 29, p. 10626-10631.

Harrington, L. C., Edman, J. D., Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Society Medicine Entomology**. 38: 411-422.

Hemingway, J., Ranson, H. (2005). Chemical Control of Vectors and Mechanisms of Resistance. In: Marquardt, W. C. (Ed.). **Biology of Disease Vectors**. Fort Collins: Elsevier, cap.41.

Hill, P. D. S., Campbell, J. A. (1973). The production of symbiont-free *Glossina morsitans* and an associated loss of female fertility. Transactions of the Royal **Society of Tropical Medicine Hygiene**. 67:727-728. doi: 10.1016/0035-9203(73)90051-5.

Hine, R. M., Rouhier, M. F., Park, S. T., Qi, Z., Piermarini, P. M., Beyenbach, K. W. (2014). The excretion of NaCl and KCl loads in mosquitoes. 1. Control data. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.307, n.7, p.R837-R849.

Hoffmann, A., Turelli, M. (1988). Unidirectional incompatibility in *Drosophila simulans*: inheritance, geographic variation and fitness effects. **Genetics**. 119(2):435-44. doi: 10.1093/genetics/119.2.435.

Imad-Silva, L. E. (2015). **Novo método de controle do mosquito *Aedes aegypti* utilizando uma armadilha com pano preto impregnado com fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* associado a um atraente sintético**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Mestrado em Produção Vegetal. 72p.

Imad-Silva, L. E; Paula, A. R; Ribeiro, A; Butt, T. M; Silva, C. P; Samuels R. I. S. (2017). A new method of deploying entomopathogenic fungi to control adult *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Applied Entomology**. 142:59-66. doi.org/10.1111/jen.12402.

Jupatanakul, N., Sim, S., Dimopoulos, G. (2014). The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. **Viruses**. 6:4294-4313. doi: 10.3390/v6114294.

Kaaya, G. P.; Hedimbi, M. (2012). The use of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, as bio-pesticides for tick control. **International Journal of agricultural sciences**. 2(6): 245-250.

Katsuna, S; Kato, Y; Takasaki, T; Moi, M. L; Kotaki, A; Uemura, H; Matono, T; Fujiya, Y; Mawatari, M; Takeshita, N; Hayakawa, K; Kanagawa, S; Ohmagari, N. (2014). Dois casos da Febre Zika vindos da Polinesia Francesa para o Japão. **Euro Surveill**. 19(4): 20683 p.

Katzung, B. G. (2014). Farmacologia básica e clínica. 12. ed. Porto Alegre: AMGH.

Kershaw, M. J., Moorhouse, E. R., Bateman, R. Reynolds, S. E. Charnley, A. K. (1999). The Role of Destruxins in the Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae*

for Three Species of Insect. **Journal of Invertebrate Pathology**. 74(3):213-223. doi: 10.1006/jipa.1999.4884.

Klowden, M. J. (2013). *Physiological Systems in Insects*. Londres: Academic Press. 3rd ed.

Lacey, L. A. (2007). *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**. 23:133-163. doi: 10.2987/8756-971X.

Lazzarini, G. M. J., Rocha, L. F. N., Luz, C. (2006). Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. **Mycological Research**. 110(4): 485-492.

Lemke, T., Stingl, U., Egert, M., Friedrich, M. W., Brune, A. (2003) Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Applied Environmental Microbiology**. 69: 6650-6658.

Lenteren, J. C., Godfray, H. C. J. (2004). European science in the Enlightenment and the discovery of the insect parasitoid life cycle in The Netherlands and Great Britain. **Biological Control**. 32: 12-24.

Lilburn, T. G., Kim, K. S., Ostrom, N. E., Byzek, K. R., Leadbetter, J. R., Breznak, J. A. (2001) Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. **Science** 292:2495- 2498.

Lima, E. (2017). Mosquito modificado geneticamente é nova arma de combate ao Aedes - Embrapa Meio Ambiente. <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/30525791/mosquito-modificado-geneticamente-e-nova-arma-de-combate-ao-aedes>. Acesso em: 16/01/2022.

Lima, E. P., Paiva, M. H., De Araujo, A. P., Silva, E. V.; Silva, U. M., Oliveira, L. N., Santana, A. E.; Barbosa, C. N., Paiva Natto, C. C., Goulart, M. O. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara Brazil. **Parasites & Vectors**. 4: 2-12.

Lindh, J. M., Borg-Karlson, A. K., Faye, I. (2008). 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.

Lounibos, L. P. (2002) Invasions by insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**. 43: 233-66.

Luz, C., Fargues, J. (1998). Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **Journal Invertebrates Pathology** 72: 97-103.

Luz, C., Tai, M. H. H., Santos, A. H., Rocha, L. F. M., Albernaz, D. A. Z., Silva, H. H. G. (2007). Ovicidal Activity of Entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Under Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**. 44(5): 799-804. doi: 10.1603/0022-2585.

Macoris, M. L. G., Andrighetti, M. T. M., Takalu, L. Glasser, C. M., Gaberleto, V. C.; Bracco, J. E. (2003). Resistance of *Aedes aegypti* from the states of São Paulo, Brasil, to Organophosphates Insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 5:703-708. doi.org/10.1590/S0074-02762003000500020.

Marcondes, C. B. (2001). *Entomologia médica*. Rio de Janeiro, Atheneu, 432 p.

McLean, B. J., Dainty, K. R., Flores, H. A., O'Neill, S. L. (2018). Differential suppression of persistent insect specific viruses in trans-infected wMel and wMelPop-CLA *Aedes*-derived mosquito lines. **Journal of Virology**. V. 527, p. 141-145.

Medeiros, J. F., Acayaba, R. D., Montagnera, C. C., (2021). A Química na avaliação do impacto à saúde humana diante da exposição aos pesticidas. **Quim. Nova**, Vol. 44, No. 5, 584-598. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170699>.

Meister, S., Agianian, B., Turlure, F., Relógio, A., Morlais, I., Kafatos, F.C., Christophides, G. K. (2009). *Anopheles Gambiae* PGRPLC-Mediated Defense against Bacteria Modulates Infections with Malaria Parasites. **PLoS Pathogens**. 5:1000542. doi: 10.1371/journal.ppat.1000542.

Merritt, R. W.; Dadd, R. H.; Walker, E. D. (1992). Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. **Annual Review Entomology**. 37: 349-376.

Messias, C. L., (1989). Fungos: sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola. **Instituto Oswaldo Cruz**, 84: 57-59.

Minard, G. Mavingui, P., Moro, C. V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. **Parasites & Vectors**. 146:1-12. doi: 10.1186/1756-3305-6-146.

Ministério da Saúde (2016). Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2015. 50(4).

Ministério da Saúde (2017). Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/15/2017-028-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-35.pdf>. Acessado em 01/07/2018.

Ministério da Saúde (2018). Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde. Mais de mil cidades podem ter surto de dengue, Zika e chikungunya. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/43454-brasil-pode-ter-aumento-de-casos-de-dengue-zika-e-chikungunya>. Acesso em: 16/03/2020.

Ministério da Saúde (2019). Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Acesso em: 12/04/2020.

Ministério da Saúde (2020). Boletim Epidemiológico 33 - Secretaria de Vigilância em Saúde. Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. (2020). Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-33-2020.pdf>

Ministério da Saúde (2021). Boletim Epidemiológico 48 - Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 51, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletimsepidemiologicos/edicoes/2021/boletim-epidemiologico-vol-52-no-48.pdf>.

Ministério da Saúde (2022). Boletim Epidemiológico 10 - Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 10 de 2022 Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim_epidemiologico_svs_10.pdf. Acesso em: 08/05/2022.

Mnyone, L. L., Kirby, M. J., Mpingwa, M.W., Lwetoijera, D. W., Knols, B. G. J., Takken, W., Koenraadt, C. J. M., Russell, T. L. (2011). Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. **Parasitology Research**, 108: 317-322.

Moll, R. M., Romoser, W. S., Modrzakowski, M. C., Moncayo, A. C., Lerdthusnee, K. (2001). Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*. 38:29-32. doi: 10.1603/0022-2585-38.1.29.

Monath, T. P. (2001). Yellow fever: An update. **Lancet Infectious Diseases** 1:11-20. doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0.

Montella, I. R.; Martins, A. J., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B.; Braga, I. A., Valle, D. (2007) Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 77: 467-477.

Moraes, A. P.R., Bittencourt, V. R. E. P., Bittencourt, A.J. (2010). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* on immature stages of *Stomoxys calcitrans*. **Ciência Rural**. Santa Maria. V. 40, p. 1802-1807.

Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., Rocha, B. C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L. E.,

Johnson, K. N., Kay, B. H., Elizabeth A. McGraw, E. A., van den Hurk, A. F. Ryan, P. A. O'Neill, S. L. (2009). Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell** 139:1268-1278.

Motulsky, H. Survival curves. In: Motulsky, H. (2003). Prism 4 Statistics Guide- Statistical analyses for laboratory and clinical researchers. GraphPad Software Inc. San Diego: Ed. CA. Disponível em: [http://jarikson.ru/mash/Prism4%20 Folder/Manuals/StatisticsGuide.pdf](http://jarikson.ru/mash/Prism4%20Folder/Manuals/StatisticsGuide.pdf).

Murphy, F A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P.; Mayo, M. A., Summers, M. D. (1995). Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Rep. Inter. Commette on taxonomy of viruses. **Arch Virology**, Suppl. 10. Springer-Verlag, New York. P. 586.

Mustafa, M. S, Rasotgi V., Jain, S., Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**. Jan;71(1):67-70. doi: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011. Epub 2014 Nov 24. PMID: 25609867; PMCID: PMC4297835.

Nakazato, B. M., Macoris, M. L G., Urbinatti, P. R., Lima-Camara, T. N. (2021). Locomotor activity in *Aedes aegypti* with different insecticide resistance profiles. **Revista de Saúde Pública**. 55:18.

Narasimhan, S. et al. Gut Microbiota of the Tick Vector *Ixodes scapularis* Modulate Colonization of the Lyme Disease Spirochete. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 1, p. 58–71, 2014.

Neto, A L. R., Oliveira, C. M. (1985). Controle biológico de culicídeos e simúlídeos com inseticidas bacterianos. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, 37: 67-75.

Neves, D. P. (2004). *Parasitologia humana*. 11a ed. São Paulo: Atheneu, p. 494.

Nogge. G. (1976). Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. **Experientia**. 15,32(8):995-996. doi: 10.1007/BF01933932.

Nussbaum, F. V., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., Häbich, D. (2006). Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? **Angew Chem Int Ed Engl.** 4;45(31):5072-129. doi: 10.1002/anie.200600350. PMID: 16881035.

Onofre, S. B., Vargas, L. R. B., Rossato, M., Barros, N. M., Boldo, J. T., Nunes, A. R. F., Azevedo, J. L. (2002). Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*.

Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS (2015). Aumento de Síndrome de Guillain Barré e anomalias congênitas em áreas com Zika leva OPAS/OMS a enviar atualização epidemiológica. [Internet] 2016. Disponível em: Acesso em: novembro/2016.

Osei-Poku, J., Mbogo, C. M., Palmer, W. J., Jiggins, F. M. (2012). Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. **Molecular Ecology.** 21(20):5138-50. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05759x.

Palchick S. (1996). Chemical Control of Vectors In: *The Biology of Disease Vectors*. Colorado: University Press of Colorado.

Pankey, G. A., Sabath, L. D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections, **Clinical Infectious Diseases**. Volume 38, Issue 6, Pages 864-870, <https://doi.org/10.1086/381972>.

Pascoa, V., Oliveira, P. L., Dansa-Ptretskl, M., SILVA, J. R., Alvarenga, P. H., Jacobs-Lorena, M., Lemos, F. J. A. (2002). Aedes aegypti peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** v. 32, p. 517-523.

Patil, C. D., Borase, H. P., Salunke, B. K., Patil, S. V. (2013). Alteration in Bacillus thuringiensis toxicity by curing gut flora: novel approach for mosquito resistance management. **Parasitology Research.** 112(9):3283-3288. doi: 10.1007/s00436-013-3507-z.

Patrick, G. L. (2005). *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press: New York, cap.16.

Paula, A. R., Brito, E. S., Pereira, C. R., Carrera. M. P., Samuels, R. I. (2008). Susceptibility of adult *A. aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. **Biocontrol Science and Technology**.18:1017-1025.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R. I. (2011). Susceptibility of adult females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. **Parasites & Vectors**. 4:2-7. doi.org/10.1186/1756-3305-4-91.

Paula, A. R., Carolino, A. T., Silva, C. P., Samuels, R. I. (2013). Testing fungus impregnated cloths for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions. **Parasites & vectors**. 6:256. doi.org/10.1186/1756-3305-6-256.

Paula, A. R., Ribeiro, A., Lemos, F.J.A., Silva, C.P., Samuels, R.I. (2019). Neem oil increases the persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasites Vectors**. V. 12, p. 163.

Paula, A. R., Silva, L. E. I., Ribeiro, A., da Silva, G. A., Silva, C. P., Butt, T. M., Samuels, R. I. (2021). Os blastosporos de *Metarhizium anisopliae* são altamente virulentos ao *Aedes aegypti* adulto, um importante vetor de arbovírus. **Parasites & Vectors**. V.14, 555. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05055-z>.

Paula, A. R., Silva, L. E. I., Ribeiro, Butt, M., Silva, C. P. Samuels, R. I. (2018). Improving the delivery and efficiency of fungus-impregnated cloths for control of adult *Aedes aegypti* using a synthetic attractive lure. **Parasites & Vectors** 11, 285p. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2871-z>

Pei D., Hill-Clemons C., Carissimo G., Yu W., Vernick K. D., Xu J. (2015). Draft genome sequences of two strains of *Serratia* spp. from the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Genome Announc**. 3:e00090-15. 10.1128/genomeA.00090-15.

Pereira, C. R., Paula, A. R., Gomes, S. A., Pedra J. R, P. C. O, Samuels, R. I. (2009). The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *A. aegypti* (Díptera: Culicidae) larval. **Biocontrol Science and Technology**.19:1-6.

Phillips, J. E., Hanrahan, J., Chamberlin, M., Thomson B. (1986). Mechanisms and Control of Reabsorption in Insect Hindgut. In: *Advances in Insect Physiology*. Londres: Academic Press Inc., v.19, p.329-422.

Pigott, C. R., Ellar, D. J. (2007). Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 71(2):255-281. doi: 10.1128/MMBR.00034-06.

Pinto Junior, V. L., Luz, K, Parreira, R., Ferrinho, P. (2015) Vírus Zika: Revisão para Clínicos. **Acta Médica Portuguesa**. 28(6): 760-765.

Polanczyk, R. A., Garcia, M. O., Alvez, S. B. (2003). Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**. V. 6, p. 813-816.

Portal.fiocruz (2021). Método Wolbachia reduz número de casos de dengue, chikungunya e zika em Niterói. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/metodo-wolbachia-reduz-numero-de-casos-de-dengue-chikungunya-e-zika-em-niteroi>. Acesso em: 08/05/2022.

Powers, A. M, Logue, C. H. (2007). Changing patterns of chikungunya virus: reemergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**. V. 88, p. 2363-2377.

Pupo, M. T., Guimarães, D. O., Furtado, N. A. J. C., Borges, W. S. (2006). Em *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*; Taft, C. A., ed.; Research Signpost: Kerala, cap. 4.

Raikhel, A. S.; Kokoza, V.A.; Zhu, J.; Martin, D.; Wang, S. F.; Li, C.; Sun, G.; Ahmed, A.; Dittmer, N.; Attardo, G. (2002). Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**. 32, n. 10, p. 1275-1286.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. (2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. **Cell**.118 229-241.

Ramirez, J. L.; Short, S. M.; Bahia, A. C.; Saraiva, R. G.; Dong, Y.; Kang, S.; Tropathi, A.; Mlambo, G.; Dimopoulos, G. (2014). *Chromobacterium Csp_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. **PLOS Pathogens** 10, e1004398.

Ramirez, J. L.; Souza-Neto, J.; Torres Cosme, R.; Rovira, J.; Ortiz, A.; Pascale, J. M.; Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 6(3): 15-16. doi.org/10.1371/journal.pntd.000156.

Rezende, G. L., Martins, A. J., Gentile, C., Farnesi, L. C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A. A., Valle, D. (2008). Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptivrole of the chitinized serosal cuticle. **BMC Developmental Biology**., 13 (8): 1-14. doi: 10.1186/1471-213X-8-82.

Ribeiro, J. M. C. (1996). Common problems of arthropod vectors of disease. In: Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (eds.) *The Biology of Disease Vectors*. 1st edition. Colorado: Colorado University.

Ribeiro, J. P., Paula, A. R., Ribeiro, A. Imad-Silva, L. I., Samuels, R. I. (2018). Patogenicidade e virulência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* contra ovos de *Aedes* sp. XXII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, **XVIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação** e VIII Encontro de Iniciação à Docência. Universidade do Vale do Paraíba. p. 1-6. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2018/anais/arquivos/RE_0750_0705_02.pdf. Acesso em: 20/04/2021.

Ritchie, S. A., Rapley, L. P., Benjamin, S. (2010). *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**. 82(6):1053-9. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0603.

Robbs, C.F., Bittencourt, A. M. (1998). O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos. **Biotecnologia**. 6:10-12.

Rodgers, F. H., Gendrin, M., Wyer, C. A. S., Christophides, G. K. (2017). Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. **PLoS Pathogens** 13: 1-22.

Rodrigues, J., Brayner, A. B., Alves, L. C., Dixit, R., Barillas-Mury, C. (2010). Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science**. 329:1353-1355. doi: 10.1126/science.1190689.

Romoser, W. S. (1996). The vector alimentary system. In: Beaty, B. J., Marquardt, W. C., **The Biology of Diseases Vectors**., 1ª ed. Colorado University, p. 298-317.

Russell, B. M., Kay, B. H., Shipton, W. (2001). Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs in surface and subterranean breeding sites during the Northern Queensland dry season. **Journal of Medical Entomology**. 38: 441-445.

Samuels, R. I., Paula, A. R., Carolino, A. T., Gomes, S. A., Morais, C. O. P., Cypriano, M. B. C. (2016). Entomopathogenic organisms: conceptual advances and real-world applications for mosquito biological control. **Open Access Insect Physiology**. 6: 25-31.

Samuels, R. I.; Charnley, A. K.; Reynolds, S. E. (1988). The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Mycopathologia**. 104:51-58. doi: org/10.1007/BF00437924.

Sanar (2019). Mecanismo de ação do antibiótico tetraciclina. Disponível em: <https://www.sanarsaude.com/portal/concursos/artigos-noticias/penicilinas-artigo-farmacia-tudo-que-voce-precisa-saber>. Acesso em: 06/02/2022.

Santana, R. (2012). Antibióticos beta-lactâmicos. Disponível em; < <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile/01%20Antibióticos%20beta-lactâmicos.pdf>> Acesso em: 12/10/2021.

Santos, V. S. (2022). "O que são insetos ametábolos e metábolos?; Brasil escola. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/o-que-e/biologia/o-que-sao-insetos-ametabolos-metabolos.htm>. Acesso em: 12/04/2022.

Schatzmayr, H. G., Nogueira, R. M. R., Rosa, A. P. A. T. (1986). An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz** 95: 179-181.

Schilte, C., Saikowsky, F., Staikovsky, F., Couderc, T., Madec, Y., Carpentier, F., Kassab, S., Albert, M. L., Lecuit, M., Michault, A. (2013). Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS neglected tropical diseases**. 7 (3): 2137.

Schimidt, F. Repórter da redação de Ciência, especializada em tecnologia e invenções. (2019). Disponível em: <https://www.dw.com/pt-br/mosquitos-transg%C3%AAnicos-est%C3%A3o-se-reproduzindo-no-brasil/a-50421219>. Acesso em: 10/05/2022.

Schlein, Y., Polacheck, I., Yuval, B. (1985). Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies and their possible role in the transmission of leishmaniasis. **Parasitology**. 90:57-66. doi: 10.1017/s0031182000049015.

Scholte, E. J., Knols, B. G. J., Samson, R., Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. **Journal of Insect Science**. V. 4, p. 19.

Scholte, E., N.G`Habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdula, S., Killeen, G.F., Knols, B.G.J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. **Science**. V. 308, p. 1641- 642.

Scholte, E., Takken, W., Knols, B. G. (2006). Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. **Journal of Invertebrate Pathology**. 91(1): 43-49. doi: 10.1016/j.jip.2005.10.006.

Scholte, E.J., Takken, W., Knols, B.G.J. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Aedes Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica**. V. 102, p. 151-158.

Schrank, A., Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. 56:1267-1274. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.008.

Secretaria de Saúde (2022). Governo do estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.saude.rj.gov.br/noticias/2022/01/ses-rj-alerta-para-combate-a-proliferao-do-mosquito-aedes-aegypti-e-a-leptospirose-com-a-chegada-do-verao#.Acesso em: 04/02/2022>.

Secretaria de Vigilância Sanitária (2018). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_dengue_controle.pdf. Acessado em: 04/02/2019.

Seitz, H. M.; Maier, W. A.; Rottok, M., Becker-Feldmann, H. (1987). Concomitant infections of *Anopheles stephensi* with *Plasmodium berghei* and *Serratia marescens*: additive detrimental effects. **Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene A**. 266:155-166. doi: 10.1016/s0176-6724(87)80029-9.

Silva, C. P.; Lemos, F. J. A.; Silva, J. R. (2012). Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. In: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em *Entomologia Molecular*, 48. Disponível em: <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1>>. Acesso em: 06/01/2020.

Silva, H. H. G., Silva, I. G. (1999). Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 32(4):349-355.

Silva, R. O., Silva, H. H. G., Luz, C. (2004). Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian Cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. **Revista de Patologia Tropical**. 33: 207-216.

Silva, R. O., Silva, H. H. G., Ulhoa, C. J., Luz, C. (2005). Is there a relationship between N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hyphomycetes) isolates from peridomestic areas in Central Brazil and larvicidal effect on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae)? **Journal of Applied Entomology**. V. 129, p. 158-164.

Silveira, E. B., Cordeiro, B. A., Ribeiro, B. M., Bão, S. N. (2004). Morphological characterization of Anticarsia gemmatalis M nucleopolyhedrovirus infection in haemocytes from natural larval host, the velvetbean caterpillar Anticarsia gemmatalis (Hubner) (Lepidoptera: noctuidae). **Tissue and Cell**. Edinburgh. 36: 171-180.

Silveira, G. R. (2020). **Caracterização dos agrotóxicos utilizados nas ações de controle vetorial e nocividades para a saúde dos trabalhadores**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, 124p.

Sim, S. e Dimopoulos, G. (2010). Dengue Virus Inhibits Immune Responses in Aedes aegypti Cells. **Plos one**. 5:1-9.

Song, X., Zhong, Z., Gao, L., Weiss, B. L., Wang, J. (2022). Interações metabólicas entre vetores transmissores de doenças e sua microbiota. *Tendências em Parasitologia* 38(8). DOI: 10.1016/j.pt.2022.05.002

St. Leger, R. J., Goettel, M., Roberts, D. W., Staples, R. C. (1991). Prepenetration events during infection of host cuticle by *M. anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 58: 168-179.

Strasser, H.; VEY, A.; Butt, T. M. (2000). Are There any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of Metarhizium, Tolypocladium and Beauveria species? **Biocontrol Science and Technology**. 10(6): 717-735.

Suaréz, C., Gudiol, F. (2009). Enferm. *Infection Microbiology Clinical*, 27, 116.

Sudeep, A. B., Parashar, D. (2008). Chikungunya: An overview. **Journal of Bioscience**. 33: 443-449.

Tauil, P. L. (2001). Urbanization and dengue ecology. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. 17: 99-102.

Tauil, P. L. (2002). Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. 3: 867-871.

Tauil, P. L. (2006). Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 39: 275-277.

Tavares, W. (1996). *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*. Atheneu, 2a edição, São Paulo.

Tawidian, P., Rhodes, V. L. Michel, K. (2019). Mosquito-Fungus Interactions and Antifungal Immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 111:103182. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.103182.

Thiboutot, M. M., Kannan, S., Kawalekar, O. U., Shedlock, J. V., Khan, A. S., Sarangan, G., Srikanth, P., Weiner, D.B., Muthumani, K. (2010). Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic? **PLoS Neglected Tropical Diseases**. V. 4, p. 623

Thompson, M. T. (1905). Alimentary canal of the mosquito. Proceedings of the **Boston Society of Natural History**. 32: 145-202.

Tuasaude (2021). Disponível em: <https://www.tuasaude.com/vacina-contradengue/>. Acesso em: 18/01/2022.

Turley, A. P., Moreira, L. A., O'Neill, S. L., McGraw, E. A. (2009). Wolbachia infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. Austrália. V. 3, e 516.

Valência, M. D., Miller, L. H., Mazur, P. (1996). Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: a comparison with *Drosophila*. **Cryobiology**. 1996; 33:142-8. doi: 10.1006/cryo.1996.0014.

Van den Hurk, A. F., Hall Mendelin, S., Pyke, A. T., Frentiu, F. D., McElroy, K. (2012). Impacto da Wolbachia na infecção por chikungunya e vírus da febre amarela no mosquito vetor *Aedes aegypti*. **Plos Neglected Tropical Diseases**. V. 6, e1892.

Vital, W. Rezende, G. L., Abreu, L., Moraes, J., Lemos, F. J. A, Vaz, Jr, I. S., Logullo, C. (2010). Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. **BMC Developmental Biology**. 10:25. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-25>.

Walker, K. R., Joy, T. K., Eilers Kirk, C., Ramberg, F. B. (2011). Human and environmental factors affecting *Aedes aegypti* distribution in an arid urban environment. **Journal of the American Mosquito Control Association**. V. 27, p. 135-141.

Walsh, C. (2003). *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington.

Wang, Y., Gilbreath III, T. M.; Kukutla P., Yan G.; Xu, J. (2011). Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One*. 6: 247-267. doi.org/10.1371/journal.pone.0024767.

Wei, G., Yiling Lai, Y., Wang, G., Chen, H., Li, F., Wang, S. (2017). Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. **PNAS**. 114: 5994-5999.

Werren, J. H., Baldo, L., Clark, M. E. (2008). Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**. 6, 741-51

World Health Organization - WHO. (2015). Zika disease. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>. Acesso em: 12/02/2016.

Wright, C., Brooks, A., Wall, R. (2004). Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Pest Management Science**. V. 60, p. 639-644.

Wright, G. D.; Chu, D. T. W. Em Abraham, D. J. (2003). Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery. *Chemotherapeutic Agents*, John Wiley & Sons: San Francisco. vol. 5, cap. 15.

Xi, Z., Ramirez, J. L., Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathogens**. 4:1000098. doi.org/10.1371/journal.ppat.1000098.

Yassin, A. F. (2005). *Rhodococcus triatomae* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, n.4, p.1575-1579.

Zara, A. L. S. A., Santos, S. M., Oliveira, S. F., Carvalho, R. G., Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 25 (2): 391-404. doi: 10.5123/S1679-49742016000200017.

Zeh, D. W., Zeh, J. A., Smith, R. L. (1989). Ovipositors, amnions and eggshell architecture in the diversification of terrestrial arthropods. **Quarterly Review of Biology**. 64, 147-168.

Zhang, F., Sun, X. X., Zhang, X. C., Zhang, S., Lu, J., Xia, Y.M., Huang, Y. H., Wang, X. J. (2018). The interactions between gut microbiota and entomopathogenic fungi: a potential approach for biological control of *Blattella germanica* (L.). **Pest Management Science**. 74: 438-44.

Zouache, K., Raharimalala, F. N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L. H., Ravelonandro, P. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 75, p. 377-389, 2010. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x.

Zug, R., Koehncke, A., Hammerstein, P. (2012). Epidemiology in evolutionary time: the case of *Wolbachia* horizontal transmission between arthropod host species. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, p.2149-2160. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02601>.