

João Felipe Moreira Salgado

O microbioma do intestino médio de *Aedes aegypti* e suas alterações em diferentes regimes alimentares.



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro
Junho, 2021

Trabalho realizado no Departamento de Genética do Instituto de Biologia, UFRJ, sob orientação da Professora Dra. Ana Carolina Martins Junqueira.

CIP - Catalogação na Publicação

SS164a Salgado, João Felipe Moreira
m O microbioma do intestino médio de *Aedes aegypti*
e suas alterações em diferentes regimes alimentares
/ João Felipe Moreira Salgado. -- Rio de Janeiro,
2021.
75 f.

Orientadora: Ana Carolina Martins Junqueira.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2021.

1. Culicidae. 2. Whole genome shotgun. 3.
Repasto sanguíneo. 4. Simbiose. 5. *Elizabethkingia*
anophelis. I. Junqueira, Ana Carolina Martins,
orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **João Felipe Moreira Salgado**

DRE: 118094527

BANCA EXAMINADORA: Prof. Dr. Caio Tavora Rachid Coelho da Costa (Presidente)
 Profa. Dra. Cristiane Carneiro Thompson
 Prof. Dr. Carlos Augusto Gomes Soares
 Profa. Dra. Rosana Barreto Rocha Ferreira (Suplente)

Título da Monografia: **“O microbioma do intestino médio de *Aedes aegypti* e suas alterações em diferentes regimes alimentares”**

Local: Sala virtual

<https://us02web.zoom.us/j/89246425706?pwd=b2RXVk5XZ3dzd29yTU9iMjJlWFwZz09>

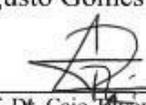
Data e hora de início: **10 de junho de 2021 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de junho de 2021.

NOTA	Banca Examinadora:
10	Prof. Dr. Caio Tavora Rachid Coelho da Costa
10	Profa. Dra. Cristiane Carneiro Thompson
10	Prof. Dr. Carlos Augusto Gomes Soares

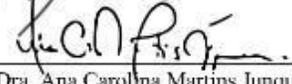
Presidente da banca


 Prof. Dr. Caio Tavora Rachid Coelho da Costa

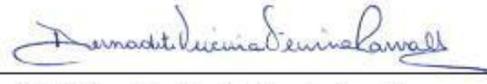
Aluno:


 João Felipe Moreira Salgado

Orientador:


 Prof. Dra. Ana Carolina Martins Junqueira

Coordenador
de TCC


 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Martins Junqueira pela idealização do projeto, pela orientação, ensinamentos, confiança e todo companheirismo e paciência durante o processo de desenvolvimento deste projeto e monografia;

Ao Prof. Dr. Yu Cai do Temasek Life Sciences Laboratory e National University of Singapore pela criação, manutenção e fornecimento dos mosquitos utilizados neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Stephan C. Schuster, do Singapore Centre for Environmental Life Sciences Engineering (SCELSE) e Nanyang Technological University (NTU), pela colaboração na elaboração e desenvolvimento do projeto e no financiamento e por ceder a infraestrutura de sequenciamento e análise computacional que tornaram este trabalho possível;

Ao Prof. Dr. Jason E. Stajich da University of California Riverside (UCR) por todo o conhecimento que me ajudou a construir em computação, programação e bioinformática;

À Elaine Oliveira pela ajuda com as extrações de DNA;

À Dra. Daniela Drautz-Moses pela colaboração no sequenciamento;

Ao Premkrishnan Balakrishnan pela colaboração na análise inicial dos dados;

Ao Dr. Kenny Lau Jia Xu pela ajuda com as análises de grafos e redes de co-ocorrência;

Ao Prabu Sekar pelas rápidas soluções de problemas com o acesso remoto ao cluster de alta performance do SCELSE-NTU;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento com a bolsa de Iniciação Científica.

“Science cannot solve the ultimate mystery of nature for, in the last analysis, we ourselves are a part of what we are trying to solve.”

Max Karl Planck

RESUMO

João Felipe Moreira Salgado

O microbioma do intestino médio de *Aedes aegypti* e suas alterações em diferentes regimes alimentares

Orientadora: Dra. Ana Carolina Martins Junqueira

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O repasto sanguíneo é crucial para reprodução e transmissão de arbovírus em *Aedes aegypti*. Ele também é responsável por diversos processos fisiológicos no intestino médio do mosquito, incluindo a modulação de sua microbiota, fator extremamente importante para a colonização de patógenos virais. Devido à larga utilização de sequenciamento da subunidade ribossomal 16S e *pooling* de amostras, as implicações de tal impacto na comunidade microbiana ainda permanecem elusivas, com necessidade de caracterização metagenômica mais profunda de forma a revelar atribuições taxonômicas em melhor resolução e com elucidação de processos funcionais associados através da investigação a nível genômico dos microrganismos envolvidos. Nós utilizamos 70 indivíduos de larva e mosquitos adultos em diferentes horas após a dieta com sangue ou açúcar para o sequenciamento utilizando metodologia de whole genome shotgun (WGS), proporcionando atribuição taxonômica a nível de espécies e identificação de perfis funcionais baseados em genes presentes nos metagenomas. Larvas e mosquitos adultos durante o primeiro dia após a alimentação com sangue possuem diversidades significativamente menores de sua comunidade microbiana, sendo que larvas apresentam microbioma dominado por actinobactérias do gênero *Microbacterium*. O primeiro dia após a alimentação com sangue é caracterizado por um grande aumento na abundância relativa de Enterobacteriales e de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Mosquitos adultos alimentados com açúcar não apresentam uma dominância significativa de táxons microbianos, com maior diversidade de espécies fúngicas entomopatogênicas e bacterianas. Tais alterações são restauradas para um estado similar em ambos os grupos em 48h após a alimentação, com presença abundante do patógeno humano e simbiote de culicídeos *Elizabethkingia anophelis*. Esse é o primeiro estudo a utilizar a metodologia de WGS para descrever o microbioma de *A. aegypti*, produzindo o maior conjunto de dados metagenômicos neste modelo e relatando uma adaptação do microbioma para promover perfil funcional relacionado à nutrição em detrimento da abundância de simbiontes no intestino médio do mosquito. Tal conhecimento pode ser aplicado para o desenvolvimento de novas estratégias para controle vetorial e da transmissão de arbovirose.

Palavras-chave: Culicidae, Whole Genome Shotgun, repasto sanguíneo, simbiose, Enterobacteriales, *Elizabethkingia anophelis*.

ABSTRACT

João Felipe Moreira Salgado

O microbioma do intestino médio de *Aedes aegypti* e suas alterações em diferentes regimes alimentares

Orientadora: Dra. Ana Carolina Martins Junqueira

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Blood meals are crucial for reproduction and transmission of arboviruses in *Aedes aegypti*. They also trigger several physiological processes in the mosquito's midgut, including modulating its microbiome, a key for susceptibility to colonization of viral pathogens. Due to the still largely employed rRNA 16S sequencing and pooling of samples, however, implications of such impact on the microbial community remain elusive. Such gap in the study of microbiome in insect vectors calls for a deeper metagenomic characterization to provide resolved taxonomic assignments with elucidation of associated functional processes and allow for microbial genome-level investigation. We subjected 70 larvae and adult mosquito individuals at different hours post blood or sugar meals to whole genome shotgun sequencing (WGS), providing species level taxonomic assignments and gene-based functional profiling of the metagenomes. Larvae and adult mosquitoes during the first day post blood meal display significantly lower microbiome diversities. The former presents an exclusive dominance of the actinobacteria genus *Microbacterium*. The early hours of digestion in blood fed mosquitoes are associated with a striking proliferation of Enterobacteriales, as well as carbohydrate and amino acid metabolism genes. On the other hand, sugar fed adult individuals didn't display any significant taxa dominance, with higher diversity of entomopathogenic fungi, and bacteria. Such changes are restored to a similar state in both diet groups at 48h, with detection in high abundances of the human pathogen and culicidae symbiont *Elizabethkingia anophelis*. This is the first study to use WGS in order to describe *A. aegypti*'s microbiome, generating the largest metagenomic dataset in this model and reporting its microbiome adaptation to a digestive role at the expense of symbiont abundances upon blood meal in *A. aegypti*. Such knowledge can provide useful insights for the development of novel strategies aiming the vector's populational control and halting the transmission of arboviruses.

Key words: Culicidae, Whole Genome Shotgun, blood meal, symbiosis, Enterobacteriales *Elizabethkingia anophelis*.

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

João Felipe Moreira Salgado

O microbioma do intestino médio de *Aedes aegypti* e suas alterações em diferentes regimes alimentares

Orientadora: Dra. Ana Carolina Martins Junqueira

Resumo para pessoas leigas da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A alimentação por sangue é crucial para fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* por permitir a sua postura de ovos e reprodução. Porém, as picadas de mosquitos fêmeas em humanos também podem ser a causa da transmissão de vírus causadores de doenças. De forma similar ao que ocorre conosco, a dieta aparenta ser um fator que causa a alteração da presença de fungos e bactérias benéficos no intestino médio do mosquito, cuja presença pode influenciar a habilidade do mosquito de transmitir vírus como Dengue e Zika. Ainda assim, os métodos utilizados até hoje para investigar como se dá a alteração da comunidade microbiana de fungos e bactérias se utilizam de um único gene. Desta forma, estes estudos ainda deixam lacunas no conhecimento sobre como esta comunidade microbiana do intestino médio de mosquitos é alterada quando da alimentação por sangue. Permanece, portanto, a necessidade de caracterização de todo o conteúdo genético de origem microbiana, ou genomas, presentes no intestino de *A. aegypti*, área do conhecimento chamada de metagenômica. Ela é de importância principalmente para fornecer identificações de espécies microbianas e agregar informação sobre seus envolvimento em processos da vida do mosquito. Neste trabalho, nós utilizamos 70 indivíduos de larvas e mosquitos fêmeas adultos em diferentes horas após a dieta com sangue ou açúcar para a detecção de todo o conteúdo genômico em seus intestinos. Larvas e fêmeas adultas durante o primeiro dia após a alimentação com sangue possuem menor diversidade de microrganismos, sendo que a comunidade microbiana de larvas é dominada por actinobactérias. O primeiro dia após a alimentação com sangue é caracterizado por um grande aumento na detecção de enterobactérias e de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Mosquitos adultos alimentados com açúcar apresentam maior diversidade de espécies fúngicas e bacterianas. Tais alterações são restauradas para um estado similar em ambos os grupos às 48h após a alimentação, com presença da bactéria *Elizabethkingia anophelis*, benéfica para mosquitos. Este é o primeiro trabalho que faz uso da metagenômica e elucida a mudança de microrganismos para promover funções relacionadas à nutrição no intestino médio de *A. aegypti*, resultados que podem ser importantes para o desenvolvimento de alternativas para o controle do mosquito e da transmissão de vírus.

ÍNDICE	Pág
1. Introdução	11
1.1. A ascensão do império alvinegro: Uma revisão sobre a biologia de <i>Aedes aegypti</i> .	11
1.2. Microbioma na saúde e na doença: Até que arbovírus os separem.	15
1.3. Balada de amor (e ódio) através das idades: O impacto da co-evolução vetor-microrganismos.	18
1.4. Revolução das máquinas: A era da (Meta)genômica na ecologia microbiana.	21
2. Justificativa	27
3. Objetivos	28
3.1. Objetivo geral.	28
3.2. Objetivos específicos.	28
4. Materiais e Métodos	29
4.1. Desenho experimental.	29
4.2. Extração e sequenciamento de DNA.	30
4.3. Processamento dos dados sequenciados.	31
4.4. Atribuição taxonômica e funcional.	31
4.5. Estimativas de diversidade da comunidade microbiana.	32
4.6. Distribuição de espécies e redes de co-ocorrência.	33
5. Resultados	35
5.1. Extração e sequenciamento.	35
5.2. Mudanças de composição e diversidade microbiana em larvas e adultos.	38
5.3. A comunidade microbiana de adultos e suas espécies preditoras de diferentes dietas.	44
5.4. O perfil funcional do microbioma de adultos é alterado de acordo com sua dieta.	48
6. Discussão	53
7. Conclusão	59
8. Referências Bibliográficas	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ascensão do império alvinegro: Uma revisão sobre a biologia de *Aedes aegypti*.

Ao longo dos últimos milênios, *Homo sapiens* se tornou, inegavelmente, a espécie com o maior impacto direto na alteração da paisagem e de ciclos essenciais à manutenção da vida no planeta (Goudie, 2018). Ainda que, para grande parte da biodiversidade, este se apresente como um impacto negativo, alguns animais se adaptaram aos novos nichos gerados por tal intervenção humana na natureza, como é o exemplo de insetos hematófagos, especialmente dípteros da família Culicidae. Mosquitos que antes possuíam ciclos de vida exclusivamente silváticos, alimentando-se do sangue de mamíferos selvagens, divergiram em novas espécies antropofílicas, adaptando-se às novas condições naturais em um processo de domesticação causado pela invasão humana em áreas antes inexploradas. Futuramente, o tráfego marinho colonialista intercontinental iria também iniciar a distribuição dessas novas espécies hemissinantrópicas em direção ao Novo Mundo (Forattini et al., 1993; Powell et al., 2013; Brown et al., 2014). Esses processos, por mais irrelevantes que possam ter parecido no passado, moldaram a distribuição e evolução da biodiversidade de forma tal que, ironicamente ou não, os mosquitos atualmente tenham se tornado os animais mais letais do planeta para humanos (Gates, 2014).

Mosquitos pertencem ao filo Arthropoda e à classe Insecta. São invertebrados da ordem Diptera, uma das mais diversas entre os insetos, com mais de 150 mil espécies descritas (Wiegmann et al., 2011). Esta ordem é tradicionalmente dividida em (i) Brachycera, que inclui moscas de corpo robusto e antenas curtas e (ii) Nematocera, que compreende mosquitos de corpo alongado e antenas segmentadas (Wiegmann et al., 2011). Dentre estes últimos, especificamente na família Culicidae e subfamília Culicinae, temos o gênero *Aedes*, que contém os principais vetores biológicos de arboviroses em humanos. Esse gênero inclui insetos holometábolos, ou seja, que passam por metamorfose completa, com quatro principais estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos são resistentes à dessecação, podendo enfrentar longos períodos até que haja umidade suficiente para eclosão. A postura destes é feita preferencialmente em águas limpas e lânticas, onde os ovos eclodem liberando larvas de estágio 1 (L1) que se alimentam de fito e zooplâncton, incluindo microrganismos, e permanecem no ambiente aquático até a forma adulta (Beserra et al., 2006). Durante este estágio, alguns fatores são determinantes: a temperatura

mais quente, que acelera o desenvolvimento, a disponibilidade nutricional do ambiente e a densidade larval, que, quando muito elevada, tende a diminuir a taxa de crescimento individual das larvas que compartilham o mesmo microambiente (Couret et al., 2014). Uma vez adultos, os mosquitos têm uma expectativa de vida de duas semanas a um mês e geralmente se alimentam de substâncias açucaradas, como néctar ou seiva. O repasto sanguíneo é realizado somente por fêmeas durante o período após a cópula e precedente à oviposição, visto que aminoácidos advindos do sangue são essenciais para produzir proteínas precursoras do vitelo (PPV, do inglês *YPP, yolk precursor proteins*) e para a vitelogênese no corpo gorduroso (Gomes et al., 2005; Pimenta de Oliveira et al., 2017). Um dos principais fatores que favorecem o aumento populacional de mosquitos do gênero *Aedes* é a facilidade de adaptação a vários tipos de criadouros (naturais e artificiais, perenes ou efêmeros), (Lozovei, 2001). Além disso, a preferência por hematofagia em humanos, a sobrevivência por tempo suficiente para que os vírus se proliferem e o sistema circulatório simplificado com acesso direto da hemocele ao aparato bucal, propiciam o aumento da dispersão viral, tornando algumas de suas espécies exímios vetores de arboviroses (Ritchie, 2014).

Espécies vetoras são amplamente estudadas na entomologia médica por intermediarem a dispersão de doenças relevantes para a saúde pública mundial. Dentre essas espécies, destaca-se *Aedes aegypti*, um dos artrópodes urbanos e cosmopolitas com maior competência vetorial de ArBoviroses (do inglês *Arthropod Borne*) humanas (Ritchie, 2014). A maioria dessas arboviroses causam intensa inflamação generalizada, por vezes hemorrágica, com exemplos notórios causados por vírus do gênero *Flavivirus*. Seus principais representantes são os vírus da febre amarela, da dengue e zika, do inglês respectivamente *Yellow Fever Virus* (YFV), *Dengue Virus* (DENV) e *Zika Virus* (ZIKV). Essas doenças ainda são mantidas paralelamente em ciclos silváticos por mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Sabethes* e *Haemagogus* e suas principais características fisiopatológicas incluem distúrbios hemodinâmicos que podem culminar em falência hepática no caso da febre amarela e quadros de choque fatais no caso da dengue (Quaresma et al., 2013; Katzelnick et al., 2017). Estudos acerca do impacto clínico da dengue e febre amarela indicam que ambas estão entre as doenças negligenciadas mais desabilitantes ao longo da vida de indivíduos afetados (Hotez et al., 2014), aumentando os custos destinados aos cuidados com a saúde. O custo global anual agregado apenas à dengue foi estimado em torno de US\$ 9 bilhões, sendo que 12% destes foram alocados em casos fatais (Shepard et al., 2016). A

zika, por sua vez, se tornou alvo de vigilância epidemiológica pela evidente associação com comorbidades neurológicas, tais quais reações autoimunes, como a síndrome de Guillain-Barré, e neurodegenerativas, como síndrome da Zika Congênita (Willison et al., 2016; Garcez et al., 2017;). Outras doenças de menor relevância epidemiológica transmitidas por *A. aegypti* incluem as febres chikungunya e mayaro, causadas respectivamente pelos vírus CHIKV e MAYV do gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*) e que causam viroses artrálgicas, além da filariose cardiopulmonar em humanos e animais domésticos causada pelo nematóide *Dirofilaria immitis* (Vezzani et al., 2011; Shragai et al., 2017), ressaltando a importância da vigilância epidemiológica do vetor também na medicina veterinária.

Como uma das poucas tentativas de controle de tais doenças, o advento da vacina para febre amarela ocorreu em 1937, e, a partir de então, as epidemias diminuíram em grande proporção, com erradicação dos ciclos urbanos no Brasil (Ministério da Saúde, 2004). Entretanto, o ressurgimento de surtos em áreas com ampla cobertura vacinal no país vem levantando preocupações desde a década de 80, com taxas de mortalidade atingindo até 50% em alguns estados da região sul e sudeste do Brasil, nunca antes considerados endêmicos para a doença (Cavalcante e Tauil, 2017). A baixa taxa relativa de mortalidade é o principal fator que contribui para que arboviroses de forma geral sejam negligenciadas, mas a escassez de recursos, desigualdade socioeconômica e desvalorização da ciência são outros componentes que levam ao atraso em seu combate (Whiteman et al., 2020). Tais características são geralmente observadas em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento que se encontram nas áreas de incidência dessas arboviroses, área esta que coincide com a distribuição global de seu vetor urbano, *A. aegypti*. Desta forma, países localizados em zonas tropicais são especialmente afetados, visto que o clima quente e úmido favorece o surgimento de criadouros artificiais e, por conseguinte, o aumento populacional de mosquitos. Não obstante, a ocorrência da espécie *A. aegypti* também pode incluir regiões de clima mediterrâneo e temperado (Kraemer et al., 2015), como mostra a Figura 1. Além disso, perspectivas indicam que fenômenos de mudanças climáticas podem contribuir cada vez mais para a expansão de sua distribuição devido à ocupação de nichos antes considerados pouco prováveis (Ritchie, 2014).

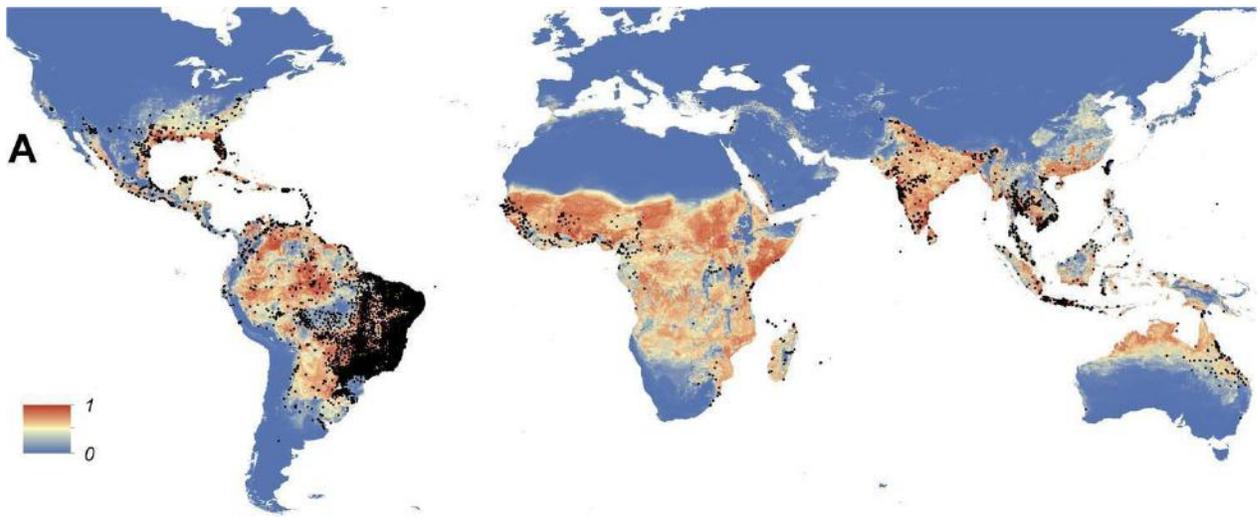


Figura 1. Mapa global da distribuição de *A. aegypti*. O mapa mostra as áreas de prevalência documentada do vetor em pontos pretos e sua predição de ocorrência global (de 0, em azul significando probabilidade nula, a 1, em vermelho indicando alta probabilidade) em resolução espacial de 5 km x 5 km (Kraemer et al., 2015). Fonte: Spatial Ecology and Epidemiology Group, Department of Zoology, University of Oxford. Acessado em 21 de julho de 2020, <<https://elifesciences.org/articles/08347/figures#fig1s4>>.

Ao redor do mundo, diversas medidas para controle populacional do vetor *A. aegypti* têm sido desenvolvidas, tais quais utilização de predadores naturais dos estágios larvais do mosquito e controle químico, sendo este último o mais utilizado historicamente em escala global nas últimas décadas (Manjarres-Suarez e Olivero-Verbel, 2013). Um levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre 2001 e 2009 apontou que as classes de inseticidas químicos mais populares para controle de *A. aegypti* foram os organofosforados, com média de 703 toneladas por ano, além de piretróides e carbamatos, com média de aproximadamente 151 e 16 toneladas por ano, respectivamente. Essas classes de compostos químicos possuem representantes que, de acordo com a classificação de risco toxicológico da OMS, variam de “ligeiramente perigoso” a “extremamente perigoso” (OMS, 2011). Além das possíveis ameaças à saúde a longo prazo que tal método de controle representa, outra preocupação é a atual queda drástica de sua eficácia devido aos recorrentes casos de resistência dos mosquitos às formulações (Ranson et al., 2010; Dusfour et al., 2011; Maciel-de-Freitas et al., 2014). Os principais mecanismos de resistência descritos são: indução cruzada de genes para sistemas detoxificantes, deposição cuticular como barreira mecânica à penetração dos compostos e mutação de sítios-alvo (Poupardin et al., 2008; David et al., 2010; Marcombe et al., 2012). Por conta disso, novos métodos sustentáveis para o controle do vetor têm sido extensivamente estudados nos últimos

anos, com técnicas de geração de mosquitos imunologicamente refratários para arbovírus (Vargas et al., 2020), e principalmente com o uso direto e indireto de microrganismos, seja para a produção de substâncias mosquitocidas (Geetha e Manonmani, 2010), para produção de inseticidas microbianos (Bukhari et al., 2011) ou ainda para modulação da microbiota de forma a conferir resistência no mosquito à infecção e, conseqüentemente, diminuir transmissão de arbovírus (Rancès et al., 2012; Benelli, 2015).

1.2. Microbioma na saúde e na doença: Até que arbovírus os separem.

A ubiquidade de relações microscópicas anfíbios finamente reguladas entre procariotos e eucariotos deu origem ao termo "holobionte" para descrever a miríade de interações entre os hospedeiros e microrganismos sob a perspectiva sinérgica de moléculas e vias metabólicas provenientes de seus diferentes componentes (Guégan et al., 2018). Interações estas que, com o avanço das tecnologias de sequenciamento de genoma total e poder de análise computacional de grandes conjuntos de dados, podem ser melhor exploradas, apresentando potencial de aplicação para o controle da transmissão de doenças infecciosas. A microbiota intestinal, com sua alta capacidade de produzir metabólitos e modular a resposta imune do hospedeiro, é crucial na regulação homeostática de metazoários (Lee e Hase, 2014). A investigação e caracterização da comunidade microbiana tem sido extensivamente estudada em humanos, onde já é bem elucidada a alteração de sua composição em função da dieta e estilo de vida, assim como seu impacto na fisiologia e desenvolvimento embrionário. O paradigma do que se conhecia sobre a maturação do desenvolvimento imune e neuronal em fetos mudou à luz dos efeitos positivos e negativos da colonização de microrganismos (Heiss e Olofsson, 2019), bem como a forma como entendemos o conceito de "doença" atualmente. Por exemplo, um robusto corpo de evidências tem se formado mostrando a relação entre o uso de antibióticos durante a infância e a composição da microbiota intestinal de humanos com o surgimento de distúrbios neurodesenvolvimentais e neurodegenerativas, como distúrbios do espectro autista e doença de Alzheimer (Bonfili et al., 2017; Nishida et al., 2018; Kang et al., 2019).

Assim como em humanos, a associação de microrganismos com artrópodes é registrada de longa data. Por conta de sua vasta diversidade metabólica e natureza fisiológica extremamente versátil, a comunidade microbiana de insetos representa, hoje, uma perspectiva real e poderosa para controle populacional de pragas e vetores (Kanzok e Jacobs-Lorena, 2006; Marti et al., 2015;

da Silva et al., 2020). Em Diptera, a caracterização da microbiota é melhor conhecida e manipulada em *Drosophila melanogaster*, por ser um organismo modelo. Dois gêneros comensais bacterianos, *Lactobacillus* e *Acetobacter* são, por exemplo, essenciais para o desenvolvimento da mosca, promovendo a liberação de hormônios esteróides, como a ecdisona, e fatores de crescimento como insulina. Alterações no metabolismo de trealose e lipídios durante o estresse nutricional também são mediados por microrganismos comensais nestas moscas (Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011). A microbiota de insetos também tem importante papel na estimulação de seu sistema imune, sendo proposto que peptidoglicanas provenientes de bactérias modulam a produção constitutiva de *Relish*, um fator de transcrição intermediário resultante da ativação da via imune de Imunodeficiência (IMD) (Bischoff et al., 2006).

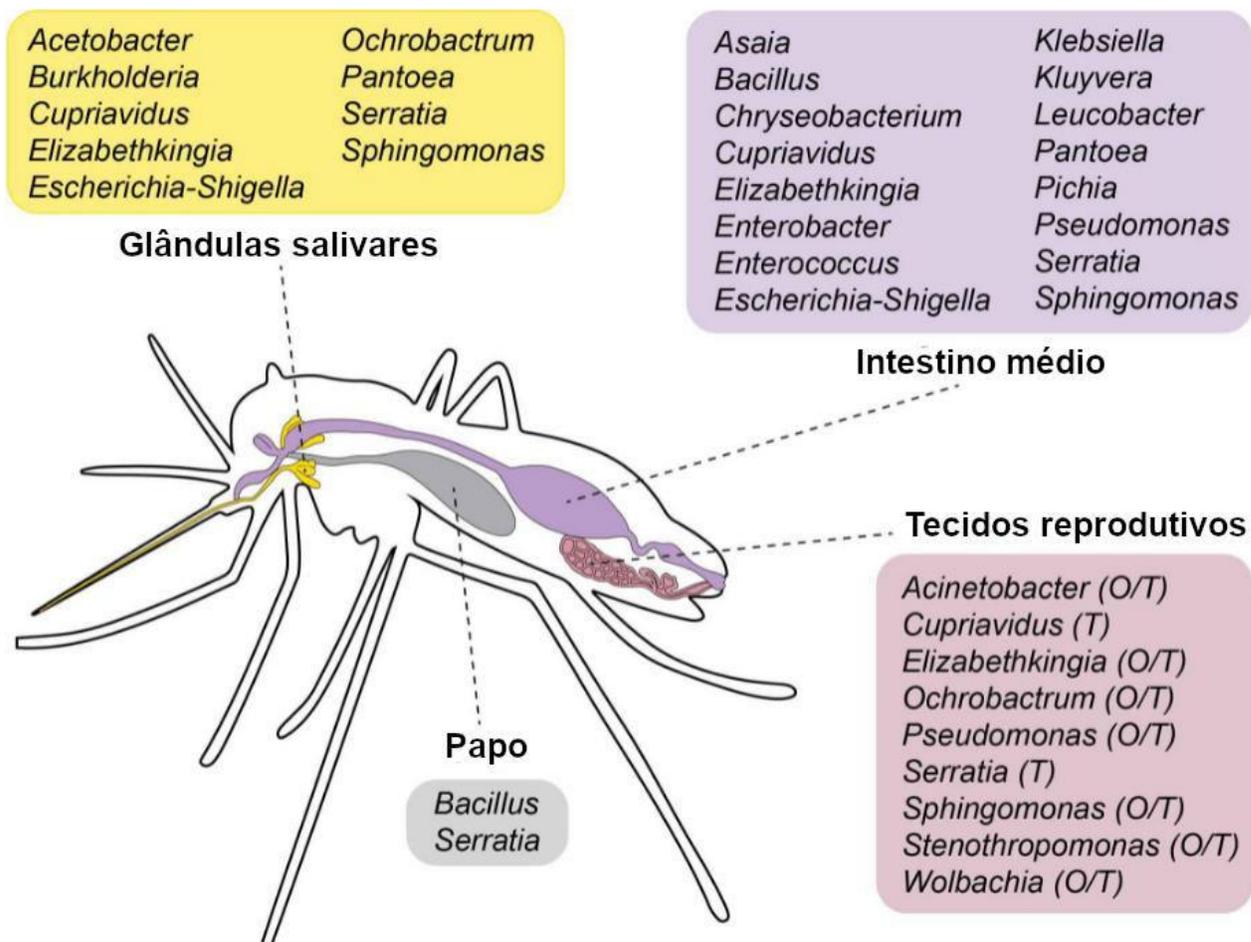


Figura 2. Esquema mostrando espécies bacterianas identificadas em diferentes sítios anatômicos de mosquitos: glândulas salivares, intestino médio, tecidos reprodutivos (O - Ovários, T - Testículos) e papo. Modificado de: Scolari, F., Casiraghi, M. e Bonizzoni, M. *Aedes* spp. and their microbiota: A review. *Frontiers in Microbiology*, 04 de setembro de 2019, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02036>.

Mosquitos, por sua vez, demonstram menor estringência nas associações com microrganismos, sendo que a colonização de táxons bacterianos é influenciada por diversos fatores extrínsecos e de, forma geral, pode apresentar variações mais relacionadas ao tipo de habitat aquático em que suas larvas se desenvolvem e região geográfica que o mosquito é encontrado do que com a própria classificação taxonômica dos mosquitos em questão (Scolari et al., 2019; Wang et al., 2018). Por exemplo, as características químicas dos criadouros, como pH e presença de compostos depositados pela ação antropogênica, incluindo concentrações residuais de fertilizantes e até de antibióticos no sangue do qual mosquitos adultos se alimentam, causa alteração nos padrões de abundância de bactérias em larvas e adultos de diversas espécies culicídeos (Gendrin et al., 2015). Outros estudos demonstram que larvas submetidas a temperaturas mais altas apresentam maior colonização por gêneros bacterianos termo-tolerantes, como *Bacillus* e em uma menor taxa de sobrevivência (Onyango, 2020). Fatores intrínsecos ao hospedeiro também podem alterar a composição de seu microbioma, como capacidade imunológica, sexo, idade e até interações micro-ecológicas no intestino médio do vetor (David et al., 2016; Scolari et al., 2019). No entanto, estudos de larga escala em populações do vetor ainda precisam ser conduzidos para entender a sua contribuição para a alteração da paisagem do microbioma do intestino médio de mosquitos.

Alguns gêneros bacterianos que são comumente associados a culicídeos incluem *Asaia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Elizabethkingia* e *Chryseobacterium* (Figura 2), sendo que a presença de alguns destes táxons são específicas de determinados sítios anatômicos, podendo sofrer alterações de acordo com a dieta. A ingestão de néctar pode, por exemplo, carrear microrganismos que são encontrados somente em seu papo - como os gêneros bacteriano *Serratia* spp. e leveduriforme *Pichia* spp. - para o intestino médio, uma vez que substâncias açucaradas são estocadas neste órgão de reserva (Gusmão et al., 2010), diferentemente do repasto sanguíneo, que segue em seu trato digestório diretamente para o intestino. Apesar de procariotos serem o foco da maior parte dos trabalhos realizados na área, a contribuição de microrganismos eucarióticos no microbioma destes insetos vetores também parece ser significativa. Um exemplo em *A. aegypti*, é a interação direta com o fungo comensal *Talaromyces* sp., que ocasiona a inibição transcricional e enzimática de tripsina no intestino médio do mosquito, fator importante para a digestão de sangue. Recentemente observou-se que tal inibição resulta em aumento significativo da susceptibilidade a DENV em mosquitos, sem, no entanto, afetar a colonização por outros componentes microbianos

comensais (Angleró-Rodríguez et al., 2017). O aprofundamento do estudo de impactos como os mencionados na modulação do microbioma de *A. aegypti* causado pelo metabolismo de sangue se torna, portanto, de suma importância, sobretudo por conta da grande capacidade de aproveitamento para elucidar os mecanismos que governam a habilidade do vetor de transmitir arbovírus, ou capacidade vetorial, uma vez que tal característica se dá em função direta das interações do mosquito com seu microbioma.

1.3. Balada de amor (e ódio) através das idades: O impacto da co-evolução vetor-microrganismos.

Fatores macroecológicos como clima e atividade antropogênica atuam diretamente na densidade populacional de *A. aegypti* em ambientes urbanos, aumentando a transmissão de arbovírus. No entanto, fatores microecológicos, como a interação do mosquito e microrganismos associados, são cruciais para determinar a capacidade vetorial nestes hospedeiros artrópodes (Cansado-Utrilla et al., 2020). Além disso, o próprio vetor também monta respostas eficientes à infecções e todos estes fatores acarretam em um conjunto de ações e reações imunológicas, moleculares, e fisiológicas de ambas as partes (Lambrechts et al., 2009). Tal complexidade de interações interdomínios, no caso de *A. aegypti*, torna tanto os ambientes intra quanto extracelular dos mosquitos determinantes na seleção de vírus que serão transmitidos, o que acaba por originar um sistema tripartite coevolutivo mosquito - vírus - microbioma anfíbio (Lobo et al., 2009; Ramirez et al., 2012)

Considerando que a carga viral é adquirida através da hematofagia, o primeiro sítio de estabelecimento de arbovírus no vetor é o intestino médio, que possui microrganismos residentes. É sabido que apenas uma pequena quantidade da carga viral adquirida por mosquitos via repasto sanguíneo é capaz de colonizar de fato o epitélio intestinal para prosseguir com seu ciclo replicativo e que interações com microrganismos simbiotes, comensais e entomopatogênicos são, em grande parte, responsáveis por isso. A produção de prodigiosinas, proteases e hemolisinas, além do sequestro de ferro por quelantes sideróforos e a mais recentemente explorada ativação cruzada da resposta imune estão entre os fatores microbianos no intestino médio de insetos vetores que mais afetam diretamente a proliferação de parasitas humanos (Azambuja et al., 2005). Estudos recentes em mosquitos *Anopheles* indicam que bactérias do gênero *Asaia*, simbiotes de diversos culicídeos, são responsáveis por regular positivamente a expressão de genes para os

peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *Antimicrobial Peptides*) Cecropina e Defensina (Cappelli et al., 2019) no mosquito. Tais AMPs são importantes efetores da resposta imune inata de insetos, conhecidos por induzir formação de poros na parede celular de bactérias, mas também por inibir a proliferação de oocistos de *Plasmodium spp.* (Vale et al., 2014), agentes etiológicos da malária em mamíferos. Esse tipo de regulação modulada por componentes da microbiota de culicídeos também está envolvida com outros efetores da imunidade inata, com participação de proteínas constitutivas celulares, como a Actina (Sandiford et al., 2015), essencial para respostas celulares de fagocitose. Fatores de transcrição do tipo GATA, que regulam a hematopoiese e diferenciação de células fagocíticas, também parecem ter importante papel, sendo regulados positivamente em *Anopheles aquasalis* em resposta à infecções por *Plasmodium vivax* e apresentando atividade antibacteriana na microbiota no vetor (Bahia et al., 2018). Outras espécies bacterianas como *Chromobacterium sp.*, isoladas do intestino médio de *A. aegypti* selvagens, aparentam ter atividade entomopatogênica e, quando em biofilme, aumentaram significativamente a resistência dos mosquitos à infecção por DENV (Ramirez et al., 2014). No entanto, talvez um dos melhores exemplos da aplicação de bactérias para controle da transmissão de arboviroses seja o caso de *Wolbachia pipientis* em *A. aegypti* (Moreira et al., 2009). A introdução de linhagens deste endossimbionte no mosquito demonstrou ser eficaz e com alta taxa de dispersão nas populações naturais do vetor na Austrália, Ásia e Brasil (Hoffmann et al., 2011; Bliman et al., 2018), diminuindo a capacidade vetorial do mosquito de três formas: (i) reduzindo a expectativa de vida do vetor, não dando tempo para que a incubação viral seja efetiva para a colonização, (ii) induzindo mecanismos efetores constitutivos que podem afetar os pró-vírus e (iii) diminuindo a carga viral por exclusão competitiva direta (Moreira et al., 2009; Rancès et al., 2012).

Fungos também têm impacto direto no resultado da colonização dos arbovírus e na capacidade vetorial de mosquitos em transmiti-los para o hospedeiro vertebrado. Um exemplo é a infecção de *Anopheles gambiae* por *Metarhizium anisopliae*, um fungo entomopatogênico generalista que acarreta na diminuição de ciclos gonotróficos, o que reduz a população de mosquitos. O fungo também é responsável por interferir na habilidade de voo do mosquito e na distinção olfativa de alvos para a hematofagia, diminuindo a capacidade do mosquito de transmitir *Plasmodium falciparum* (Scholte et al., 2006). Paradoxalmente, a gravidade da infecção por outro fungo entomopatogênico, *Beauveria bassiana*, também parece provocar e ser

modulada por disbiose no microbioma intestinal de *Anopheles stephensi*, promovendo queda na expressão de AMPs, o que culmina na proliferação de bactérias e fungos oportunistas que atuam sinergisticamente com *Beauveria*, ocasionando a morte dos mosquitos (Wei et al., 2017), demonstrando mais uma vez a importância da comunidade microbiana e de sua interação direta com o mosquito, com arbovírus e entomopatógenos na capacidade vetorial de mosquitos. Tais infecções são tão bem sucedidas que vêm sendo utilizadas em formulações com os conídios fúngicos contra tais mosquitos (Bukhari et al., 2011). Foi demonstrado ainda que *Edhazardia aedis*, fungo microsporídeo conhecido por colonizar populações de *A. aegypti* em longo prazo (Becnel e Johnson, 2000), pode promover um perfil de expressão de substâncias antimicrobianas semelhante àquele induzido pela infecção por DENV e CHIKV, sugerindo uma potencial resposta cruzada induzida pela infecção fúngica contra os arbovírus (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010; Duncan et al., 2012).

A ativação de vias imunes parece ser, portanto, um dos principais mecanismos pelos quais a comunidade microbiana pode controlar a carga viral em vetores. Insetos, de forma geral, apresentam uma poderosa resposta imune inata, com alta conservação das vias de sinalização. Uma das vias melhor caracterizadas em *D. melanogaster*, organismo modelo para estudos imunológicos em Diptera, é a via dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) Toll. Esta via constitui uma resposta imunitária clássica contra padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) de bactérias gram-positivas e fungos, levando à produção de AMPs. Outras vias importantes de resposta imune são a IMD, atuando principalmente contra bactérias gram-negativas, além da resposta de melanização, montada principalmente contra infecções fúngicas filamentosas e de outros patógenos eucarióticos (Christensen et al., 2005; Blair e Olson, 2014; Wang et al., 2018). A indução dessas vias ocorre, muitas vezes, de forma inter-relacionada como resposta a patógenos com ciclos infectivos complexos intra e extracelular, como é o caso dos vírus. Não obstante, outras duas vias são relevantes nas respostas antivirais: JAK/STAT e RNA de interferência (RNAi). A via de JAK/STAT tem expressão de fatores de transcrição específicos para infecções por DENV em *A. aegypti* (Deddouche et al., 2008), enquanto a via de RNAi é presente em virtualmente todos os organismos celulares eucarióticos. Esta via se utiliza da endonuclease DICER para reduzir o tamanho de RNAs não codificantes de dupla fita (dsRNA), gerando pequenos RNA interferentes (siRNA) ou micro RNA (miRNA) que se associam com o complexo silenciador induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*) e

proteínas da família Argonauta (Ago) para reconhecer sequências cognatas, causando sua repressão (Olson e Blair, 2015). É, por conta disso, um conhecido mecanismo de regulação em genes *housekeeping* (Cerutti e Casas-Mollano, 2006). Hoje, é sabido que este representa o principal mecanismo de defesa em mosquitos contra arbovirus, por conta da função de reconhecer ácidos nucleicos exógenos presentes no citoplasma e promover a clivagem de RNA mensageiro (mRNA) viral (Sanchez-Vargas et al., 2004; Blair, 2011). O entendimento de todos estes fatores intrinsecamente relacionados é essencial não somente para elucidar como se dá a infecção de arbovírus em mosquitos, mas também ponderar como cada componente governa seu sucesso ou fracasso para que estratégias efetivas de controle de transmissão viral e/ou controle populacional do vetor sejam criadas (Cansado-Utrilla et al., 2020). Tal perspectiva se torna impulsionada pelo avanço da biologia computacional e de tecnologias de sequenciamento de comunidades microbianas inteiras, ou metagenomas, que representa uma metodologia altamente sensível para a prospecção e caracterização genômica de microrganismos promissores para lidar com o crescente arsenal patológico transmitido por *A. aegypti*.

1.4. Revolução das máquinas: A era da (Meta)genômica na ecologia microbiana.

Por muito tempo, a microbiologia convencional contou com técnicas dependentes de cultura para o estudo de microrganismos. Esta estratégia resultou em estudos pioneiros de descrição da microbiota humana e sua importância para a homeostase (Darwish et al., 1978; Tanner et al., 1984; Mombelli et al., 1987). No entanto, um problema conhecido deste tipo de método é a dificuldade de cultivo de microrganismos, gerando viés nas análises para organismos cultiváveis. Estudos sobre a diversidade microbiana ambiental mostram que a abundância estimada de espécies bacterianas em ambientes aquáticos ou no solo é extraordinariamente maior que aquela capturada por métodos dependentes de cultura. Além disso, a utilização destes métodos resulta em descrições sempre com os mesmos táxons ou relacionados, com pouca variabilidade composicional entre os ambientes estudados (Rappé e Giovannoni, 2003). O viés da capacidade de cultivo em laboratórios é um problema descrito há quase um século e conhecido como “a grande anomalia da contagem em placas”, observado por microbiologistas que estudavam a diversidade bacteriana em corpos d’água, onde a quantidade de microrganismos que de fato cresciam em cultura era muito menor do que a de diferentes morfologias observadas à luz do microscópio (Razumov, 1932; Staley e Konopka, 1985). A base para explicar tal fenômeno

pode estar nos mais diversos fatores intrínsecos e ambientais relacionados às peculiaridades metabólicas, fisiológicas e celulares de cada microrganismo, tais quais adaptação à heterogeneidade espacial e temporal, quimiotaxia e adesão a substratos específicos, resposta à *stress* ambiental, estados de dormência, impossibilidade de detecção em cultura devido a tamanho de ultra-micro-bactérias, oligotrofia e dependência de co-cultivo por conta de interações metabólicas, além da possível necessidade de *quorum-sensing* inter-específico (Overmann et al., 2017).

Os avanços da biologia molecular nos últimos 30 anos revolucionaram a área de estudos genômicos e microbiológicos, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) um dos mais emblemáticos símbolos desta revolução, introduzindo o estudo da diversidade microbiana independente de cultivo, que futuramente iria dar origem à metagenômica. Este foi um importante passo para o desenvolvimento de metodologias de obtenção e análise de sequências que expandiu nosso conhecimento sobre comunidades microbianas com a possibilidade de isolamento do DNA e RNA de amostras ambientais, hospedeiros e de tecidos específicos. Um dos primeiros métodos de sequenciamento a ser largamente utilizado foi o método dideoxi ou método de terminação da cadeia (Sanger et al., 1977). Por conta de sua futura implementação em plataformas automatizadas no fim da década de 80, este permaneceu sendo o principal método de sequenciamento por cerca de 30 anos. No final da década de 90, com a crescente demanda na quantidade e rapidez de sequenciamento, dadas especialmente pela complexidade do Projeto Genoma Humano (Schuster, 2008), novas plataformas com alto desempenho e paralelização foram desenvolvidas. Nos anos 2000, essas plataformas incorporaram desenvolvimentos recentes na área da robótica, computação e nanotecnologia, permitindo sua automação completa e miniaturização, o que permite que um maior número de amostras seja sequenciado em menos tempo. Tais soluções promoveram também o desenvolvimento da genômica em todos os ramos da árvore da vida (Schuster, 2008). As novas plataformas de sequenciamento deram origem ao sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*), com destaque para as plataformas 454 (Roche) e Genome Analyzer (Illumina-Solexa), primeiras a serem comercializadas nos anos 2000. Com sua alta capacidade de geração de *reads* simultaneamente, essas plataformas permitiram que genomas completos de procariotos fossem sequenciados em poucos dias, enquanto métodos de sequenciamento baseados em sistemas capilares levariam meses ou até anos (Rivera e Izard,

2015). Além disso, as plataformas NGS utilizam bibliotecas de fragmentos de DNA sem a necessidade de clonagem, o que reduz também a possibilidade de viés na amostragem do sequenciamento (Mardis, 2008; Behjati e Tarpey, 2013). Para o emergente campo de estudo da metagenômica, esses avanços representaram um progresso na capacidade de geração e análise de dados de comunidades microbianas ambientais inteiras, dando origem ao que conhecemos hoje como microbiomas.

Para que tais análises sejam feitas, no entanto, grandes e complexos conjuntos de dados precisam ser processados simultaneamente para melhor elucidar as dinâmicas da comunidade microbiana. As análises metagenômicas passam pela computação e classificação das sequências em filotipos, que é realizada de acordo com a similaridade entre os *reads* provenientes do sequenciamento massivo alinhados a bancos de dados de sequências (Hao et al., 2017). Análises quantitativas, relacionadas à ecologia da comunidade de microrganismos presentes no microbioma também são necessárias para a descrição e caracterização de sua diversidade. Os índices para cálculo da diversidade levam em consideração dois fatores principais: riqueza (*richness*) e equitabilidade (*evenness*). O número de diferentes filotipos observados em uma comunidade microbiana é definido como sua riqueza. O outro fator, equitabilidade, compara a uniformidade do tamanho populacional de cada espécie em uma amostra, ou seja, é uma medida da abundância relativa de espécies diferentes em uma comunidade, indicando se existem poucas espécies que são muito abundantes e outras que são muito raras, por exemplo. Estes fatores são comumente utilizados em índices descritos em estudos probabilísticos de distribuição, cada um com direcionamento teórico bem definido. O índice de Shannon-Weaver (Shannon, 1948), por exemplo, põe mais peso na variável riqueza, ainda que também considere a equitabilidade. O valor da diversidade H' , com este índice, aumenta em função da proporção do número de indivíduos p e à medida que a abundância relativa de filotipos S se torna mais uniforme (Kim et al., 2017), sendo, portanto, expresso pela equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Já o índice de reciprocidade de Simpson (Simpson, 1949) é mais sensível às espécies mais abundantes, sendo uma medida de dominância de táxons que descreve a probabilidade D de que

diferentes unidades (*reads*, no caso de sequências) amostrados ao acaso em uma comunidade com N táxons pertençam a determinado táxon n , da seguinte forma:

$$D = \frac{N(N - 1)}{\sum n(n - 1)}$$

A diversidade observada de filotipos é também muito útil para a estimativa da diversidade total em uma amostra. O estimador de diversidade Chao1 (Chao, 1984; 1990; 2010) é um dos mais confiáveis para calcular a riqueza total esperada de filotipos S_p , baseando-se na riqueza observada entre determinadas amostras a_1 e a_2 e atribuindo valor àqueles com menor abundância, ou seja, considerando a raridade de táxons não identificados S_0 , portanto matematicamente representado como:

$$S_p = S_0 + \frac{a_1(a_1 - 1)}{2(a_2 + 1)}$$

Tal quantificação de espécies observadas quando representada com interpolação em relação aos tamanhos amostrais, se apresenta como um assintótico de curva, ou seja, seus limites tendem ao infinito (Ma, 2018), o que pode ser utilizado para definir a contribuição da quantidade de *reads* para a identificação de unidades taxonômicas. Ainda assim, da mesma forma que o raio de uma esfera é o índice de seu volume mas não o volume em si, os dois primeiros índices mencionados não representam a totalidade real da diversidade de uma comunidade, porquanto são entropias, dada a incerteza dos resultados do processo amostral (Jost, 2006). Por conta disto, estes índices são aplicados especificamente à escala de uma única comunidade microbiana e são, em conjunto, conhecidos por expressar a diversidade alfa. A observação da diversidade total de espécies em múltiplas amostras e comunidades pode ser definida como diversidade gama (Whittaker, 1972; Tuomisto, 2010). Uma outra medida de grande utilidade consiste na comparação da composição de comunidades microbianas diferentes. A variação da diversidade encontrada entre amostras é expressa pela diversidade beta e é baseada em índices de dissimilaridades ou matrizes de distância (Jaccard, 1912; Bray e Curtis, 1957), representando as diferenças quantitativas entre as comunidades comparadas, podendo levar em consideração além das medidas da relação entre diversidades alfa e gama, as relações filogenéticas entre os

componentes e sua proporção de ausência ou presença para as diferentes comunidades (Ferrier et al., 2007; Chiu et al., 2014).

Todo o avanço tecnológico das plataformas de sequenciamento e seu consequente barateamento permitiu que a caracterização de comunidades microbianas fosse estendida para uma vasta gama de organismos, incluindo insetos vetores. Estudos anteriormente mencionados que se propuseram a descrever a microbiota e bacterioma de *A. aegypti* fornecem registros importantes sobre a comunidade microbiana em níveis taxonômicos de gênero e filo nestes vetores. Ainda assim, as metodologias de amplificação, ainda muito utilizadas nestes estudos, podem sub-representar OTUs (do inglês *Operational Taxonomic Unit*) menos abundantes nas comunidades (Ritz, 1998), ou mesmo não amplificar OTUs com sequências canônicas mais divergentes. Além disso, com o uso de oligonucleotídeos específicos para fragmentos de um único gene, como a subunidade 16S do rRNA, a representação taxonômica analisada não leva em consideração eucariotos, vírus e archaea, embora seja eficaz para a identificação de filotipos em nível de filós e gêneros bacterianos. Como alternativa a este padrão ouro de identificação taxonômica bacteriana, técnicas que visam o sequenciamento de regiões aleatórias provenientes de amostras de metagenomas completos foram desenvolvidas, com base na alta performance de plataformas NGS. A técnica de *Whole Genome Shotgun* (WGS) tende a apresentar resultados robustos, permitindo uma resolução dos filotipos mais sensível, em níveis taxonômicos mais profundos devido à amostragem de múltiplas regiões gênicas de um mesmo microrganismo, possibilitando também a análise em maior escala destas regiões e até de genomas inteiros. Essa possibilidade é importante para a descrição genômica de microrganismos que podem ter interferência direta em processos fisiológicos do hospedeiro, incluindo a capacidade vetorial de mosquitos vetores. Ademais, o uso de WGS na metagenômica também permite a agregação de evidências de perfis gênicos nas amostras que podem ser utilizados em análises de enriquecimento funcional de sua comunidade microbiana (Jovel et al., 2016; Hillmann et al., 2018; Seol et al., 2019).

Apesar das vantagens da utilização do WGS, sua aplicação para descrever o microbioma de insetos vetores, especialmente culicídeos, ainda é escassa (Scolari et al., 2019). O recentemente descrito microbioma das moscas *Chrysomya megacephala* e *Musca domestica* (Junqueira et al., 2017) é um dos exemplos que se utiliza do alto poder de resolução taxonômica da metodologia de WGS para descrever espécies no microbioma de vetores. Em mosquitos, tal

tecnologia já foi empregada para descrever o viroma de espécies de *Culex* e *Anopheles*, demonstrando alta sensibilidade para a caracterização taxonômica nestes sistemas (Xia et al., 2018). Desta forma, o estudo sobre o microbioma do intestino médio em maior resolução metagenômica de outros vetores de arboviroses tropicais negligenciadas, especialmente *A. aegypti*, e sua modulação funcional em resposta a aspectos importantes da biologia do mosquito, como a hematofagia, ainda permanecem elusivos. Baseando-se nisto, nós hipotetizamos que mosquitos adultos de *A. aegypti* podem apresentar espécies microbianas simbióticas de interesse para o estudo genômico no microbioma de seu intestino médio e que o processo digestivo neste micro-habitat pode alterar sua composição, diversidade e funcionalidade, a depender de diferentes dietas. Desta forma, o intestino médio de fêmeas adultas de *A. aegypti* alimentadas com açúcar ou sangue foi analisado neste trabalho, utilizando-se a metodologia de WGS. A alteração do microbioma em intervalos de 12, 24 e 48 horas pós-alimentação foi acompanhada e comparada com o microbioma larval. Informações funcionais da comunidade microbiana foram inferidas a partir dos dados metagenômicos para enriquecer e reconstruir perfis funcionais associados com mosquitos adultos. Por fim, análises estatísticas e atribuições de significância foram empregadas em vários níveis taxonômicos de forma a comparar os perfis de diversidade e funcionais associados a cada grupo e definir as espécies microbianas associadas com cada dieta e períodos de tempo decorrido após a alimentação.

2. JUSTIFICATIVA

A atual situação de doenças tropicais negligenciadas põe em xeque a saúde de bilhões de pessoas globalmente. Febre amarela, Dengue, Zika, Chikungunya, dentre outras arboviroses, figuram entre elas e possuem algo em comum: seus agentes etiológicos são transmitidos em diversos continentes pelo mosquito *A. aegypti* (Diptera: Culicidae). A política de saúde pública para diminuição da ocorrência do número de casos destas viroses é realizada globalmente por meio do controle do inseto vetor, porém este controle é majoritariamente químico, ocasionando a seleção de resistência aos inseticidas em mosquitos. Além disso, o uso de inseticidas representa riscos à saúde humana e animal devido à sua toxicidade e bioacumulação no meio ambiente. O custo global anual estimado apenas para o tratamento de Dengue é em torno de US\$ 9 bilhões, levantando suspeitas sobre o quão proibitivo o custo total para controle do vetor possa ser e tornando urgente o estudo para desenvolvimento de novos métodos sustentáveis para este fim. Microrganismos vêm demonstrando ser extremamente promissores neste sentido e estudos atuais apontam a relevância do microbioma do intestino médio na capacidade vetorial de mosquitos. Diversos gêneros microbianos já são conhecidos por estabelecer diferentes tipos de simbiose com estes vetores e causarem impactos não somente em seu *fitness*, como também metabolismo, fatores que estão intrinsecamente ligados à homeostase de insetos hematófagos. A importância do repasto sanguíneo nos padrões de composição do bacterioma do intestino médio de *A. aegypti* já foi demonstrada previamente com métodos baseados em cultura e análises de sequências da subunidade 16S do rRNA, que tendem a subestimar a diversidade ou resolução taxonômica de sua comunidade microbiana. Faz-se necessário, portanto, estudos que a caracterizem de forma mais integrativa, visando demonstrar padrões de colonização de potenciais simbioses e o impacto desta composição microbiana a nível genômico nas interações com o holobionte. O presente trabalho faz uso de sequenciamento de nova geração aliado à metodologia de *whole genome shotgun* para descrever, em termos de composição e funcionalidade, os microbiomas do intestino médio de fêmeas adultas de *A. aegypti* alimentadas com açúcar ou sangue, suas alterações em 12, 24 e 48 horas após a alimentação e como estes podem ser comparados com o microbioma presente em larvas de 4º estágio. Este trabalho constitui o maior conjunto de dados metagenômicos já gerado para *A. aegypti* e pretende disponibilizar uma resolução taxonômica do microbioma em nível específico e em escala individual, com a perspectiva de gerar conhecimento para programas de controle de vetores mais efetivos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar o microbioma do intestino médio de fêmeas adultas submetidas a diferentes regimes alimentares, em diferentes horas pós-alimentação, e de larvas do 4º estágio de *A. aegypti*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a profundidade do sequenciamento de amostras e calcular curvas de rarefação com a riqueza de filotipos nos grupos amostrais;
- Analisar a composição do microbioma de fêmeas adultas e larvas de *A. aegypti*;
- Comparar os microbiomas dos diferentes grupos experimentais;
- Determinar a diversidade alfa e beta da comunidade microbiana;
- Caracterizar perfis funcionais microbianos;
- Estabelecer o impacto de cada dieta e tempo de digestão nos microbiomas e espécies significativamente associadas com as diferentes dietas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho experimental

Visando comparar objetivamente a diversidade de comunidades microbianas relacionadas a alimentações distintas, fêmeas recém emergidas da espécie *A. aegypti* foram mantidas em laboratório com dois regimes alimentares diferentes. O primeiro grupo foi alimentado com sangue de mini porco da espécie *Sus scrofa domesticus* (AB) e o segundo grupo foi alimentado com solução de água destilada e sacarose (AS). Para cada regime alimentar, foram formados três subgrupos de dez indivíduos adultos, de acordo com o tempo decorrido após a alimentação: 12 h, 24 h e 48 h. Adicionalmente, dez indivíduos no quarto estágio larval (grupo L4) também foram analisados, com o objetivo de observar a contribuição do microbioma da fase larval para o microbioma dos indivíduos adultos, ou seja, táxons que não devem estar relacionadas exclusivamente à alteração da dieta. Desta forma, um total de 7 grupos foram utilizados nas análises, totalizando 70 indivíduos para o grupo experimental (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos experimentais de adultos e larvas de *A. aegypti* utilizados para as análises do microbioma. Total de amostras do grupo experimental = 70.

Horas pós alimentação	Alimentação com sangue	Alimentação com açúcar	Larvas de 4º estágio
			
12h	n = 10	n = 10	n = 10
24h	n = 10	n = 10	
48h	n = 10	n = 10	

Além dos grupos experimentais, quatro amostras foram utilizadas como controles positivos do experimento: (1) uma amostra de água que serviu de fonte para o criadouro das larvas (CLW), de forma para avaliar a contribuição do ambiente de criação das larvas em seu microbioma; (2) uma amostra da solução de água com açúcar (CWS); e (3) uma amostra de sangue de *Sus scrofa domesticus* (CB) que foi utilizada para alimentação do grupo experimental.

Três amostras que serviram como controle negativo também foram incluídas, contendo apenas os reagentes dos protocolos utilizados para a extração de DNA das amostras, sendo estes: (1) protocolo para extração de DNA de tecidos dos mosquitos (NCM); (2) protocolo para extração do DNA de sangue (NCB); e (3) protocolo de extração de DNA de amostras de água (NCW). Assim, um total de 77 amostras foram processadas, sequenciadas e analisadas com o mesmo fluxo de trabalho.

4.2. Extração e sequenciamento de DNA.

As amostras de fêmeas adultas foram separadas e seus intestinos médios foram dissecados com a ajuda de um estereoscópio e mantidos em 300 µl de tampão Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X, pH 7.4 (Gibco – ThermoFisher). As amostras de intestino, bem como as larvas separadas da bandeja de criação foram, em seguida, maceradas com macerador elétrico (VWR International) e os homogeneizados foram utilizados para a extração de DNA total utilizando o protocolo para tecidos de insetos do kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante. A amostra de sangue de mini porco teve seu DNA total extraído com o mesmo kit, mas seguindo as instruções do protocolo específico para extração de sangue. As extrações de DNA das amostras de água foram realizadas seguindo o protocolo padrão do kit DNeasy PowerWater (Qiagen). Os controles negativos seguiram os respectivos protocolos, usando apenas os reagentes dos kits. A quantificação do DNA foi realizada por fluorimetria com o kit Qubit fluorescence assay (ThermoFisher) e a integridade do DNA foi avaliada em sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). O DNA total das amostras foi fragmentado com ultrassom utilizando o ultrasonicador Covaris S220 (Covaris Inc.) e os fragmentos foram selecionados por tamanho em um sistema de eletroforese Pippin Prep (Sage Science) com um cassete de agarose 2%. Os fragmentos de 300 a 450 pb coletados foram purificados com *beads* magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) e as bibliotecas foram construídas com o kit Illumina TruSeq, seguindo o protocolo do fabricante. Todas as bibliotecas foram indexadas com TruSeq DNA LT adapters (Illumina Inc.), permitindo que múltiplas amostras fossem sequenciadas simultaneamente na mesma *flowcell*. As bibliotecas foram quantificadas com Quant-iT™ Picogreen® (Invitrogen) e as concentrações finais foram validadas por qPCR, seguindo as instruções do kit KAPA SYBR® FAST qPCR (Kapa Biosystems). Quantidades equimolares (8-12 pM) de cada biblioteca indexada foram misturadas para sequenciamento

multiplex em plataforma HiSeq 2500 (Illumina Inc.) com um protocolo *paired-end* de 251 pb. As bibliotecas e o sequenciamento foram realizados no Singapore Centre for Environmental Life Sciences Engineering da Nanyang Technological University, em Singapura.

4.3. Processamento dos dados sequenciados.

Os arquivos fastq gerados após o sequenciamento passaram por um processo de retirada de sequências adaptadoras e com baixa qualidade (*trimming*) utilizando o *software* cutadapt v. 1.15 (Martin, 2011). Foi permitida tolerância máxima de 0.2 de taxa de erro para reconhecimento e retirada de adaptadores e um *cutoff* para a remoção das sequências de baixa qualidade, mantendo apenas os *reads* com $Q > 20$. O conjunto de sequências de alta qualidade foi submetida a mapeamentos contra o genoma completo de *A. aegypti* (nº de acesso GCA_002204515.1) utilizando os programas Bowtie 2 (Langmead and Salzberg, 2012) com parâmetros seletivos para alta estringência (*--very-sensitive*) e SAMtools (Li et al., 2009). A fração remanescente de *reads* não alinhada ao genoma do mosquito seguiu, então, para as análises individuais do microbioma. Este procedimento permitiu a redução do tamanho final dos *datasets* a serem analisados e, portanto, dos recursos computacionais utilizados para as análises metagenômicas. Os *datasets* não-hospedeiro resultantes foram analisados com o programa RapSearch2 v. 2.15 (Zhao et al., 2012), uma ferramenta que se utiliza de um alfabeto reduzido de aminoácidos e do método computacional de *suffix array* para identificação dos *reads* dos metagenomas analisados. Para isso, o arquivo fastq de cada amostra, com conteúdo nucleotídico, foi utilizado como *input* para o programa, que traduziu os *reads* em seis *frames* e os alinhou contra o banco de dados *Non-Redundant Protein Database* (NR) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Todos os procedimentos descritos foram realizados previamente e originaram os conjuntos de dados analisados neste trabalho.

4.4. Atribuição taxonômica e funcional.

Os resultados dos alinhamentos do RapSearch2 foram importados para o software MEGAN v. 6.18.8 (Huson et al., 2016). Este programa é uma suíte de aplicativos para análise e visualização comparativa de dados metagenômicos, permitindo o agrupamento dos *reads* em diferentes níveis taxonômicos. As atribuições de táxons foram realizadas com parâmetros estritos do algoritmo de *Lowest Common Ancestor* (LCA), levando em consideração o tamanho dos *reads*

para cada amostra com as seguintes configurações: *Max Expected* = 0.01, *Top Percentage* = 10.0, *Min Support* = 25, *Min Complexity* = 0.33, *Paired Reads* = On. O número de *reads* dos *datasets* foi, então, normalizado para aquele do *dataset* com menor número de *reads* das 70 amostras experimentais analisadas, representando, desta forma, a abundância relativa de táxons microbianos e permitindo a comparação entre amostras. Os gráficos para visualizações comparativas foram gerados para o nível taxonômico de domínios e espécies em escala quadrática, enquanto a análise comparativa para o nível de filos foi gerado em escala percentual. Adicionalmente, os perfis funcionais para os diferentes metagenomas foi realizado por meio da atribuição de genes identificados nos conjuntos metagenômicos a classes funcionais com enriquecimento via SEED *hierarchy* (Mitra et al., 2011). Os resultados foram plotados em *heatmaps* com escala em *z-score* e agrupados hierarquicamente por classes. A distribuição de classes funcionais foi calculada com a dissimilaridade de Bray-Curtis e redimensionada em três dimensões de componentes principais com a análise de principais componentes (PCoA, do inglês *Principal Components Analysis*). Para as análises de diversidade funcional, foi empregada uma ordenação de conjuntos difusos (FSO, do inglês *Fuzzy Set Ordination*) com dissimilaridades funcionais.

4.5. Estimativas de diversidade da comunidade microbiana.

Para as análises de diversidade, o *Simpson Reciprocal Index* e o *Shannon-Weaver Index* foram gerados em uma tabela exportada do MEGAN 6, enquanto o *chao1 Richness Estimator Index* foi calculado com o pacote *vegan* v. 2.5-6 (Oksanen et al., 2019), utilizando o nível de espécies para táxons bacterianos, fúngicos e virais do banco de dados NCBI taxonomy e mostrados em *box plots*. Análises de variância (ANOVA) foram realizadas para cada método com 1000 permutações e as significâncias par-a-par foram avaliadas com os testes post-hoc *Tukey's honest* e *Wilcoxon's*. Para mostrar a diversidade como função da profundidade de sequenciamento, curvas de rarefação foram computadas com funções do pacote *iNEXT* v. 2.0.20 (Hsieh et al., 2016), utilizando parâmetros de interpolação e extrapolação para os números de diversidade de Hill (Hill, 1973). O cálculo do Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS, abreviado do inglês *Non-Metric Multidimensional Scaling*) também foi realizado no pacote *vegan*, utilizando a dissimilaridade de Bray-Curtis e cálculo de elipsóides contendo intervalos de confiança a partir dos centróides de cada grupo experimental. Para interpretação

estatística dos resultados, análise de similaridades (ANOSIM) e análise multivariada com matrizes de distância (ADONIS) foram implementadas, ambas com 1000 permutações. Todas as visualizações foram geradas no pacote ggplot2 v. 3.3.0 (Wickham, 2016).

4.6. Distribuição de espécies e redes de co-ocorrência.

Regressões lineares diretas foram empregadas na dispersão de variáveis quantitativas, de forma a identificar a correlação da abundância relativa de espécies ou de índices de diversidade com as horas decorridas pós-alimentação. Para identificar espécies estatisticamente associadas com variáveis categóricas, como o tipo de dieta, nós utilizamos um modelo adaptado de Torondel e colaboradores (2016), que se utiliza de uma matriz de abundância dos filotipos e variáveis ambientais no formato phyloseq (McMurdie e Holmes, 2013), para o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal e Wallis, 1952). Os *p-values* foram calculados para cada conjunto "filotipo - grupo experimental" e corrigidos para testagem múltipla utilizando taxa de erro *familywise*, com sua significância baseada no *threshold* de 0.05. Estes foram, então, utilizados para ranquear espécies com o Random Forest Classifier, um método de *machine learning* não supervisionado, treinado com uma fração dos conjuntos de dados. O modelo consiste em um grande número de árvores de decisão, onde cada árvore prediz classes, ou associações de variáveis independentes (neste caso a abundância relativa de espécies) com variáveis dependentes (metadados associados aos metagenomas). As associações mais frequentemente preditas são aceitas pelo algoritmo baseando-se na medida de *Mean Decrease in Accuracy* (Breiman, 2001), que considera a perda de acurácia analítica do modelo na exclusão de cada componente.

Para mapear a densidade probabilística das ordens bacterianas mais abundantes, foram estimadas suas densidades bivariadas de Kernel (Venables e Ripley, 2002) em função da média da distribuição de *reads* atribuídos a todas as outras ordens microbianas e suas relações são visualizadas tridimensionalmente em escala log10. Adicionalmente, redes de co-ocorrência foram estimadas baseadas na teoria dos grafos para o microbioma de mosquitos adultos com o intuito de analisar potenciais interações microbianas relacionadas a diferentes dietas e ao tempo decorrido após a alimentação. As redes foram geradas baseando-se em uma matriz de adjacência com *threshold* de significância 0.05 para cada associação microbiana com coeficiente bivariado de correlação de Pearson (Pearson, 1895) mínimo de $r = 0.75$. A atribuição de eixos foi automatizada com o módulo *iGraph* (Csardi et al., 2006), removendo todos os eixos nulos, ou

seja, espécies sem correlações significativas, de forma a facilitar a visualização no software Gephi (Bastian et al., 2009). Como *input* para essas análises, uma matriz de abundância baseada na presença de espécies em no mínimo 10% das amostras de cada grupo foi gerada, com um *cutoff* de 200 *reads*, removendo táxons raros. Todos os pacotes e programas mencionados nesta seção e anteriores foram adaptados ou escritos, gerando *scripts* customizados na linguagem de programação R v.3.6.3 (R Core Team, 2013).

5. RESULTADOS

5.1. Extração e sequenciamento.

Neste trabalho, foram gerados um total de 76 conjuntos de dados metagenômicos individuais, sendo 60 de fêmeas adultas de *A. aegypti*. Destas, 30 fêmeas foram alimentadas com sangue e 30 foram alimentadas com açúcar. Cada um destes grupos foi subdividido em amostras às 12, 24 e 48 horas pós a alimentação, incluindo dez indivíduos para cada subgrupo. Dez larvas de 4º estágio também foram analisadas, além de três controles dos grupos experimentais e três controles dos protocolos de extração de DNA.

A quantidade de DNA extraído e de *reads* analisados por amostra que prosseguiram para as análises metagenômicas pode ser observada na Figura 3. Apesar da baixa quantidade de DNA extraída no intestino médio de cada indivíduo (em média: L4 = 0.599 ng/μl ± 0.121; AB = 0.783 ng/μl ± 0.385; AS = 1.372 ng/μl ± 0.752), o sequenciamento foi eficaz para produzir quantidade suficiente de *reads* para as análises metagenômicas.

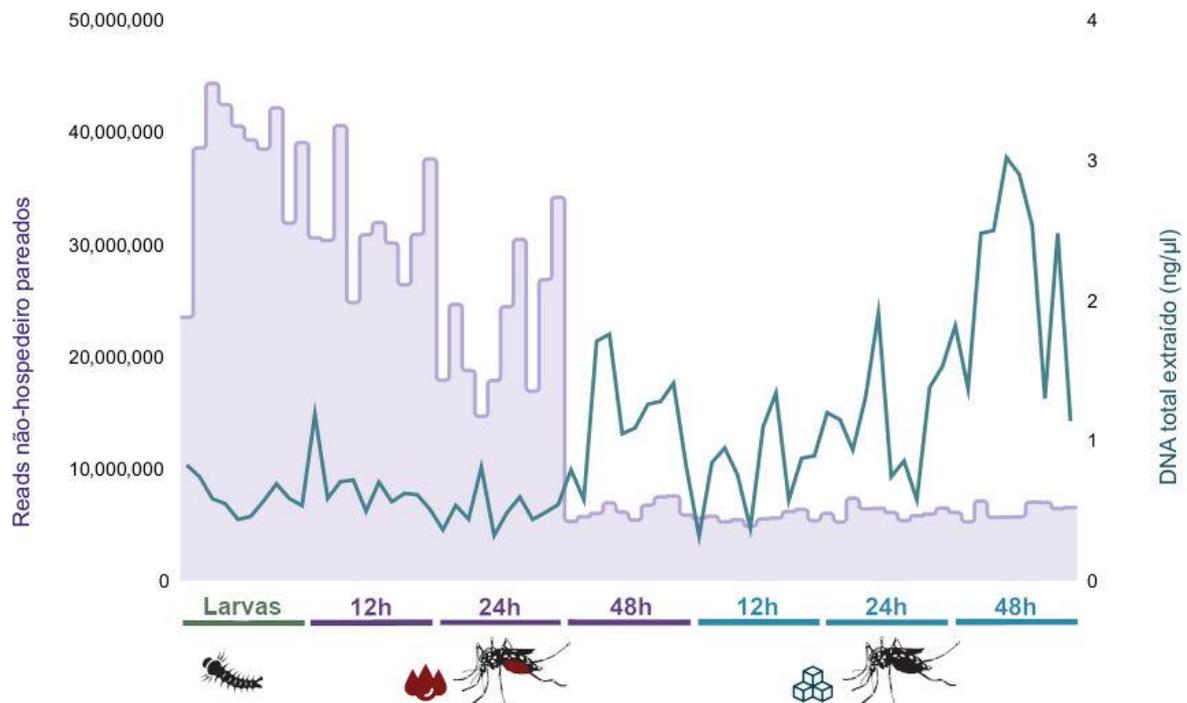


Figura 3. Comparação entre a quantidade total de *reads* não atribuídos ao hospedeiro mosquito (*non-host*) obtidos para a atribuição taxonômica microbiana plotada à esquerda do eixo y e o rendimento de DNA total extraído, mostrado à direita do eixo y. As quantidades de ambos para cada amostra de mosquito são mostradas no eixo x e classificadas de acordo com seus grupos experimentais.

Um total de 3.296.465.146 *reads* foi gerado para todos os conjuntos de dados. Destes, 1.462.363.474 *reads* (44,3%) foram classificados como *reads* não pertencentes ao hospedeiro (NH) após a remoção *in silico* das sequências genômicas do mosquito utilizando o programa Bowtie 2 para mapear os *reads* contra o genoma de referência de *A. aegypti*. As quantidades totais de *reads* analisados por grupo, antes e após o mapeamento contra o genoma de *A. aegypti*, além da quantidade de *reads* analisadas nas amostras dos controles dos protocolos e experimentais podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. *Reads* de alta qualidade ($Q > 20$) gerados no sequenciamento dos metagenomas por grupo experimental ($n = 10$). *Reads* não-hospedeiro (NH) correspondem à fração de *reads* que não foi alinhada ao genoma de referência de *A. aegypti*. Destes, apenas *reads* NH pareados (R1 + R2) seguiram para as análises metagenômicas.

Grupo / Amostra	<i>Reads</i> Illumina Q > 20	Porcentagem de <i>Reads</i> NH	<i>Reads</i> NH	<i>Reads</i> NH pareados
L4	425.359.404,000	90%	383.479.786,000	380.546.102,000
AB.12	512.266.456,000	65%	334.582.030,000	314.281.426,000
AB.24	479.706.728,000	52%	250.439.134,000	226.721.696,000
AB.48	431.233.692,000	23%	101.205.370,000	63.179.642,000
AS.12	450.335.184,000	22%	100.488.419,000	55.979.594,000
AS.24	476.873.510,000	22%	106.143.206,000	61.237.070,000
AS.48	434.510.550,000	23%	99.845.907,000	62.512.350,000
CLW	45.564.024,000	-	-	-
CB	39.235.200,000	-	-	-
CWS	513.736,000	-	-	-
NCM	207.524,000	-	-	-
NCB	66.284,000	-	-	-
NCW	592.854,000	-	-	-

L4 – Estágio Larval 4; AB – Adultos alimentados com sangue; AS – Adultos alimentados com açúcar; CLW – Controle da água de larvas; CB – Controle de sangue; CWS – Controle de água com açúcar; NCM – Controle negativo de mosquitos; NCB – Controle negativo de sangue; NCW – Controle negativo de água.

Os *reads* pareados totais utilizados nas análises metagenômicas somam 1.250.637.502 (em média: L4 = $38.054.610 \pm 6.105.856$ *reads*; AB = $20.139.425 \pm 11.488.999$ *reads*; AS = $5.990.967 \pm 624.586$ *reads*), indicando uma alta razão de *reads* não-hospedeiro por DNA total obtido em amostras dos grupos de larva e adultos alimentados com sangue, especialmente às 12h e 24h. Isso se deve à profundidade de sequenciamento das bibliotecas pertencentes a estes grupos e significa que essas amostras obtiveram maior abundância absoluta pré-normalização de *reads* não-hospedeiro que foram efetivamente utilizados para as análises do microbioma, mesmo com uma menor quantidade de material nucléico extraído em relação aos outros grupos. Algumas das amostras pertencentes a estes grupos apresentam de 40 a 45 milhões de *reads*, tratando-se de uma quantidade alta após a remoção *in silico* de *reads* do hospedeiro.

De uma forma geral, amostras dos grupos L4 e AB atingem um platô de rarefação em aproximadamente 400.000 *reads*, no qual o aumento no número de *reads* sequenciados não adiciona significativamente riqueza de gêneros e espécies microbianas identificadas nos conjuntos de metagenomas analisados (Figura 4A e 4B, respectivamente). Já as amostras do grupo AS atingem esta rarefação, de uma forma geral, com uma quantidade muito menor de *reads*, com aproximadamente 50.000 (Figura 4). Independentemente disto, a quantidade de *reads* de todas as amostras é suficientemente alta para identificação da riqueza dos metagenomas antes de atingir a saturação.

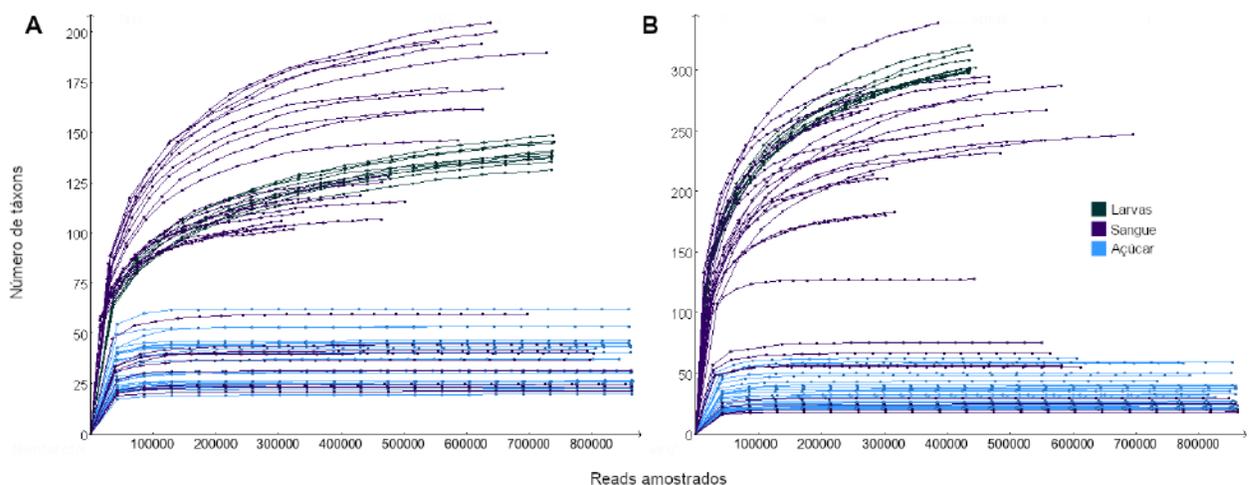


Figura 4. Curvas de rarefação das amostras analisadas com o número normalizado de *reads* em relação à riqueza de gêneros (A) e espécies (B) microbianos identificados. A atribuição taxonômica baseou-se no banco NCBI *taxonomy*. Diferentes cores representam amostras pertencentes a diferentes grupos de dietas e estágios de desenvolvimento.

5.2. Mudanças de composição e diversidade microbiana em larvas e adultos.

A identificação de táxons por similaridade de sequências é uma estratégia empregada em ecologia microbiana com o objetivo de descrever a composição e diversidade da comunidade microbiana. Utilizando esta estratégia, nós proporcionamos, neste trabalho, uma análise metagenômica com resolução de filotipos em nível de espécie da composição microbiana presente em larvas e no intestino médio de mosquitos adultos submetidos a diferentes alimentações, de forma a observar a contribuição da colonização microbiana em larvas e das diferentes dietas para a composição do microbioma do intestino médio de adultos, possibilitando também a prospecção de genomas microbianos de interesse para o estudo de relações simbióticas com *A. aegypti*.

A análise da composição destes metagenomas com os conjuntos de dados normalizados mostra que os microbiomas de todos os grupos experimentais apresentam maior abundância relativa do domínio Bacteria (Figura 5A). Larvas demonstram uma prevalência de bactérias do filo Actinobacteria, com aproximadamente 100% de seu microbioma correspondendo a este táxon nas 10 amostras deste grupo (Figura 5B). Isso é explicado pela diversidade de espécies do gênero *Microbacterium* (3.403.719 reads e 65 espécies) detectadas nas larvas, o que provavelmente é um artefato da análise metagenômica (os reads foram dispersados em muitas espécies devido à similaridade de sequências, mas devem pertencer a uma ou poucas espécies dominantes nas larvas). Por conta disto, as espécies de *Microbacterium* foram agregadas em nível de gênero para facilitar as análises.

O grupo experimental composto de fêmeas adultas às 12h e 24h pós-alimentação com sangue também apresentaram grande dominância de bactérias, porém com alta abundância do filo Proteobacteria (Figura 5B). Tal perfil taxonômico apresenta variação após 48h de repasto sanguíneo, com maior abundância relativa do filo Bacteroidetes, representado, em média, em 85% pela espécie *Elizabethkingia anophelis* (340.158 reads; Figura 6). Neste grupo estão presentes também fungos do filo Ascomycota, como *Aspergillus flavus* e *Metarhizium majus*, com 12.508 e 10.260 reads, respectivamente (Figura 6). Isso torna a composição taxonômica deste grupo similar àquela presente no grupo de mosquitos alimentados com açúcar após 48h de alimentação (Figura 5B, Figura 6). A abundância individual de cada táxon microbiano em nível de gênero e espécie está detalhada na Figura 6. Um total de 802 espécies microbianas foi detectada nos metagenomas (em média: L4 = 301,5 ± 17,8; AB = 166,5 ± 93; AS = 18,5 ± 11).

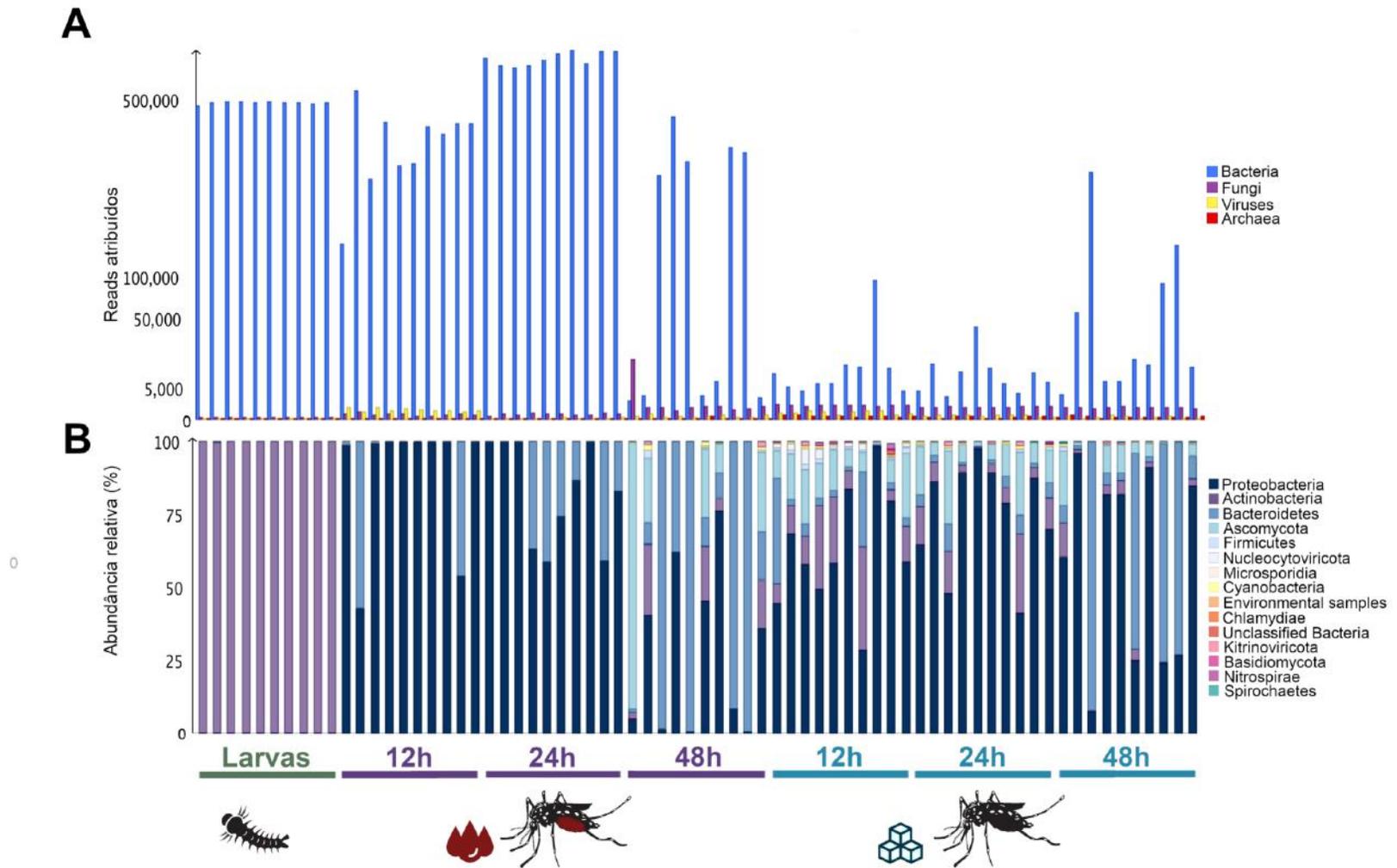


Figura 5. Perfis composicionais do microbioma de mosquitos ao longo de 48h após alimentação com diferentes dietas e em diferentes estágios de desenvolvimento. A) Composição do microbioma em nível taxonômico dos Superreinos Bacteria, Virus e Archaea e Reino Fungi (classificação de acordo com o NCBI), com a quantidade de *reads* atribuídos a cada táxon no eixo y, em escala quadrática. A abundância relativa dos táxons se refere ao número normalizado de *reads*. B) Composição do microbioma de amostras individuais de mosquitos em nível taxonômico de filós microbianos. Abundância de *reads* está representada em escala percentual no eixo y, após a normalização do conjunto de dados.

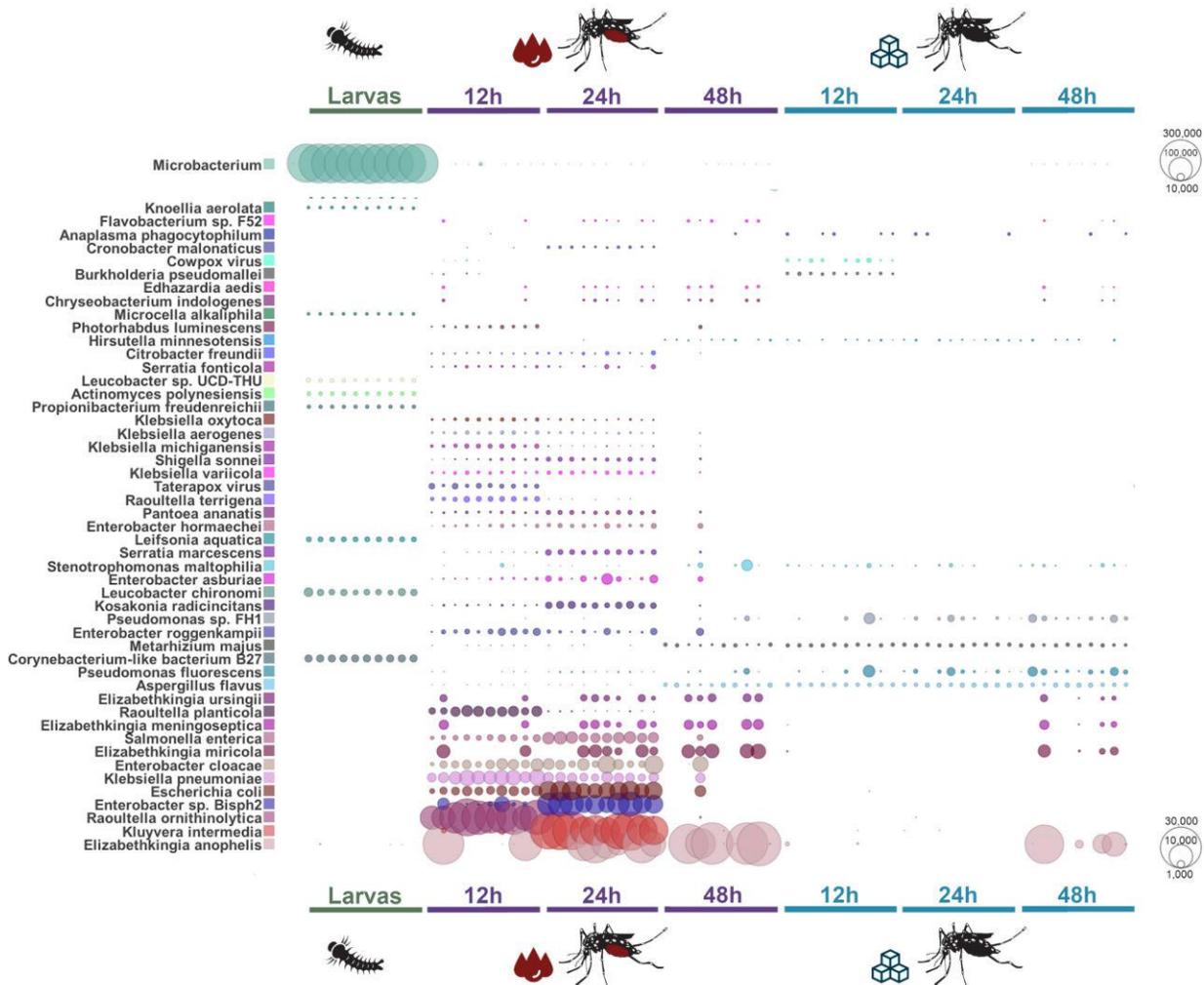


Figura 6. Perfil de espécies microbianas identificadas em mosquitos adultos e em larvas utilizando-se o conjunto normalizado de *reads* para visualização da abundância relativa das espécies microbianas. As bolhas mostram a abundância de *reads* identificados de microrganismos, em escala quadrática, para cada amostra de intestino médio de mosquitos adultos ou larvas. *Microbacterium* spp. foram colapsados no nível taxonômico de gênero e mostrados em escala própria (+ 10x) para comparação entre grupos experimentais.

Poucas espécies microbianas observadas nos grupos experimentais foram detectadas nos controles positivos (Figura 7). A espécie *Pseudomonas fluorescens* (12.100 *reads*) foi identificada no controle de água com açúcar utilizado para alimentar mosquitos adultos. Nesta mesma amostra, *Microbacterium* sp. também pôde ser identificada, fato, no entanto, não observado na amostra de água destilada usada como fonte para o criadouro das larvas. Na amostra controle de sangue, a maior parte dos *reads* detectados pertencia a *Sus scrofa*, com colonização bacteriana quase nula, sendo Taterapox vírus (4.088 *reads*) um dos únicos microrganismos detectados nesta amostra, fato que provavelmente explica a sua detecção em todas as amostras de mosquitos adultos após 12h do repasto sanguíneo. Parte dos microrganismos

presentes nos controles negativos é conhecida por ser contaminante de reagentes de kits de extração de DNA, como *Methylobacterium spp.* (Salter, 2014), porém nenhum deles pôde ser observado nas amostras dos grupos experimentais (Figuras 6, 7).



Figura 7. Espécies microbianas detectadas nos controles positivos e negativos correspondentes a cada grupo experimental de dieta ou estágio de desenvolvimento, ou dos kits de extração de DNA. As bolhas representam a abundância relativa de *reads*, em escala quadrática. Controles positivos referem-se às amostras CLW, CB e CWS, obtidas das fontes de água e alimentação respectivas aos grupos experimentais. Controles negativos referem-se às amostras NCM, NCB e NCW, obtidas dos reagentes utilizados nos respectivos kits de extração de DNA.

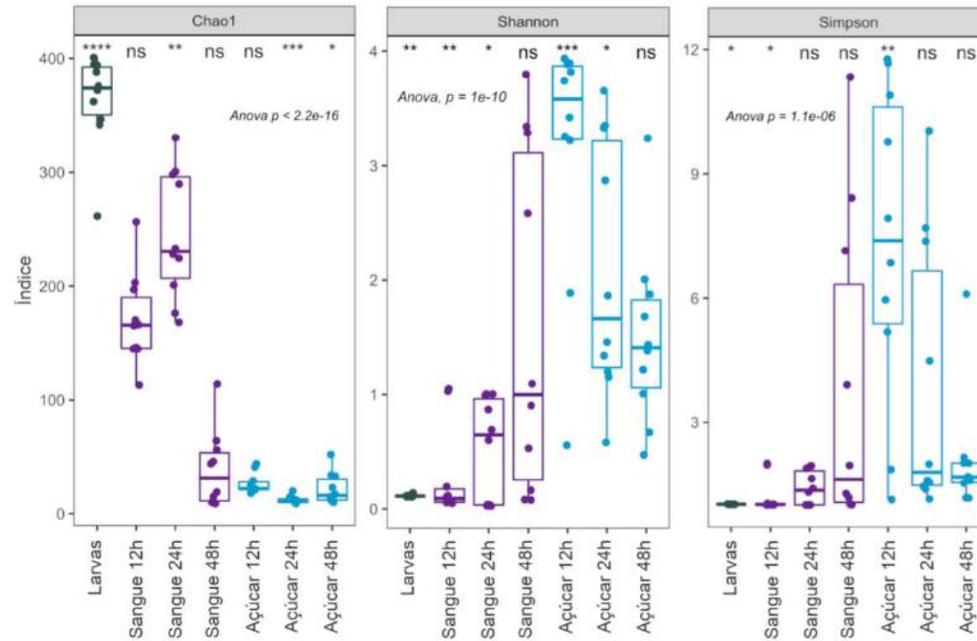
De forma a quantificar as relações ecológicas destas comunidades microbianas, cálculos de diversidade com índices que expressam a riqueza, equitabilidade e singularidade destes microbiomas foram realizados (Figura 8). Com relação ao primeiro, observou-se que larvas

possuem uma abundância de táxons microbianos significativamente maior em comparação com outros grupos. No entanto, todos os táxons são espécies pertencentes ao gênero *Microbacterium*, diminuindo a equitabilidade de seus microbiomas, o que é refletido nos baixos índices de diversidade de Shannon e de Simpson para este estágio de desenvolvimento (Figura 8A). Tal fato demonstra novamente a pouca continuidade transestadial do microbioma da fase larval para a fase adulta nos indivíduos analisados, com grande diferença na composição e diversidade de espécies microbianas em larvas. Por conta disto, as análises comparativas posteriores dos microbiomas em diferentes dietas incluíram somente os grupos experimentais de mosquitos adultos.

Nestes mosquitos, a distribuição da diversidade ocorre de maneira quase proporcionalmente inversa entre os grupos alimentados com sangue e açúcar: enquanto existe um pico de diversidade estatisticamente significativo em mosquitos após 12h de alimentação com açúcar (que é reduzida ao longo das 48h analisadas), o grupo dos mosquitos após as 12h de alimentação com sangue apresenta baixa diversidade alfa, como mostrado pelos índices de Shannon e Simpson. Esta baixa diversidade pode ser justificada principalmente devido à redução da equitabilidade de espécies, uma vez que a riqueza é relativamente alta, como observado no índice Chao1 (Figura 8A).

Similarmente, os intervalos de confiança demonstrando agrupamento de amostras de acordo com seus respectivos grupos mostra que, relativamente à composição no nível taxonômico de espécies, o microbioma de grupo de mosquitos alimentados com açúcar após 12h e de sangue após 12h e 24h são pouco similares, enquanto não existe distinção com alta confiabilidade entre os grupos após 24h e 48h de alimentação com açúcar em relação ao grupo após 48h de alimentação sanguínea (Figura 8B). Portanto, os resultados obtidos com a análise da diversidade beta, que indica a dissimilaridade dos grupos experimentais avaliados, indicam que a dieta é a variável independente que melhor explica as diferenças em composição dos metagenomas e o tempo (em horas) decorrido após a alimentação é a segunda variável que melhor explica as diferenças observadas na composição dos microbiomas (Figura 8B).

A



B

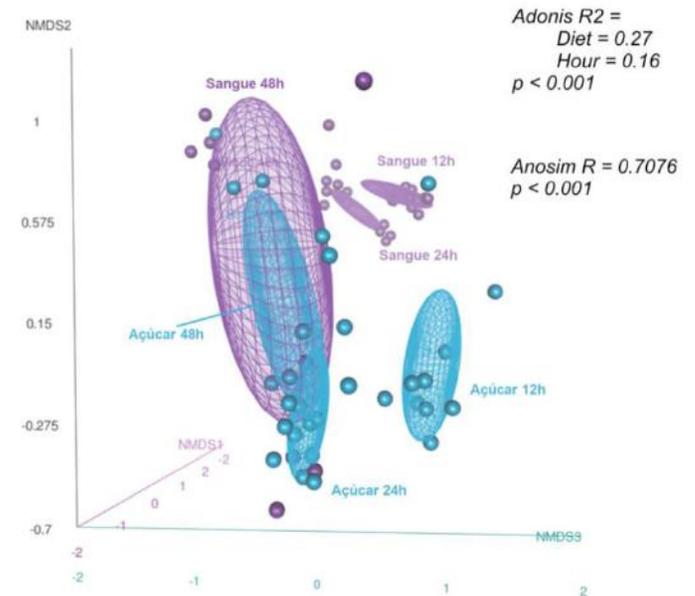
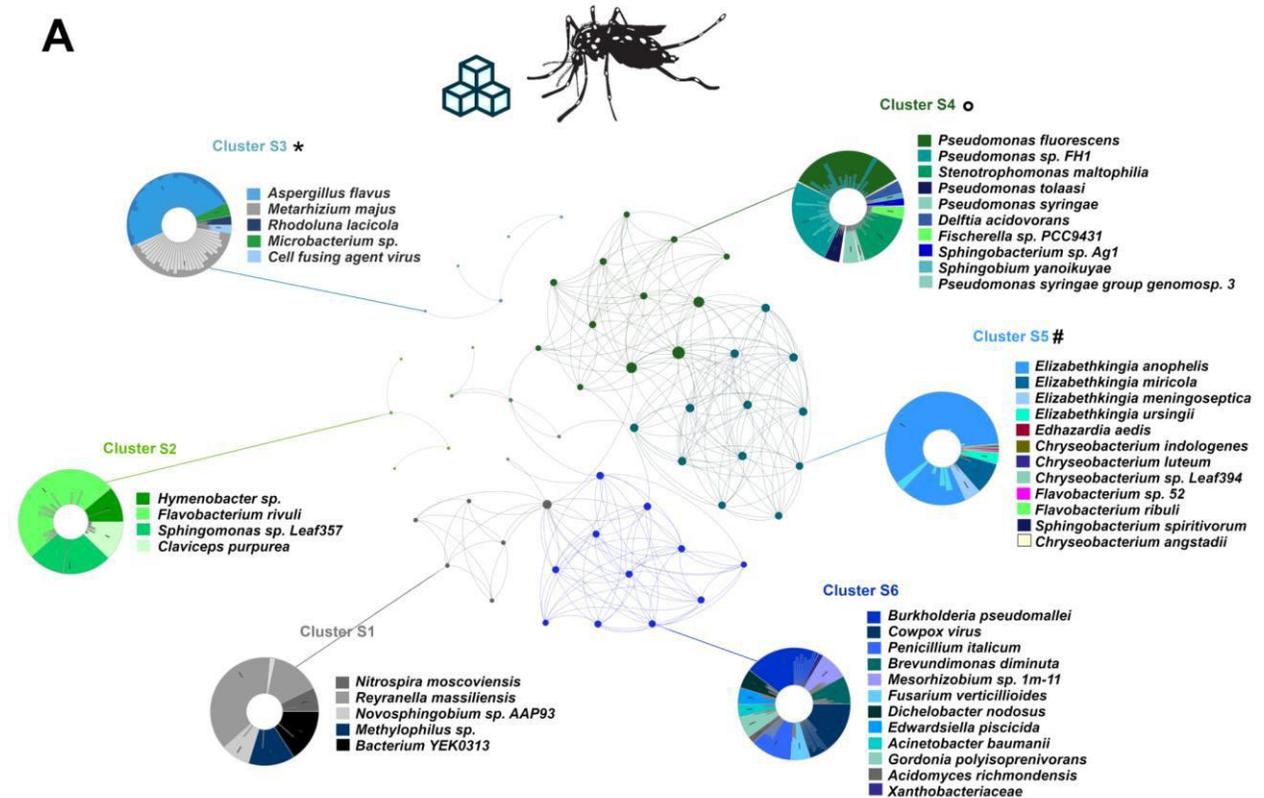


Figura 8. Diversidade de espécies do microbioma de mosquitos. A) Boxplots com a distribuição do índice estimador de riqueza Chao1, bem como os as entropias de Shannon-Weaver e recíproca de Simpson entre os grupos experimentais. Teste ANOVA empregado para descrever a significância global das diferenças entre grupos e teste *post-hoc* Wilcoxon's para identificar significâncias *pairwise* entre grupos. B) Escalonamento não métrico tridimensional das dissimilaridades de Bray-Curtis (stress = 0.07, *model fit* = 99%). As elipses representam intervalos de confiança das distâncias calculadas a partir dos centróides de cada grupo. Testes Adonis e ANOSIM foram empregados para descrever a contribuição de cada variável dependente na distribuição espacial das amostras. O tamanho das esferas e elipses é em função da perspectiva do observador no modelo espacial tridimensional, como mostrados pelos eixos x e y.

5.3. A comunidade microbiana de adultos suas espécies preditoras de diferentes dietas.

Microbiomas são compostos por complexas redes de interação entre seus componentes. Para inferir essas interações, foram utilizados padrões de co-ocorrência microbianos no intestino médio de mosquitos adultos (Figura 9). Mosquitos alimentados com açúcar apresentam quantidade menor de co-ocorrências microbianas significativamente correlacionadas, sendo possível distinguir seis *clusters* microbianos bem definidos (Figura 9A). A detecção de diversas bactérias do mesmo gênero, ou proximamente relacionadas, como *Pseudomonas* spp. e *Elizabethkingia* spp. nos clusters S4 e S5 (Figuras 9A), indica que as espécies com menor abundância relativa possivelmente pertencem a espécies detectadas do mesmo gênero, com maior abundância de *reads*, como *P. fluorescens* ou *E. anophelis* (Figura 6). Os *clusters* marcados com caracteres especiais (*, ○ e #) são muito similares em composição entre os grupos experimentais de ambas as dietas (Figura 9), contendo espécies que são detectadas somente às 48h após a alimentação sanguínea, mas que aparentam ser bem distribuídas em todas as amostras de mosquitos alimentados com açúcar (Figura 6).



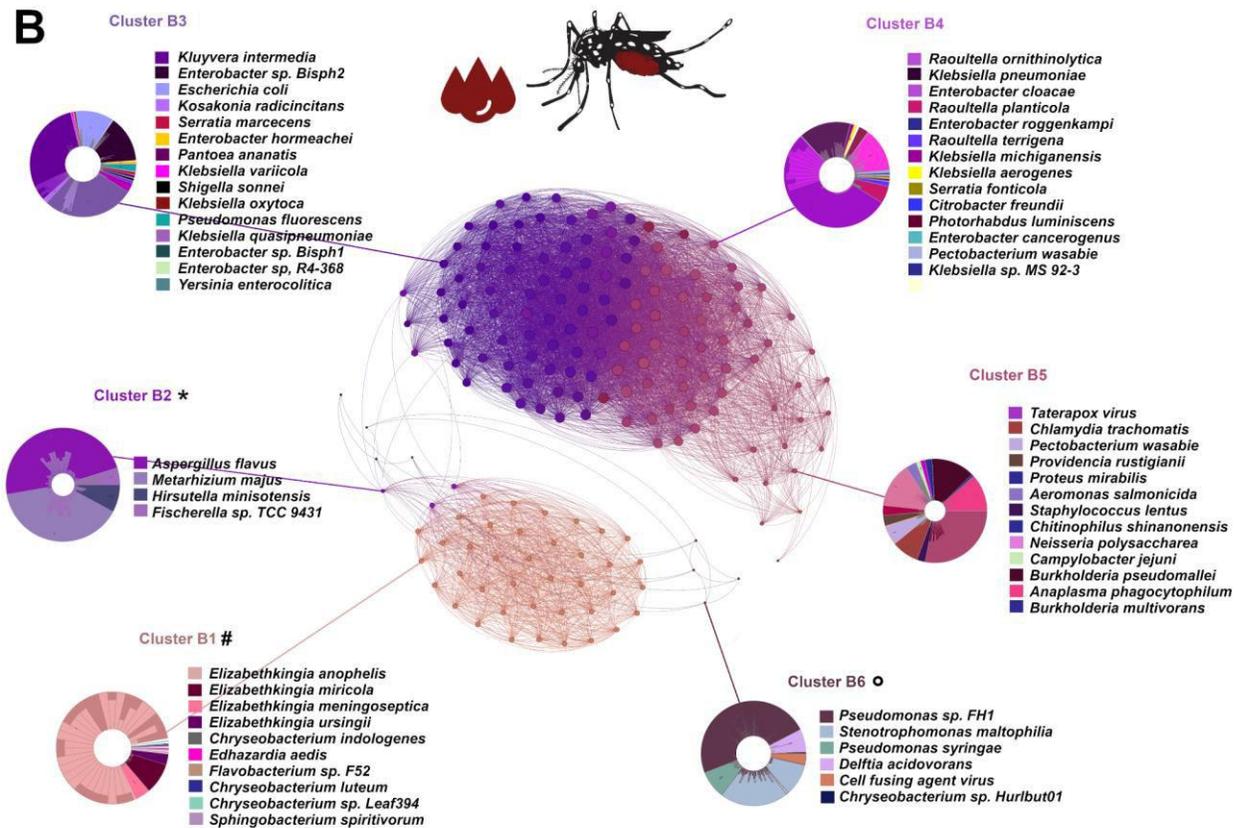


Figura 9. Rede de co-ocorrência representando a estrutura da comunidade microbiana de mosquitos adultos alimentados com açúcar (A) ou sangue (B) e suas possíveis interações. Vértices do grafo representam espécies microbianas e arestas, suas co-ocorrências, calculadas a partir do coeficiente de correlação de Pearson ($r > 0.75$; $p < 0.05$) entre padrões de distribuição de *reads* em diferentes amostras pertencentes aos respectivos grupos experimentais. *Clusters* marcados com caracteres especiais (*, ° e #) apresentam similaridade na composição de suas espécies, com *clusters* identificados com os mesmos símbolos em ambos os grafos.

Os *clusters* com espécies compartilhadas apresentam fungos e bactérias conhecidos por suas interações anfíontes com artrópodes, como os ascomicetos *M. majus* e *A. flavus*, presentes nos clusters S3 e B2, bem como a flavobactéria *E. anophelis*, presente nos clusters S5 e B1. O compartilhamento taxonômico da composição destes *clusters* entre as diferentes dietas é, no entanto, exceção. Há uma clara diferença dos padrões de co-ocorrência nos *clusters* no microbioma do intestino médio de mosquitos alimentados com açúcar (AS), com relação àqueles alimentados com sangue (AB) (Figuras 9). Por exemplo, os três clusters S1, S2 e S6 na Figura 9A contém espécies que são comumente encontradas em amostras ambientais e no solo, porém não são observadas em fêmeas adultas alimentadas com sangue. Da mesma forma, apenas no grupo experimental alimentado com sangue (AB) observa-se espécies microbianas que são usualmente

associadas ao microbioma de vertebrados (clusters B3 e B4), mas não parecem estar vindo diretamente do sangue, já que não são encontradas na amostra controle analisada (CB; Figuras 7 e 9B).

Uma parte desta riqueza de espécies consistentemente observada co-ocorrendo na comunidade microbiana pode ser utilizada como indicadora ou preditora da dieta a qual os mosquitos foram submetidos e das horas após sua alimentação (Figura 10). A Figura 10A mostra que a distribuição de táxons como *Microbacterium* sp. em mosquitos do grupo AS é significativa o suficiente para que esta seja considerada preditora do grupo, ainda que esteja presente em muito menor abundância quando comparada com larvas (Figura 6). Similarmente, *P. fluorescens*, *A. flavus* e *M. majus* possuem associações com os grupos de mosquitos AS.12 e. Por outro lado, o microbioma de mosquitos do grupo AB.12 é dominado pela presença de *Raoultella ornithinolytica* (169.307 reads), enquanto que *Kluyvera intermedia* (196.549 reads) é predominante na comunidade microbiana do grupo AB.24. Ambos os grupos compartilham a presença de *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae* e outras espécies pertencentes à ordem Enterobacterales, que é a ordem microbiana dominante para esta dieta. Às 48h, independentemente da dieta à qual os mosquitos foram submetidos, a abundância relativa de *E. anophelis* (ordem Flavobacteriales) aumenta significativamente, tornando-a a espécie preditora dominante dos grupos de mosquitos adultos após 48h da alimentação (Figura 10A).

Para comparar a relação entre ocorrências das classes Enterobacterales e Flavobacteriales, que são dominantes no intestino médio de mosquitos em diferentes tempos da digestão, nós mapeamos suas abundâncias relativas em relação à média de abundâncias relativas de outras ordens microbianas observadas e estimamos suas densidades multivariadas de Kernel (Figura 10B). Ambas as ordens apresentam altos picos de densidade que se relacionam de maneira oposta aos maiores pico de densidade média observados para reads atribuídos a outras ordens presentes no intestino médio de mosquitos adultos. Isso significa que enquanto a abundância relativa de Flavobacteriales e Enterobacteriales for alta, a abundância relativa das outras ordens permanecerá baixa e vice-versa. Ainda assim, a densidade probabilística da ocorrência de Flavobacteriales tem maior variação na distribuição (Figura 10B). Por outro lado, a ocorrência da ordem Enterobacterales é representada apenas por um grande pico quando há baixas densidades de outras ordens microbianas, e vice-versa, indicando que a proliferação de enterobactérias parece ser mutuamente exclusiva com a ocorrência de outras ordens microbianas.

5.4. O perfil funcional do microbioma de adultos é alterado de acordo com sua dieta.

De forma a analisar a composição e possíveis interações microbianas apresentadas anteriormente no contexto do holobionte *A. aegypti*, o perfil funcional do microbioma do intestino médio de fêmeas adultas foi inferido com a análise da representatividade, enriquecimento e agrupamento funcional de vias metabólicas do banco de dados SEED (Figura 12). Os resultados indicam que, de maneira similar às análises de composição microbiana, os intestinos médios de mosquitos com 12h e 24h de alimentação com sangue apresentam diferentes perfis funcionais microbianos em relação aos outros grupos experimentais (Figura 11). De forma geral, a maioria das classes metabólicas e subsistemas de classificação funcional do banco SEED são observadas nos microbiomas analisados, com destaque para vias relacionadas à parede celular e ultraestrutura (49.395 *reads*) no grupo alimentado com sangue às 12h, além da via de metabolismo de nucleotídeos (44.694 *reads*), bem como resposta a stress (1.861 *reads*). Por outro lado, às 12h da alimentação com sangue, há menor abundância de genes relacionados a vias de motilidade e quimiotaxia (30.194 *reads*) que em outros grupos. O perfil funcional dos microbiomas do intestino médio após 48h decorridas da alimentação com sangue é similar ao perfil observado nos mosquitos alimentados com açúcar (12, 24 e 48h), sugerindo que não há uma representação funcional de vias metabólicas específicas nestes grupos. Ainda assim, cada um destes quatro grupos aparenta possuir uma leve variação entre si (Figura 11).

Uma análise das coordenadas principais (PCoA) demonstrou que *reads* atribuídos às vias de metabolismo de carboidratos (209.958 *reads*), amino ácidos e derivados (127.903 *reads*) e virulência (100.710 *reads*) tornam único o perfil funcional do microbioma do intestino médio de mosquitos do grupo experimental coletado após 12h e 24h do repasto sanguíneo (Figura 12A). Tal singularidade funcional apresenta forte correlação positiva quando comparada com a abundância relativa de Enterobacterales (Figura 12B). Especificamente, dentre as enterobactérias classificadas como preditoras de dieta sanguínea (ver Figura 10A), as espécies que apresentaram maior índice de correlação com a distribuição dos *reads* em tais vias foram *Salmonella enterica*, *Kosakonia radicincitans*, *Klebsiella aerogenes* e *Kluyvera intermedia* (28.351, 8.480, 2.863, 196.549 *reads*, respectivamente) (Figura 12C).

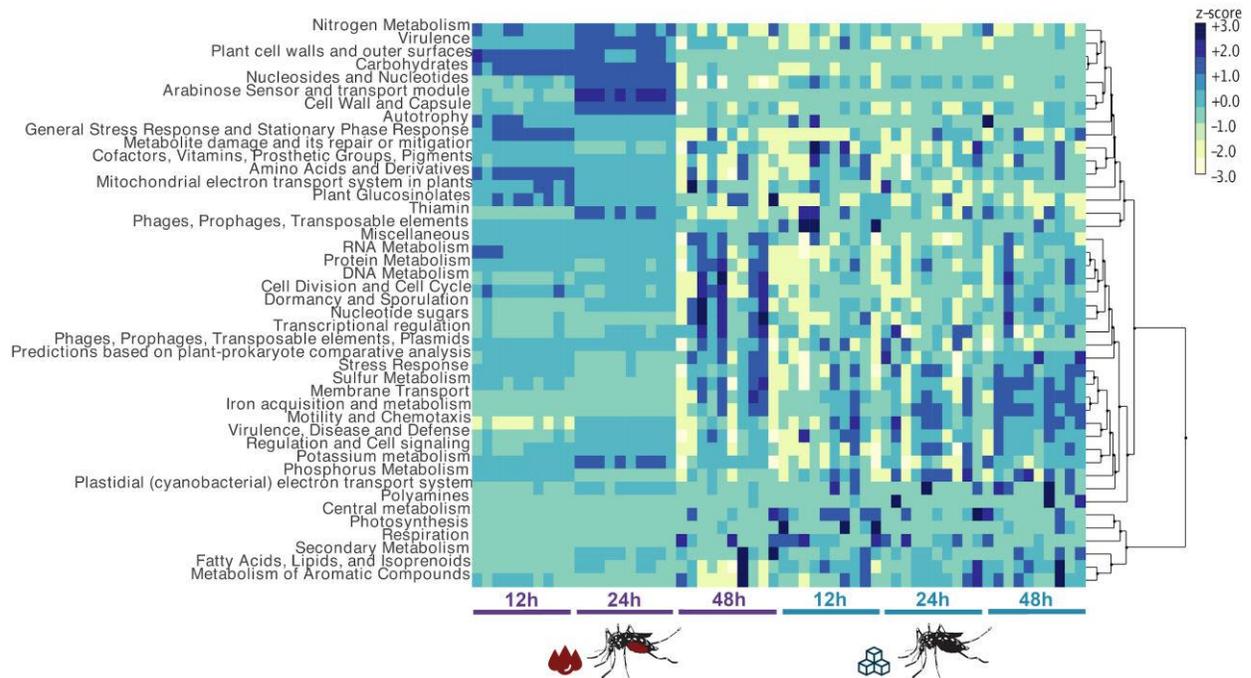


Figura 11. Classificação funcional dos *reads* microbianos presentes no intestino médio de mosquitos adultos alimentados com diferentes dietas. O *heatmap* foi gerado com os valores de z-score por meio do enriquecimento de vias metabólicas de classes funcionais do SEED *pathways* nos metagenomas analisados, de forma a mostrar a diferença na abundância destas vias metabólicas, organizadas por agrupamento hierárquico.

Por sua vez, a coordenada principal que melhor explica a variabilidade de vias metabólicas (PC1; 58,2%) apresenta correlação negativa com a abundância relativa de Enterobacterales (Figura 12D), indicando, portanto, que na presença de bactérias desta ordem há muito menos variabilidade funcional nas amostras analisadas, corroborando com os resultados obtidos na Figura 12A. Esta tendência também está presente na distribuição do número de vias metabólicas observadas, que é maior no intestino médio de mosquitos até as 24h após a alimentação com sangue (AB.12 e AB.24) e apresenta uma diminuição nos outros grupos (AB.48, AS.12, AS.24, AS.48; Figura 12E superior), em concordância com os perfis observados na Figura 12. Entretanto, mesmo que esses dois grupos possuam maior número de vias SEED, a variabilidade funcional observada (Evar) é menor, pela concentração de muitos *reads* em poucas vias metabólicas (Figura 12E inferior), ou seja, vias que possuem menor equitabilidade em sua distribuição.

A distribuição de *reads* atribuídos a *Klebsiella aerogenes*, *Kluyvera intermedia*, *Kosakonia radicincitans* e *S. enterica*, que são as espécies que apresentaram maior correlação

com a singularidade de vias metabólicas (Spearman Rho > 0.70, Figura 12C), é mostrada na Figura 13A. Também é mostrada, na Figura 13B, a comparação entre a distribuição de *reads* de *Enterobacteria sensu latu*, com a distribuição de *reads* atribuídos a cada uma das vias funcionais indicativas de tal singularidade, ou seja, Carboidratos, Virulência e Aminoácidos e Derivativos (ver Figura 12A). Por fim, suas distribuições também são comparadas com a classificação mais específica das vias SEED (*uncollapsed*, que são vias incluídas nas categorias funcionais mais gerais do SEED; Figura 13C). É possível observar um gradiente positivo na comparação da distribuição das três categorias funcionais analisadas em relação à distribuição de *Enterobacteria sensu latu* (Figura 13B), formando um modelo quase linear. Isso indica que de fato, quando há um aumento na abundância relativa de *reads* atribuídos a *Enterobacteria*, o mesmo acontece proporcionalmente com a abundância relativa de *reads* atribuídos a genes relacionados com vias SEED de metabolismo de carboidratos, aminoácidos e derivativos, além de virulência.

Na Figura 13B também é possível observar uma distribuição de *reads* atribuídos a categorias funcionais SEED muito semelhante àquela mostrada pelas espécies de enterobactérias (Figura 13A), reforçando a associação entre a identificação funcional e taxonômica. As vias específicas - *uncollapsed* - observadas sob cada uma das três vias gerais do SEED possuem distribuições muito semelhantes, com pouca distinção de vias com maior abundância relativa de *reads*. No entanto, levando em consideração somente a classe de virulência, é possível observar a presença de diversas vias envolvidas com múltiplas resistências a antimicrobianos (Figura 13C), notoriamente a detecção de bombas de efluxo de múltipla resistência (12.324 *reads*) e a resistência a fluoroquinolonas (4.743 *reads*). Sob a classe de metabolismo de carboidratos, a maioria das vias são relacionadas com estocagem e utilização de açúcares, incluindo maltose e maltodextrina (9.527 *reads*) e utilização de serina no ciclo do glioxilato (15.409 *reads*). Sob a classe de aminoácidos e derivativos, são observadas vias relacionadas com o metabolismo de glicina e serina (10.368 *reads*), bem como biossíntese (16.643 *reads*) e degradação (12.018 *reads*) de metionina.

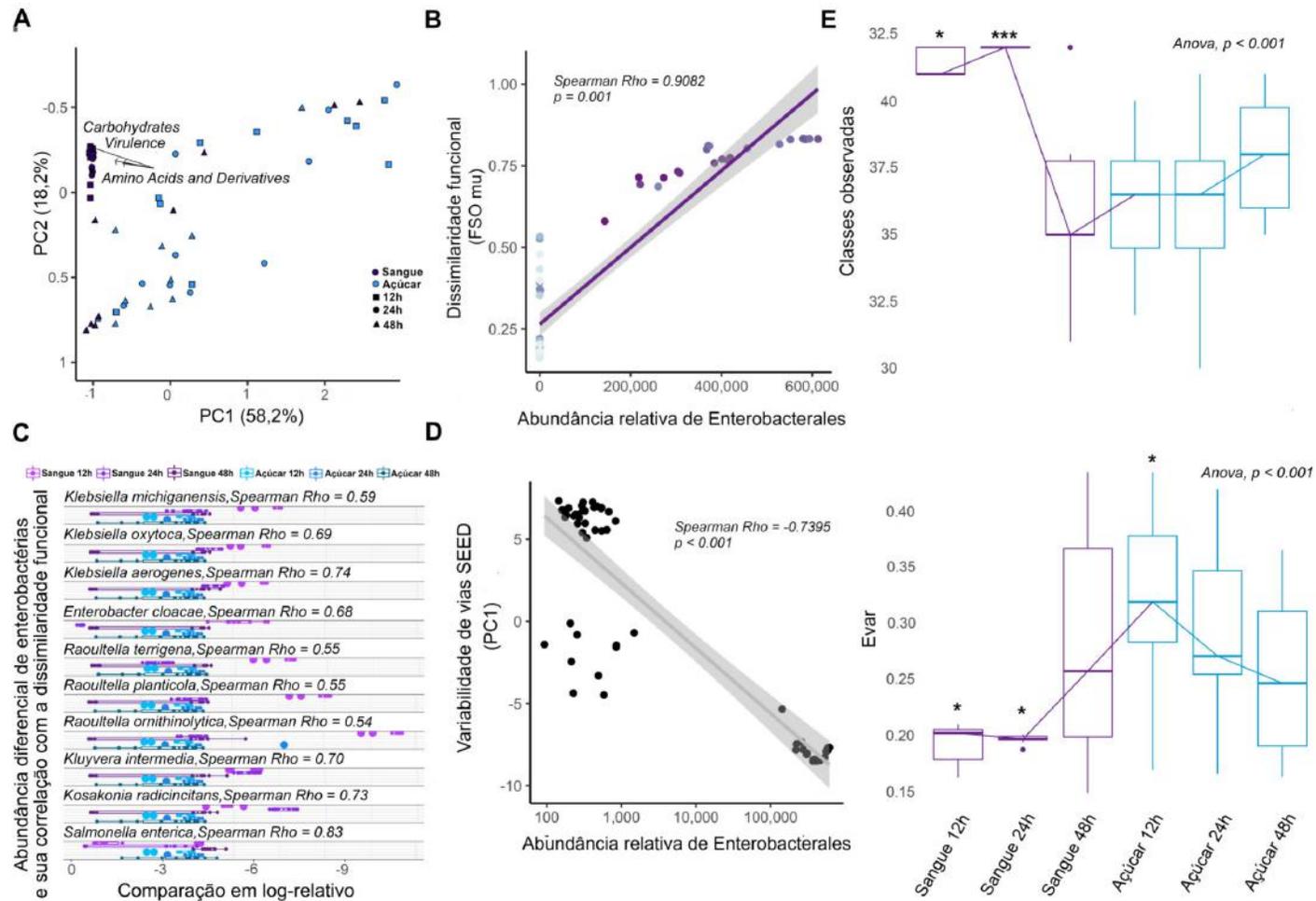


Figura 12. Diversidade funcional no microbioma do intestino médio de mosquitos adultos. A) PCoA da dissimilaridade de Bray-Curtis (PC1 = 58,2% vs PC2 = 18,2%) mostrando vias SEED responsáveis pela ordenação das amostras. Cores representam diferentes dietas e formas representam horas pós-alimentação. B) *Fuzzy Set Ordination* mostrando um modelo generalizado linear (GLM) entre a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis para classes e a abundância relativa de Enterobacteriales. C) Ocorrência diferencial das espécies de Enterobacteriales classificadas como predadoras da dieta de sangue (ver figura 9) em escala log-relativo e suas correlações com as dissimilaridades de vias SEED. D) *Scatter plot* com GLM mostrando a correlação entre a coordenada explanatória principal (PC1) e a abundância relativa de Enterobacteriales. E) Boxplots mostrando a distribuição de vias metabólicas SEED observadas e seus índices de variabilidade (Evar) As medianas são ligadas por uma linha e as significâncias globais e par-a-par avaliadas, respectivamente com testes ANOVA e Wilcoxon.

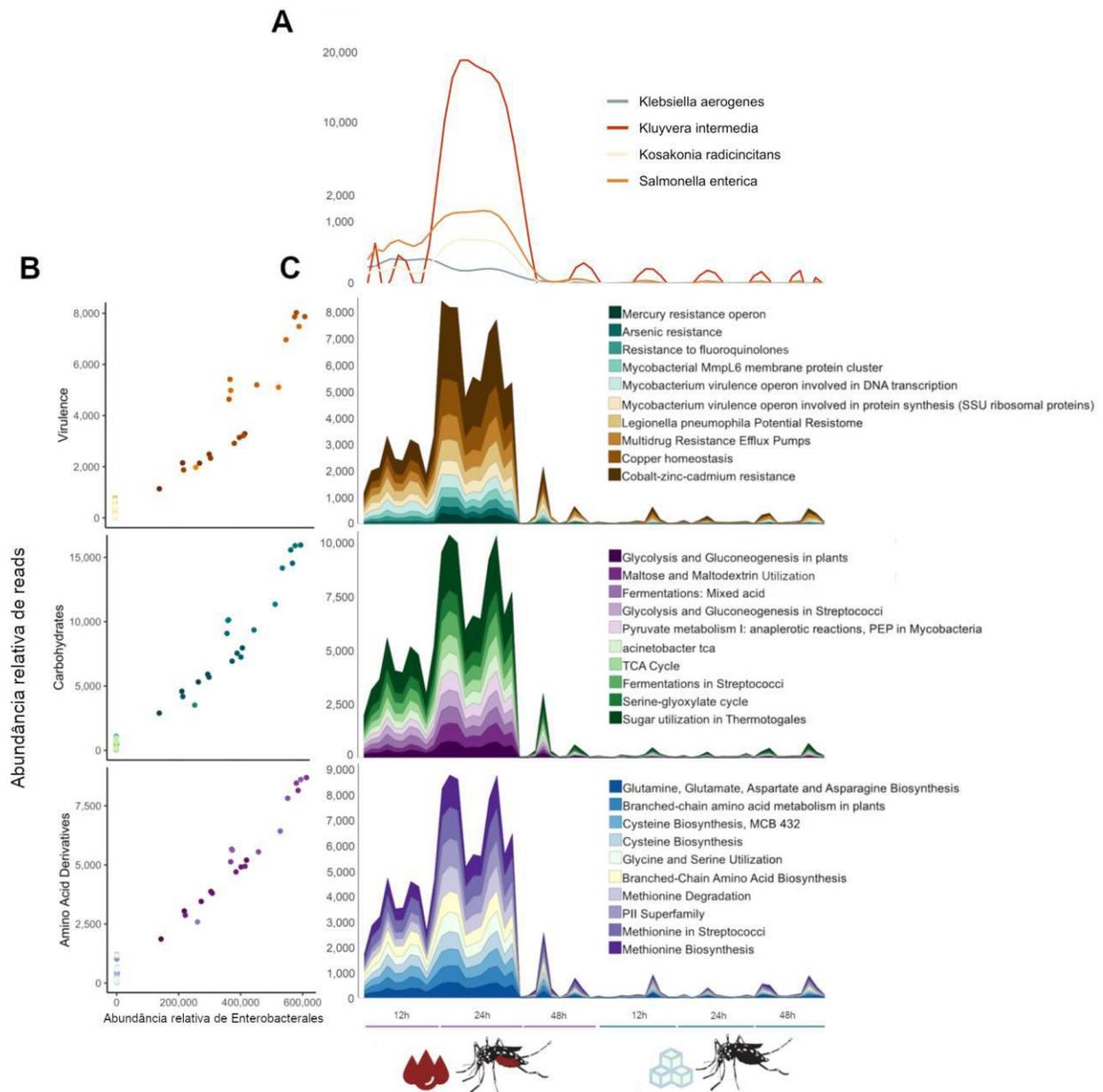


Figura 13. Distribuição da abundância relativa de *reads* atribuídos a vias metabólicas SEED altamente explanatórias e Enterobactérias. A) *Spaghetti plot* com as distribuições polinomiais de *reads* atribuídos a espécies altamente correlacionadas com a variabilidade de perfis funcionais. Essas distribuições são mostradas em escala quadrática no eixo y. B) *Scatter plot* mostrando a comparação entre as distribuições de *reads* atribuídos a Enterobactérias *sensu lato* e às classes de aminoácidos e derivados, carboidratos e virulência. C) *Stacked line chart* plotando a distribuição de *reads* de classes SEED *uncollapsed*, ou mais específicas, em escala quadrática.

6. DISCUSSÃO

O estudo do microbioma do intestino médio de mosquitos *A. aegypti* é um campo promissor para descobertas no que diz respeito à fisiologia e metabolismo do hospedeiro e como estes aspectos de sua biologia são modulados em resposta aos microrganismos que o colonizam. Neste trabalho, nós demonstramos que as larvas de quarto estágio do mosquito apresentam uma comunidade microbiana significativamente diferente daquela de mosquitos adultos. Isso é dado pela colonização quase que exclusiva de bactérias do gênero *Microbacterium*. Este gênero pertence ao filo Actinobacteria e é composto por mais de 90 espécies que já foram isoladas de uma ampla diversidade de ambientes e hospedeiros (Corretto et al., 2020). Essas bactérias são interessantes para a bioprospecção, podendo ter aplicação biotecnológica na biorremediação de metais pesados (Heidari, Mazloomi e Sanaeizade, 2020) e até estabelecimento de relações endofíticas com plantas, promovendo seu crescimento (Cordovez et al., 2018). Em mosquitos, *Microbacterium* spp. já foram descritos na microbiota de larvas de *A. aegypti*, juntamente com outros táxons microbianos pertencentes principalmente ao filo Bacteroidetes (Coon et al., 2014), que não foram, no entanto, observados em nenhuma de nossas dez replicatas deste grupo.

Nenhum dos grupos de mosquitos adultos (AB e AS) apresentou abundâncias comparáveis àquela observada em larvas de *Microbacterium* sp. (Figura 6), indicando que há pouca passagem transestadial deste gênero de bactérias ao longo do ciclo de vida do mosquito, ou seja, sua colonização é mais restrita ao estágio de desenvolvimento larval. Recentemente, o papel de *Microbacterium* sp. em larvas axênicas de *A. aegypti* foi avaliado e, dentre os 8 táxons bacterianas testados, este foi o único que não elevou as taxas de sobrevivência das larvas até o estágio adulto (Coon et al., 2014), sugerindo que tais actinobactérias não tenham uma colaboração relevante para o desenvolvimento e nutrição das larvas, uma vez que esta parece ser a principal associação entre estágios de desenvolvimento larvais e sua microbiota (Correa et al., 2018). Ainda assim, sua colonização em *A. aegypti* parece ser relevante em outros aspectos, incluindo tipos de simbiose que antagonizam o estabelecimento de entomopatógenos fúngicos, como *Metarhizium robertsii* (Noskov et al., 2021). Tal perspectiva parece ser um caminho para explicar a ausência de outros táxons nos microbiomas das larvas que analisamos, especialmente levando em consideração a diminuição drástica da abundância relativa de *Microbacterium* sp. coincidindo com a detecção dos fungos entomopatogênicos *M. majus* e *A. flavus* no intestino médio de adultos alimentados com açúcar (Figuras 6 e 9). Este fato suscita a hipótese de possível

ação antifúngica deste gênero bacteriano no desenvolvimento dos mosquitos e ressalta a natureza anfibiótica de seu microbioma.

Nos metagenomas correspondentes a mosquitos adultos analisados neste trabalho, os padrões tanto de composição quanto de diversidade são semelhantes para os grupos alimentados com açúcar ou com sangue às 48 horas após a alimentação (AS.48 e AB.48), não apresentando diferenças significativas (Figuras 5, 6 e 8). Além de ordens microbianas como Hypocreales, Eurotiales e Micrococcales, com representantes mencionados anteriormente, as ordens Pseudomonadales e Flavobacteriales também compõem parte da microbiota de mosquitos adultos, independentemente da dieta à qual estes foram submetidos. Gêneros bacterianos pertencentes a essas ordens já foram descritos previamente em outros trabalhos que investigaram o bacterioma do intestino médio de mosquitos (Dickson et al., 2018; Hegde et al., 2018). Apesar disto, é possível observar neste trabalho que, com exceção de Flavobacteriales, todas as ordens mencionadas estão presentes consistentemente em todos os indivíduos alimentados com açúcar, ficando abundantes, entretanto, somente após 48h decorridas do repasto sanguíneo. Levando em consideração que o tempo de processamento e digestão de sangue no intestino médio de mosquitos adultos leva em torno de 30h a 40h (Downe, 1975), a detecção destes microrganismos após este período indica uma possível modulação de sua capacidade de proliferação acarretada pelo metabolismo de sangue.

Flavobacteriales, por sua vez representada, em média, em 85% por *E. anophelis* também apresenta este padrão de proliferação consistentemente, ou seja, em todos os indivíduos de mosquitos, após as 48h do repasto sanguíneo, ou seja, após a sua digestão, contrariamente ao que foi proposto por Chen e colaboradores (2015). Similarmente, *E. anophelis* só se torna abundante após 48h decorridas da alimentação com açúcar (Figura 6), ao contrário das demais espécies de microrganismos observadas no grupo de mosquitos adultos alimentados com açúcar. A detecção em alta abundância de reads de *E. anophelis* faz com que haja certa margem de confiabilidade na atribuição taxonômica do reads a esta bactéria, sendo esta sua primeira identificação molecular em nível de espécie no microbioma do intestino médio de *A. aegypti*. Entretanto, estudos de montagem genômica destes reads ainda precisam ser conduzidos para tornar possível sua efetiva identificação. *E. anophelis* é considerada simbiote de culicídeos, tendo sido isolada do intestino médio do vetor da malária, *Anopheles gambiae* (Kämpfer et al., 2011). Esta bactéria apresenta grande potencial de inibição da capacidade vetorial destes mosquitos, bloqueando a formação de

oocistos de *Plasmodium* spp. no intestino médio do vetor (Bahia et al., 2014). Mais recentemente, a ação de inibição da replicação do vírus Zika por *E. anophelis* também foi descrita no intestino médio do vetor de arboviroses *Aedes albopictus* (Onyango et al., 2020). Por outro lado, desde seu primeiro isolamento, *E. anophelis* vem sendo associada com surtos de bacteremia e meningite de alta mortalidade em todo o mundo (Chew et al., 2018; Lau et al., 2016, 2015; McTaggart et al., 2019; Perrin et al., 2017; Reed et al., 2020) e a sua detecção em glândulas salivares e na própria saliva de *A. albopictus* suscita a hipótese de que este pode ser um patógeno humano transmitido mecânica ou biologicamente pelo vetor (Onyango et al., 2020). O emprego da metodologia de WGS já demonstrou ser bem sucedido na identificação de patógenos humanos não-convencionalmente transmitidos por insetos vetores no microbioma das mosca *Chrysomya megacephala* (Junqueira et al., 2017) e o presente trabalho representa a primeira descrição de tal possibilidade em *A. aegypti*.

Até as primeiras 24h após a alimentação, os padrões de distribuição da diversidade microbiana no intestino médio de mosquitos adultos foram modulados pelo tipo de dieta à qual os mosquitos foram submetidos, com alto suporte estatístico (Figura 8). Estes resultados corroboram com estudos anteriores que mostram que o repasto sanguíneo altera composições microbianas no intestino médio de *A. aegypti* (Gonzales et al., 2018), com especificidade de composições diferentes para repastos sanguíneos advindos de diferentes hospedeiros vertebrados (Mhuri et al., 2018). Neste trabalho, nós demonstramos que há um aumento brusco da abundância de enterobactérias no intestino médio de mosquitos alimentados com sangue. Aumento este que não parece ser causado pela aquisição de carga bacteriana advinda diretamente da fonte de alimentação sanguínea (Figuras 7, 10), indicando que esses microrganismos podem estar presentes no intestino médio dos mosquitos em pequenas populações, proliferando-se quando da presença de sangue no intestino médio dos mosquitos. Isto sugere uma relação importante entre o hospedeiro e seu microbioma no metabolismo de sangue. A natureza anautógena, ou seja, a necessidade desta fonte específica de nutrientes para reprodução, é um dos processos centrais no ciclo de vida de *A. aegypti* e, sendo assim, o impacto da hematofagia para a o fitness fisiológico do mosquito já é bem estabelecido, mostrando como o tempo decorrido para realização do primeiro repasto sanguíneo após a ecdise para a fase adulta e a quantidade de sangue ingerida afetam a expectativa de vida e a taxa reprodutiva de fêmeas, assim como sua capacidade vetorial para o vírus Zika (Petersen et al., 2018). A influência de sua microbiota também já foi avaliada

nos processos relacionados à digestão sanguínea e fertilidade, sendo constatado que fêmeas submetidas à antibioticoterapia de amplo espectro apresentam redução significativa de fertilidade, mesmo após o repasto sanguíneo em humanos. Ademais, a degradação de hemoglobinas é mais lenta nestas fêmeas, por conta da redução da abundância de bactérias beta-hemolíticas por excelência (Gaio et al., 2011; Alvarado et al., 2021), como é o caso de algumas das enterobactérias características do grupo alimentado com sangue observadas nos metagenomas analisados neste trabalho (Singh et al., 2004; Carter e Evans, 2005; de Campos et al., 2016).

O repasto sanguíneo é uma refeição rica em substâncias pró-oxidantes, especialmente o grupamento Heme, obtido após a degradação de hemoglobina (Graça-Souza et al., 2006). A compensação deste consumo em nematóceros hematofágicos é feita com a regulação negativa da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês reactive oxygen species) pela enzima dual oxidase (Duox), principal produtor de radicais livres na membrana peritrófica do intestino médio (Oliveira et al., 2011). Tal regulação é intermediada pela PKC (protein kinase C) como uma forma de feedback negativo causado pela presença de Heme e hemoglobina, evitando estresse oxidativo no intestino médio de *A. aegypti*. Este parece ser o mecanismo que ocasiona a expansão significativa de sua microbiota, causando também o aumento da abundância relativa de bactérias após a ingestão de sangue em nossos experimentos (Figura 6), visto que o mesmo efeito de proliferação de microrganismos foi obtido quando do silenciamento por RNAi (RNA de interferência) da Duox (Oliveira et al., 2011). O entendimento destes mecanismos e suas especificidades com relação às enterobactérias beta-hemolíticas observadas, neste trabalho, no intestino médio de fêmeas alimentadas com sangue pode ser de suma importância para elucidar vias específicas que são moduladas por sua colonização e proliferação, possibilitando o estudo direcionado de potenciais alvos de ação microbiana para o controle reprodutivo e populacional do vetor. Todavia, ao contrário dos trabalhos mencionados anteriormente, que demonstram diminuição desta proliferação somente após 72h (Gonzales et al., 2018), nossos experimentos apontam para um retorno a padrões de colonização e diversidade microbianas “normais” no intestino médio de mosquitos adultos após 48h decorridas do repasto sanguíneo. Esta diferença pode ser explicada pela variabilidade de taxas metabólicas em populações diferentes de mosquitos ou por diferenças de detecção relacionadas à metodologia. Neste trabalho, foi utilizado um número alto de replicatas em cada grupo experimental e os mosquitos tiveram seus intestinos analisados separadamente, fato que possibilita a captação e observação de variações individuais.

Além disso, o número de sequências analisadas foi alto, compondo o maior conjunto metagenômico de dados já gerados para *A. aegypti*, o que possibilita uma maior amostragem de reads individuais e melhor suporte para identificação taxonômica microbiana.

Além do perfil taxonômico, os perfis funcionais presentes nos microbiomas analisados também foram inferidos neste estudo, o que possibilitou a associação estatística e ordenação entre a distribuição de reads de enterobactérias e o aumento da detecção de genes relacionados com virulência e metabolismo de aminoácidos e carboidratos no intestino médio de mosquitos durante o processo de digestão de sangue (Figuras 11, 12). Estes resultados indicam que parte das alterações metabólicas e fisiológicas causadas pelo consumo de sangue em *A. aegypti* pode ser consequência da associação trófica do hospedeiro com essas bactérias, causando sua proliferação no intestino médio dos mosquitos. Tal descoberta representa uma novidade no estudo de metagenomas em *A. aegypti* e corrobora com trabalhos anteriores que utilizaram métodos transcriptômicos para descrever a associação primária do microbioma com a indução da expressão de genes relacionados com vias metabólicas e nutricionais (Hyde et al., 2020). Espécies de enterobactérias diferentes das que detectamos já foram relacionadas com o aumento da capacidade de ingestão de frutose em *A. albopictus* (Guégan et al., 2020), porém não de sangue, o que pode ser explicado pelo fato de que tais interações podem variar em vista da plasticidade de colonização microbiana no intestino médio do vetor, dados fatores extrínsecos como localização geográfica e microambientes aos quais os mosquitos são submetidos (Scolari et al., 2019). Ainda assim, é possível especular que enterobactérias podem estar relacionadas com os todos processos digestivos do hospedeiro mosquito in vivo, como a alimentação com néctar e repasto sanguíneo, ainda que pouco associadas com processos não naturais, tal qual a ingestão e aporte de sacarose, como demonstrado em nossas análises. Além disto, a detecção de genes microbianos envolvidos com vias de resposta à stress durante o período digestivo em mosquitos alimentados com sangue corrobora com a hipótese de que o repasto sanguíneo causa alterações fisiológicas relevantes no ambiente intestinal do mosquito, selecionando microrganismos que resistam a tais impactos, alterando, desta forma, a composição de seu microbioma.

A presença de genes envolvidos com processos de virulência e sua correlação com o aumento da abundância relativa de enterobactérias como *Klebisella aerogenes*, *Kosakonia radicincitans*, *Kluyvera intermedia* e *Salmonella enterica* (Figuras 12, 13) não é surpresa, uma vez são microrganismos usualmente associados com casos de infecções oportunistas e

alimentares em humanos (Migura-Garcia et al., 2017; Thele et al., 2017; Malek et al., 2019; Mertschnigg et al., 2020). No entanto, a presença de genes de resistência a antimicrobianos chama a atenção, principalmente aqueles relacionados com resistência à fluoroquinolonas, metais pesados e multirresistências (Figura 13). A detecção de microrganismos comensais resistentes a antimicrobianos já foi reportada no intestino médio de *A. aegypti* com técnicas dependentes de cultivo (Hyde et al., 2019), porém esta é a primeira evidência metagenômica de um possível resistoma associado à comunidade microbiana nestes vetores, gerando dados que possibilitem a futura caracterização genômica e anotação funcional destes genes nos microrganismos aqui descritos. Similarmente, o aumento de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, também associado com a proliferação de enterobactérias (Figura 13), pode indicar unicamente o aumento da demanda metabólica causada pelo aumento populacional destes microrganismos no intestino médio de *A. aegypti*. No entanto, estudos anteriores demonstraram que o consumo de dextrose (monômero de glucose) é o que mais aumenta a longevidade de mosquitos adultos, sendo que a maltodextrina polimerizada aparenta aumentar seu peso (Posidonio et al., 2021), indicando maior produção de células do corpo gorduroso. Genes relacionados tanto ao metabolismo destes sacarídeos como com sua incorporação em vias de respiração celular são enriquecidos nos metagenomas analisados neste trabalho (Figura 13), sugerindo que o aumento da população de enterobactérias pode representar um custo ou benefício metabólico para o hospedeiro *A. aegypti*. Por fim, o fato de que há uma proliferação coordenada com a digestão de sangue, ou seja, até aproximadamente as primeiras 24h após o repasto sanguíneo, indica que a abundância de enterobactérias e, por sua vez, a abundância de genes envolvidos no metabolismo, especialmente de aminoácidos, pode ter repercussão direta também no fitness reprodutivo do mosquito. Por exemplo, uma das vias presentes nos metagenomas dos mosquitos analisados é a de utilização de glicina e serina, que possui enzimas como a serina-hidroximetiltransferase (SHMT), essenciais para a digestão de sangue, processo inibido quando do seu silenciamento (Li et al., 2019). Tal silenciamento causou o surgimento de coágulos de sangue não digerido no intestino médio de fêmeas do mosquito, grande redução de sua capacidade de vôo e um fenótipo de sub-desenvolvimento de seus ovários, impossibilitando a oviposição (Li et al., 2019).

7. CONCLUSÃO

Larvas apresentam comunidades microbianas únicas, com baixa diversidade em relação a mosquitos adultos e com presença de microrganismos que não parecem ser oriundos de seu ambiente aquático. O microbioma desta fase de desenvolvimento é quase totalmente dominado por *Microbacterium* spp. Mosquitos adultos, por sua vez, apresentam diversidade relativamente alta em seu microbioma, com certa herança transtadial de microrganismos do estado larval, porém sem colonização advinda diretamente da fonte de sua alimentação. Diferentes dietas impactam diretamente a composição da comunidade microbiana em adultos, que é modulada conforme o período digestivo analisado. O repasto sanguíneo reduz a diversidade de espécies microbianas quando comparados à alimentação com açúcar, com gêneros de enterobactérias significativamente associados aos períodos digestivos (12h a 24h). Esses microrganismos também são associados com a distribuição de vias metabólicas relacionadas com utilização de aminoácidos e carboidratos, inclusive com a presença de genes importantes envolvidos com ciclos reprodutivos do mosquito, indicando sua importância para o metabolismo de sangue no seu hospedeiro *A. aegypti*, fato que pode se provar valioso na busca de candidatos microbianos que alterem processos fisiológicos importantes e possibilitem a redução da densidade populacional do mosquito. Ambos os grupos de mosquitos adultos apresentam proliferação da flavobactéria simbiote de culicídeos e patogênica em humanos *E. anophelis* no período pós-digestão, sendo esta uma potencial componente de sua microbiota residente. Esta bactéria é considerada como candidata para o controle biológico da transmissão de arboviroses e foi detectada pela primeira vez em *A. aegypti* neste trabalho. Em caso de confirmação de sua simbiose, esta espécie pode ser utilizada em programas de controle da transmissão de arboviroses pelo vetor, bem como estudos epidemiológicos de sua potencial transmissão por mosquitos para humanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, W.A., Agudelo, S.O., Velez, I.D., Vivero, R.José. (2021). Description of the ovarian microbiota of *Aedes aegypti* (L) Rockefeller strain. *Acta Trop.* 214, 105765. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105765>
- Angleró-Rodríguez, Y.I., Talyuli, O.A., Blumberg, B.J., Kang, S., Demby, C., Shields, A., Carlson, J., Jupatanakul, N., Dimopoulos, G. (2017). An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. *eLife* 6, e28844. <https://doi.org/10.7554/eLife.28844>
- Azambuja, P., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol.* 21, 568–572. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.011>
- Bahia, A.C., Dong, Y., Blumberg, B.J., Mlambo, G., Tripathi, A., BenMarzouk-Hidalgo, O.J., Chandra, R., Dimopoulos, G. (2014) Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. *Environ Microbiol.* 16:9, 2980-94. [10.1111/1462-2920.12381](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12381).
- Bahia, A.C., Kubota, M.S., Souza-Neto, J.A., Koerich, L.B., Barletta, A.B., Araújo, H.R.C., Gonçalves, C.M., Ríos-Velásquez, C.M., Pimenta, P.F.P., Traub-Csekö, Y.M. (2018). An *Anopheles aquasalis* GATA factor Serpent is required for immunity against *Plasmodium* and bacteria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006785. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006785>
- Bastian M., Heymann S., Jacomy M. (2009). Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. *International AAAI Conference on Weblogs and Social Media.*
- Becnel, J.J., Johnson, M.A. (2000). Impact of *Edhazardia aedis* (Microsporidia: Culicosporidae) on a Seminatural Population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Biol. Control* 18, 39–48. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0805>
- Behjati, S., Tarpey, P.S. (2013). What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 98, 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Benelli, G. (2015). Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitol. Res.* 114, 2801–2805. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4586-9>
- Beserra, E.B., Castro Jr., F.P. de, Santos, J.W. dos, Santos, T. da S., Fernandes, C.R.M. (2006). Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotrop. Entomol.* 35, 853–860. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2006000600021>
- Bischoff, V., Vignal, C., Duvic, B., Boneca, I.G., Hoffmann, J.A., Royet, J. (2006). Downregulation of the *Drosophila* Immune Response by Peptidoglycan-Recognition Proteins SC1 and SC2. *PLOS Pathog.* 2, e14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020014>

- Blair, C.D. (2011). Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol.* 6, 265–277. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.11>
- Blair, C.D., Olson, K.E. (2014). Mosquito immune responses to arbovirus infections. *Curr. Opin. Insect Sci.* 3, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.005>
- Bliman, P.-A., Aronna, M.S., Coelho, F.C., da Silva, M.A.H.B. (2018). Ensuring successful introduction of *Wolbachia* in natural populations of *Aedes aegypti* by means of feedback control. *J. Math. Biol.* 76, 1269–1300. <https://doi.org/10.1007/s00285-017-1174-x>
- Bonfili, L., Cecarini, V., Berardi, S., Scarpona, S., Suchodolski, J.S., Nasuti, C., Fiorini, D., Boarelli, M.C., Rossi, G., Eleuteri, A.M. (2017). Microbiota modulation counteracts Alzheimer’s disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Sci. Rep.* 7, 2426. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02587-2>
- Bray, J.R., Curtis, J.T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27, 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Breiman, L. (2001). Random Forests. *Mach. Learn.* 45, 5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Brown, J.E., Evans, B.R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., Zhao, H., Caccone, A., Powell, J.R. (2014). Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 68, 514–525. <https://doi.org/10.1111/evo.12281>
- Bukhari, T., Takken, W., Koenraadt, C.J. (2011). Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasit. Vectors* 4, 23. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-23>
- Cansado-Utrilla, C., Zhao, S., McCall, P., Coon, K., Hughes, G. (2020). The Microbiome and Mosquito Vectorial Capacity: Rich Potential for Discovery and Translation. <https://doi.org/10.20944/preprints202012.0554.v1>
- Cappelli, A., Damiani, C., Mancini, M.V., Valzano, M., Rossi, P., Serrao, A., Ricci, I., Favia, G. (2019). *Asaia* Activates Immune Genes in Mosquito Eliciting an Anti-*Plasmodium* Response: Implications in Malaria Control. *Front. Genet.* 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00836>
- Carter, J.E., Evans, T.N. (2005). Clinically Significant *Kluyvera* Infections: A Report of Seven Cases, *American Journal of Clinical Pathology.* 123:3, 334–338. <https://doi.org/10.1309/61XP4KTLJYWM5H35>
- Cavalcante, K.R.L.J., Tauil, P.L. (2017). Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. *Epidemiol. E Serviços Saúde* 26, 617–620. <https://doi.org/10.5123/s1679-49742017000300018>
- Center for Disease Control. (2019). Fighting the World’s Deadliest Animal. Global Health Stories. Disponível em: <https://www.cdc.gov/globalhealth/stories/world-deadliest-animal.html>.

Acessado em 25 de janeiro de 2021.

Cerutti, H., Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr. Genet.* 50, 81–99. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0078-x>

Chao, A. (1984). Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scand. J. Stat.* 11, 265–270.

Chao, A., Chiu, C.-H., Jost, L. (2010). Phylogenetic diversity measures based on Hill numbers. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 3599–3609. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0272>

Chao, A., 趙蓮菊, Lee, S.-M., 李燦銘. (1990). Estimating the number of unseen species with frequency counts. *Chin. J. Math.* 18, 335–351.

Chen, S., Bagdasarian, M., Walker, E.D. (2015). *Elizabethkingia anophelis*: molecular manipulation and interactions with mosquito hosts. *Applied and Environmental Microbiology.* 10.1128/AEM.03733-14

Chew, K.L., Cheng, B., Lin, R.T.P., Teo, J.W.P. (2018) *Elizabethkingia anophelis* Is the Dominant *Elizabethkingia* Species Found in Blood Cultures in Singapore. *J Clin Microbiol.* 56:3, e01445-17. 10.1128/JCM.01445-17.

Chiu, C.-H., Jost, L., Chao, A. (2014). Phylogenetic beta diversity, similarity, and differentiation measures based on Hill numbers. *Ecol. Monogr.* 84, 21–44. <https://doi.org/10.1890/12-0960.1>

Christensen, B.M., Li, J., Chen, C.-C., Nappi, A.J. (2005). Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends Parasitol.* 21, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.02.007>

Coon, K.L., Vogel, K.J., Brown, M.R., Strand, M.R. (2014). Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol. Ecol.* 23, 2727–2739. <https://doi.org/10.1111/mec.12771>

Cordovez, V., Schop, S., Hordijk, K., de Boulois, H.D., Coppens, F., Hanssen, I., Raaijmakers, J.M., Carrión, V.J. (2018). Priming of plant growth promotion by volatiles of root-associated *Microbacterium*. *Appl Environ Microbiol* 84. 10.1128/AEM.01865-18

Correa, M.A., Matusovsky, B., Brackney, D.E., Steven, B. (2018). Generation of axenic *Aedes aegypti* demonstrate live bacteria are not required for mosquito development. *Nat Commun* 9, 4464. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07014-2>

Corretto, E., Antonielli, L., Sessitsch, A., Höfer, C., Puschenreiter, M., Widhalm, S., Swarnalakshimi, K., Brader, G. (2020). Comparative genomics of *Microbacterium* species to reveal diversity, potential for secondary metabolites and heavy metal resistance. *Frontiers in Microbiology.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01869>

Couret, J., Dotson, E., Benedict, M.Q. (2014). Temperature, Larval Diet, and Density Effects on Development Rate and Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PlosOne* 9, e87468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087468>

- Csardi G, Nepusz T. (2006) The igraph software package for complex network research, InterJournal, Complex Systems 1695. <http://igraph.sf.net>
- da Silva, W.J., Pilz-Júnior, H.L., Heermann, R., da Silva, O.S. (2020). The great potential of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* for mosquito control: a review. Parasit. Vectors 13, 376. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04236-6>
- Darwish, S., Hyppa, T., Socransky, S.S. (1978). Studies of the predominant cultivable microbiota of early periodontitis. J. Periodontal Res. 13, 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1978.tb00149.x>
- David, J.-P., Coissac, E., Melodelima, C., Poupardin, R., Riaz, M.A., Chandor-Proust, A., Reynaud, S. (2010). Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. BMC Genomics 11, 216. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-216>
- David M.R., Santos L.M., Vicente A.C., Maciel-de-Freitas R. (2016). Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. Mem Inst Oswaldo Cruz. 111(9):577-87. 10.1590/0074-02760160238.
- de Campos, F.P., Guimarães, T.B., Lovisolo, S.M. (2016). Fatal pancreatic pseudocyst co-infected by *Raoultella planticola*: an emerging pathogen. Autops Case Rep. 6:2, 27-31. 10.4322/acr.2016.034.
- Deddouche, S., Matt, N., Budd, A., Mueller, S., Kemp, C., Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Antoniewski, C., Hoffmann, J.A., Imler, J.-L. (2008). The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *Drosophila*. Nat. Immunol. 9, 1425–1432. <https://doi.org/10.1038/ni.1664>
- den Boon, J.A., Diaz, A., Ahlquist, P. (2010). Cytoplasmic Viral Replication Complexes. Cell Host Microbe 8, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.010>
- Dickson, L.B., Ghozlane, A., Volant, S., Bouchier, C., Ma, L., Vega-Rúa, A., Dusfour, I., Jiolle, D., Paupy, C., Mayanja, M.N., Kohl, A., Lutwama, J.J., Duong, V., Lambrechts, L. (2018). Diverse laboratory colonies of *Aedes aegypti* harbor the same adult midgut bacterial microbiome. Parasites Vectors 11, 207. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2780-1>
- Downe, A.E.R. (1975). Internal regulation of rate of digestion of blood meals in the mosquito, *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology. 21:11, 1835-1839. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(75\)90250-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(75)90250-4)
- Duncan, A.B., Agnew, P., Noel, V., Demetree, E., Seveno, M., Brizard, J.-P., Michalakis, Y. (2012). Proteome of *Aedes aegypti* in response to infection and coinfection with microsporidian parasites. Ecol. Evol. 2, 681–694. <https://doi.org/10.1002/ece3.199>

Dusfour, I., Thalmensy, V., Gaborit, P., Issaly, J., Carinci, R., Girod, R. (2011). Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 346–352. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000300015>

Ferrier, S., Manion, G., Elith, J., Richardson, K. (2007). Using generalized dissimilarity modelling to analyse and predict patterns of beta diversity in regional biodiversity assessment. *Divers. Distrib.* 13, 252–264. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00341.x>

Forattini, O.P., Kakitani, I., Massad, E., Marucci, D. (1993). Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 4 - Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. *Rev. Saúde Pública* 27, 398–411. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101993000600002>

Gaio, A. de O., Gusmão, D.S., Santos, A.V., Berbert-Molina, M.A., Pimenta, P.F.P., Lemos, F.J.A. (2011). Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasit. Vectors* 4, 105. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-105>

Garcez, P.P., Nascimento, J.M., de Vasconcelos, J.M., Madeiro da Costa, R., Delvecchio, R., Trindade, P., Loiola, E.C., Higa, L.M., Cassoli, J.S., Vitória, G., Sequeira, P.C., Sochacki, J., Aguiar, R.S., Fuzii, H.T., de Filippis, A.M.B., da Silva Gonçalves Vianez Júnior, J.L., Tanuri, A., Martins-de-Souza, D., Rehen, S.K. (2017). Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Sci. Rep.* 7, 40780. <https://doi.org/10.1038/srep40780>

Gates, B., 2014. The Deadliest Animal in the World. *Gates Notes*. Disponível em <https://www.gatesnotes.com/Health/Most-Lethal-Animal-Mosquito-Week>. Acesso em: 21/07/20.

Geetha, I., Manonmani, A.M. (2010). Surfactin: a novel mosquitocidal biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* (VCRC B471) and influence of abiotic factors on its pupicidal efficacy. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 406–412. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02912.x>

Gendrin, M., Rogers, F.H., Yerbanga, R.S., Ouédraogo, J.B., Basáñez, A.G., Cohuet, A., Cristophides, G.K. (2015). Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nature Communications* 6. [10.1038/ncomms6921](https://doi.org/10.1038/ncomms6921)

Gomes, A. de C., Souza, J.M.P. de, Bergamaschi, D.P., Santos, J.L.F. dos, Andrade, V.R., Leite, O.F., Rangel, O., Souza, S.S.L. de, Guimarães, N.S.N., Lima, V.L.C. de, (2005). Atividade antropofílica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. *Rev. Saúde Pública* 39, 206–210. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102005000200010>

Gonzales, K.K., Rodriguez, S.D., Chung, H.-N., Kowalski, M., Vulcan, J., Moore, E.L., Li, Y., Willette, S.M., Kandel, Y., Van Voorhies, W.A., Holguin, F.O., Hanley, K.A., Hansen, I.A. (2018). The Effect of SkitoSnack, an Artificial Blood Meal Replacement, on *Aedes aegypti* Life History Traits and Gut Microbiota. *Sci. Rep.* 8, 11023. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29415-5>

Goudie, A.S. (2018). *Human Impact on the Natural Environment*. (John Wiley & Sons)

- Graça-Souza, A.V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G.O., Braz, G.R., Paes, M.C., Sorgine, M.H.F., Oliveira, M.F. (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 322–335. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.01.009>
- Guégan, M., Van T.V., Martin, E., Minard, G., Tran, F.H., Fel, B., Hay, A.E., Simon, L., Barakat, M., Potier, P., Haichar, F.E.Z., Valiente Moro C. (2020). Who is eating fructose within the *Aedes albopictus* gut microbiota? *Environ Microbiol.* 22:4, 1193-1206. 10.1111/1462-2920.14915
- Guégan, M., Zouache, K., Démichel, C., Minard, G., Tran Van, V., Potier, P., Mavingui, P., Valiente Moro, C. (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome* 6, 49. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0435-2>
- 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 Tropica.* 115, 275-281. 10.1016/j.actatropica.2010.04.011
- Hao, Y., Pei, Z., Brown, S.M. (2017). Chapter 1 - Bioinformatics in Microbiome Analysis, in: Harwood, C. (Ed.), *Methods in Microbiology, The Human Microbiome*. Academic Press, pp. 1–18. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2017.08.002>
- Hedge, S., Khanipov, K., Albayrak, L., Golovko, G., Pimenova, M., Saldaña, M.A., Rojas, M.M., Hornett, E.A., Motl, G.C., Fredregill, C.L., Dennett, J.A., Debboun, M., Fofanov, Y., Hughes, G.L. (2018). Microbiome Interaction Networks and Community Structure From Laboratory-Reared and Field-Collected *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* Mosquito Vectors. *Frontiers in Microbiology.* 9, 2160. 10.3389/fmicb.2018.02160
- Heidari, P., Mazloomi, F., Sanaeizade, S. (2020). Optimization Study of Nickel and Copper Bioremediation by *Microbacterium oxydans* Strain CM3 and CM7, Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 29:4, 438-451. 10.1080/15320383.2020.1738335
- Heiss, C.N., Olofsson, L.E. (2019). The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system. *J. Neuroendocrinol.* 31, e12684. <https://doi.org/10.1111/jne.12684>
- Hill, M.O. (1973). Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology* 54, 427–432. <https://doi.org/10.2307/1934352>
- Hillmann, B., Al-Ghalith, G.A., Shields-Cutler, R.R., Zhu, Q., Gohl, D.M., Beckman, K.B., Knight, R., Knights, D. (2018). Evaluating the Information Content of Shallow Shotgun Metagenomics. *mSystems* 3. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00069-18>
- Hoffmann, A.A., Montgomery, B.L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P.H., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y.S., Dong, Y., Cook, H., Axford, J., Callahan, A.G., Kenny, N., Omodei, C., McGraw, E.A., Ryan, P.A., Ritchie, S.A., Turelli, M., O'Neill, S.L. (2011). Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission.

Nature 476, 454–457. <https://doi.org/10.1038/nature10356>

Hotez, P.J., Alvarado, M., Basáñez, M.-G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., Brooker, S.J., Brown, A.S., Buckle, G., Budke, C.M., Carabin, H., Coffeng, L.E., Fèvre, E.M., Fürst, T., Halasa, Y.A., Jasrasaria, R., Johns, N.E., Keiser, J., King, C.H., Lozano, R., Murdoch, M.E., O’Hanlon, S., Pion, S.D.S., Pullan, R.L., Ramaiah, K.D., Roberts, T., Shepard, D.S., Smith, J.L., Stolk, W.A., Undurraga, E.A., Utzinger, J., Wang, M., Murray, C.J.L., Naghavi, M. (2014). The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>

Hsieh, T.C., Ma, K.H., Chao, A. (2016). iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods Ecol. Evol.* 7, 1451–1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>

Huson, D.H., Beier, S., Flade, I., Górska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., Ruscheweyh, H.-J., Tappu, R. (2016). MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLOS Comput. Biol.* 12, e1004957. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957>

Hyde, J., Correa, M.A., Hughes, G.L., Steven, B., Brackney, D.E. (2020). Limited influence of the microbiome on the transcriptional profile of female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Scientific Reports*, 10. 10.1038/s41598-020-67811-y

Hyde, J., Gorham, C., Brackney, D.E., Steven, B. (2019). Antibiotic resistant bacteria and commensal fungi are common and conserved in the mosquito microbiome. *PLoS One.* 14:8, e0218907. 10.1371/journal.pone.0218907

Jaccard, P. (1912). The Distribution of the Flora in the Alpine Zone.1. *New Phytol.* 11, 37–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x>

Jost, L. (2006). Entropy and diversity. *Oikos* 113, 363–375. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>

Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O’Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A.L., Madsen, K.L., Wong, G.K.-S. (2016). Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00459>

Junqueira, A.C.M., Ratan, A., Acerbi, E., Drautz-Moses, D.I., Premkrishnan, B.N.V., Costea, P.I., Linz, B., Purbojati, R.W., Paulo, D.F., Gaultier, N.E., Subramanian, P., Hasan, N.A., Colwell, R.R., Bork, P., Azeredo-Espin, A.M.L., Bryant, D.A., Schuster, S.C. (2017). The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial transmission reservoirs. *Sci. Rep.* 7, 16324. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16353-x>

Kämpfer, P., Matthews, H., Glaeser, S.P., Martin, K., Lodders, N., Faye, I. (2011). *Elizabethkingia anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61:11, 2670-2675. 10.1099/ij.s.0.026393-0.

- Kang, D.-W., Adams, J.B., Coleman, D.M., Pollard, E.L., Maldonado, J., McDonough-Means, S., Caporaso, J.G., Krajmalnik-Brown, R. (2019). Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci. Rep.* 9, 5821. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0>
- Kanzok, S.M., Jacobs-Lorena, M. (2006). Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. *Trends Parasitol.* 22, 49–51. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.12.008>
- Katzelnick, L.C., Gresh, L., Halloran, M.E., Mercado, J.C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* 358, 929–932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J.H., Kim, D.W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H.B., Isaacson, R. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kraemer, M.U., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A.Q., Shearer, F.M., Barker, C.M., Moore, C.G., Carvalho, R.G., Coelho, G.E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I.R., Teng, H.-J., Brady, O.J., Messina, J.P., Pigott, D.M., Scott, T.W., Smith, D.L., Wint, G.W., Golding, N., Hay, S.I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kruskal, W.H., Wallis, W.A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* 47, 583–621. <https://doi.org/10.2307/2280779>
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R.G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J.H., Jarman, R.G., Scott, T.W. (2009). Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol. Biol.* 9, 160. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-160>
- Langmead, B., Salzberg, S. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lau, S., Chow, W.N., Foo, C.H., Curreem, S.O.T., Lo, G.C-S., Teng, J.L.L., Chen, J.H.K., Ng, R.H.Y., Wu, A.K.L., Cheung, I.Y.Y., Chau, S.K.Y., Lung, D.C., Lee, R.A., Tse, C.W.S., Fung, K.S.C., Que, T-L., Woo, P.C.Y. (2016). *Elizabethkingia anophelis* bacteremia is associated with clinically significant infections and high mortality. *Sci Rep* 6, 26045. <https://doi.org/10.1038/srep26045>
- Lee, W.-J., Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 10, 416–424. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1535>
- Li, H., Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

- Li, X., Yang, J., Pu, Q., Peng, X., Xu, L., Liu, S. (2019). Serine hydroxymethyltransferase controls blood-meal digestion in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasit Vectors*. 12:1, 460. [10.1186/s13071-019-3714-2](https://doi.org/10.1186/s13071-019-3714-2)
- Lobo, F.P., Mota, B.E.F., Pena, S.D.J., Azevedo, V., Macedo, A.M., Tauch, A., Machado, C.R., Franco, G.R. (2009). Virus-Host Coevolution: Common Patterns of Nucleotide Motif Usage in Flaviviridae and Their Hosts. *PLOS ONE* 4, e6282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006282>
- Lozovei, A.L. (2001). Microhabitats de mosquitos (Diptera, Culicidae) em internódios de taquara na Mata Atlântica, Paraná, Brasil. *Iheringia Sér. Zool.* 3–13. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212001000100001>
- Ma, Z. (2018). Chapter 8 - Measuring Microbiome Diversity and Similarity with Hill Numbers, in: Nagarajan, M. *Metagenomics*. Academic Press, pp. 157–178. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00008-2>
- Maciel-de-Freitas, R., Avendanho, F.C., Santos, R., Sylvestre, G., Araújo, S.C., Lima, J.B.P., Martins, A.J., Coelho, G.E., Valle, D. (2014). Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. *PLOS ONE* 9, e92424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092424>
- Manjarres-Suarez, A., Olivero-Verbel, J. (2013). Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. *Rev. Costarric. Salud Pública* 22, 68–75.
- Malek, A., McGlynn, K., Taffner, S., Fine, L., Tesini, B., Wang, J., Mostafa, H., Petry, S., Perkins, A., Graman, P., Hardy, D., Pecora, N. (2019). Next-Generation-Sequencing-Based Hospital Outbreak Investigation Yields Insight into *Klebsiella aerogenes* Population Structure and Determinants of Carbapenem Resistance and Pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 63:6, e02577-18. [10.1128/AAC.02577-18](https://doi.org/10.1128/AAC.02577-18)
- Marcombe, S., Mathieu, R.B., Pocquet, N., Riaz, M.-A., Poupardin, R., Sélior, S., Darriet, F., Reynaud, S., Yébakima, A., Corbel, V., David, J.-P., Chandre, F. (2012). Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. *PLOS ONE* 7, e30989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030989>
- Mardis, E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 24, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007>
- Marti, G.A., Balsalobre, A., Susevich, M.L., Rabinovich, J.E., Echeverría, M.G. (2015). Detection of triatomine infection by Triatoma virus and horizontal transmission: Protecting insectaries and prospects for biological control. *J. Invertebr. Pathol.* 124, 57–60. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.10.008>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

- McMurdie, P.J., Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McTaggart, L.R., Stapleton, P.J., Eshaghi, A., Soares, D., Brisse, S., Patel, S.N., Kus, J.V. (2019). Application of whole genome sequencing to query a potential outbreak of *Elizabethkingia anophelis* in Ontario, Canada. *Access Microbiol.* 1:2, e000017. 10.1099/acmi.0.000017
- Mertschnigg, T., Patz, S., Becker, M., Feierl, G., Ruppel, S., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., Zarfel, G. (2020). First Report of *Kosakonia radicincitans* Bacteraemia from Europe (Austria) - Identification and Whole-Genome Sequencing of Strain DSM 107547. *Sci Rep* 10, 1948. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58689-x>
- Migura-Garcia, L., Ramos, R., Cerdà-Cuéllar, M. (2017). Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serovars and *Campylobacter* spp. Isolated from an Opportunistic Gull Species, Yellow-legged Gull (*Larus michahellis*). *J Wildl Dis.* 53:1, 148-152. 10.7589/2016-03-051
- Ministério da Saúde. (2004). Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela. Brasília
- Mitra, S., Rupek, P., Richter, D.C., Urich, T., Gilbert, J.A., Meyer, F., Wilke, A., Huson, D.H., (2011). Functional analysis of metagenomes and metatranscriptomes using SEED and KEGG. *BMC Bioinformatics* 12, S21. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S21>
- Mombelli, A., Oosten, M.A.C., Schürch, E., Lang, N.P. (1987). The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol. Immunol.* 2, 145–151. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1987.tb00298.x>
- 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., McGraw, E.A., van den Hurk, A.F., Ryan, P.A., O’Neill, S.L. (2009). A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139, 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
- Muturi, E.J., Dunlap, C., Ramirez, J.L., Rooney, A.P., Kim, C.-H. (2018). Host blood meal source has a strong impact on gut microbiota of *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol. Ecol.* <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy213>
- Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin. J. Gastroenterol.* 11, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
- Noskov, Y.A., Kabilov, M.R., Polenogova, O.V., Yurchenko, Y.A., Belevich, O.E., Yoroslavtseva, O.N., Alikina, T.Y., Byvaltsev, A.M., Rotskaya, U.N., Morozova, V.V., Glupov, V.V., Kryukov, V.Y. (2021). A Neurotoxic Insecticide Promotes Fungal Infection in *Aedes aegypti* Larvae by Altering the Bacterial Community. *Microb Ecol* 81, 493–505. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01567-w>

- Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P., O'hara, R., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, H., Szoecs, E., Wagner, H. (2019). Vegan: community ecology package.
- Oliveira, J.H.M., Gonçalves, R.L.S., Lara, F.A., Dias, F.A., Gandara, A.C.P., Menna-Barreto, R.F.S., Edwards, M.C., Laurindo, F.R.M., Silva-Neto, M.A.C., Sorgine, M.H.F., Oliveira, P.L. (2011). Blood Meal-Derived Heme Decreases ROS Levels in the Midgut of *Aedes aegypti* and Allows Proliferation of Intestinal Microbiota. *PLOS Pathog.* 7, e1001320. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001320>
- Olson, K.E., Blair, C.D. (2015). Arbovirus-mosquito Interactions: RNAi Pathway. *Curr. Opin. Virol.* 15, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.001>
- Onyango, G.M., Bialosuknia, M.S., Payne, F.A., Mathias, N., Ciota, T.A., Kramer, D.L. (2020). Increase in temperature enriches heat tolerant taxa in *Aedes aegypti* midguts. *Sci Rep* 10, 19135. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76188-x>
- Onyango, G.M., Payne, A.F., Stout, J., Dieme, C., Kuo, L., Kramer, L.D., Ciota, A.T. (2020). Potential for transmission of *Elizabethkingia anophelis* by *Aedes albopictus* and the role of microbial interactions in Zika virus competence. *bioRxiv*, pre-print. 10.1101/702464
- Organização Mundial da Saúde. (2011). Global insecticide use for vector-borne disease control: a 10-year assessment [2000-2009]. OMS
- Overmann, J., Abt, B., Sikorski, J. (2017). Present and Future of Culturing Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 711–730. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093449>
- Pearson, K. (1895). Note on Regression and Inheritance in the Case of Two Parents. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. I* 58, 240–242.
- Perrin, A., Larsonneur, E., Nicholson, A.C., Edwards, D.J., Gundlach, K.M., Whitney, A.M., Gulvik, C.A., Bell, M.E., Rendueles, O., Cury, J., Hugon, P., Clermont, D., Enouf, V., Loparev, V., Juieng, P., Monson, T., Warshauer, D., Elbadawi, L.I., Walters, M.S., Crist, M.B., Noble-Wang, J., Borlaug, G., Rocha, E.P.C., Criscuolo, A., Touchon, M., Davis, J.P., Holt, K.E., McQuiston, J.R., Brisse, S. (2017). Evolutionary dynamics and genomic features of the *Elizabethkingia anophelis* 2015 to 2016 Wisconsin outbreak strain. *Nat Commun.* 24:8, 15483. 10.1038/ncomms15483
- Petersen, M.T., Silveira, I.D.D., Tátilla-Ferreira, A., David, M.R., Chouin-Carneiro, T., Van den Wouwer, L., Maes, L., Maciel-de-Freitas, R. (2018). The impact of the age of first blood meal and Zika virus infection on *Aedes aegypti* egg production and longevity. *PLoS One.* 13:7, e0200766. 10.1371/journal.pone.0200766
- Pimenta de Oliveira, S., Dantas de Oliveira, C., Viana Sant'Anna, M.R., Carneiro Dutra, H.L., Caragata, E.P., Moreira, L.A. (2017). *Wolbachia* infection in *Aedes aegypti* mosquitoes alters blood meal excretion and delays oviposition without affecting trypsin activity. *Insect Biochem.*

Mol. Biol. 87, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.010>

Posidonio, A.P.V., Oliveira, L.H.G., Rique, H.L., & Nunes, F.C. (2021). The longevity of *Aedes aegypti* mosquitoes is determined by carbohydrate intake. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 73(1), 162-168. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-12080>

Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.-P. (2008). Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.01.004>

Powell, J.R., Tabachnick, W.J., Powell, J.R., Tabachnick, W.J., 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 11–17. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>

Quaresma, J.A.S., Pagliari, C., Medeiros, D.B.A., Duarte, M.I.S., Vasconcelos, P.F.C. (2013). Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever: Immunopathology of yellow fever. *Rev. Med. Virol.* 23, 305–318. <https://doi.org/10.1002/rmv.1752>

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing.

Ramirez, J.L., Short, S.M., Bahia, A.C., Saraiva, R.G., Dong, Y., Kang, S., Tripathi, 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 Pathog.* 10, e1004398. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004398>

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 Negl. Trop. Dis.* 6, e1561. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001561>

Rancès, E., Ye, Y.H., Woolfit, M., McGraw, E.A., O'Neill, S.L. (2012). The Relative Importance of Innate Immune Priming in *Wolbachia*-Mediated Dengue Interference. *PLOS Pathog.* 8, e1002548. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002548>

Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., Black, W.C.I. (2010). Insecticide resistance in dengue vectors. *Trop. Online.* 1.

Rappé, M.S., Giovannoni, S.J. (2003). The Uncultured Microbial Majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 369–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>

Razumov, A.S. (1932). The direct method of calculation of bacteria in water: comparison with the Koch method. *Mikrobiologiya* 1, 131-146. Acessado em 01/08/20: <https://github.com/kloydbeaufort/great-plate-count-translated>

Reed, T.A.N., Watson, G., Kheng, C., Tan, P., Roberts, T., Ling, C.L., Miliya, T., Turner, P.

- (2020). *Elizabethkingia anophelis* Infection in Infants, Cambodia, 2012-2018. *Emerg Infect Dis.* 26:2, 320-322. [10.3201/eid2602.190345](https://doi.org/10.3201/eid2602.190345)
- Ritchie, S.A. (2014). Dengue vector bionomics: why *Aedes aegypti* is such a good vector., in: Gubler, D.J., Ooi, E.E., Vasudevan, S., Farrar, J. (Eds.), *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CABI, Wallingford, pp. 455–480. <https://doi.org/10.1079/9781845939649.0455>
- Ritz, K. (1998). Molecular approaches to the analysis of soil microbial community structure and function (Environment and Soil Microorganisms, Symposium). *Soil Microorg.* 52, 7–21. https://doi.org/10.18946/jssm.52.0_7
- Rivera, M.C., Izard, J., 2015. Chapter 10 - Promises and Prospects of Microbiome Studies, in: Izard, J., Rivera, M.C. (Eds.), *Metagenomics for Microbiology*. Academic Press, Oxford, pp. 145–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410472-3.00010-5>
- Salter, S.J., Cox, M.J., Turek, E.M., Callus, T.S., Cookson, W.O., Moffatt, M.F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N.J., Walker, A.W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* 12, 87. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0087-z>
- Sanchez-Vargas, I., Travanty, E.A., Keene, K.M., Franz, A.W.E., Beaty, B.J., Blair, C.D., Olson, K.E. (2004). RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Res., Viral Gene Silencing by RNA Interference* 102, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.017>
- Sandiford, S.L., Dong, Y., Pike, A., Blumberg, B.J., Bahia, A.C., Dimopoulos, G. (2015). Cytoplasmic Actin Is an Extracellular Insect Immune Factor which Is Secreted upon Immune Challenge and Mediates Phagocytosis and Direct Killing of Bacteria, and Is a *Plasmodium* Antagonist. *PLOS Pathog.* 11, e1004631. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004631>
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 265, 687–695. <https://doi.org/10.1038/265687a0>
- Scholte, E.-J., Knols, B.G.J., Takken, W. (2006). Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.006>
- Schuster, S.C. (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat. Methods* 5, 16–18. <https://doi.org/10.1038/nmeth1156>
- Scolari, F., Casiraghi, M., Bonizzoni, M. (2019). *Aedes* spp. and Their Microbiota: A Review. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02036>
- Seol, D., Jhang, S.Y., Kim, Hyaekang, Kim, S.-Y., Kwak, H.-S., Kim, S.H., Lee, W., Park, S., Kim, Heebal, Cho, S., Kwak, W. (2019). Accurate and Strict Identification of Probiotic Species Based on Coverage of Whole-Metagenome Shotgun Sequencing Data. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01683>

- Shannon, C.E. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Shelomi, M. (2019). Bacterial and eukaryote microbiomes of mosquito habitats in dengue-endemic southern Taiwan. *J. Asia-Pac. Entomol.* 22, 471–480. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.02.011>
- Shepard, D.S., Undurraga, E.A., Halasa, Y.A., Stanaway, J.D. (2016). The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 16, 935–941. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00146-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00146-8)
- Shin, S.C., Kim, S.-H., You, H., Kim, B., Kim, A.C., Lee, K.-A., Yoon, J.-H., Ryu, J.-H., Lee, W.-J. (2011). *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science* 334, 670–674. <https://doi.org/10.1126/science.1212782>
- Shragai, T., Tesla, B., Murdock, C., Harrington, L.C. (2017). Zika and chikungunya: mosquito-borne viruses in a changing world: Global change and vectors of chikungunya and Zika. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1399, 61–77. <https://doi.org/10.1111/nyas.13306>
- Simpson, E.H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature* 163, 688–688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Singh, B.R., Singh, V.P., Agarwal, M., Sharma, G., Chandra, M. (2004). Haemolysins of *Salmonella*, their role in pathogenesis and subtyping of *Salmonella* serovars. *Indian J Exp Biol.* 42:3, 303-13. PMID: 15233302.
- Staley, J.T., Konopka, A. (1985). Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>
- Storelli, G., Defaye, A., Erkosar, B., Hols, P., Royet, J., Leulier, F. (2011). *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab.* 14, 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.07.012>
- Tanner, A.C.R., Socransky, S.S., Goodson, J.M. (1984). Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J. Periodontal Res.* 19, 279–291. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1984.tb00819.x>
- Tchankouo-Nguetcheu, S., Khun, H., Pincet, L., Roux, P., Bahut, M., Huerre, M., Guette, C., Choumet, V. (2010). Differential Protein Modulation in Midguts of *Aedes aegypti* Infected with Chikungunya and Dengue 2 Viruses. *PLOS ONE* 5, e13149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013149>
- Thele, R., Gumpert, H., Christensen, L.B., Worning, P., Schønning, K., Westh, H., Hansen, T.A. (2017). Draft genome sequence of a *Kluyvera intermedia* isolate from a patient with a pancreatic abscess. *J Glob Antimicrob Resist.* 10:1-2. [10.1016/j.jgar.2017.05.007](https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.007)

- Torondel, B., Ensink, J.H.J., Gundogdu, O., Ijaz, U.Z., Parkhill, J., Abdelahi, F., Nguyen, V.-A., Sudgen, S., Gibson, W., Walker, A.W., Quince, C. (2016). Assessment of the influence of intrinsic environmental and geographical factors on the bacterial ecology of pit latrines. *Microb. Biotechnol.* 9, 209–223. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12334>
- Tuomisto, H. (2010). A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography* 33, 2–22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2009.05880.x>
- Vale, N., Aguiar, L., Gomes, P. (2014). Antimicrobial peptides: a new class of antimalarial drugs? *Front. Pharmacol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00275>
- Vargas, V., Cime-Castillo, J., Lanz-Mendoza, H. (2020). Immune priming with inactive dengue virus during the larval stage of *Aedes aegypti* protects against the infection in adult mosquitoes. *Sci. Rep.* 10, 6723. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63402-z>
- Venables W.N., Ripley B.D. (2002). *Modern Applied Statistics with S*, Fourth edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0. <https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.
- Vezzani, D., Mesplet, M., Eiras, D.F., Fontanarrosa, M.F., Schnittger, L. (2011). PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina. *Parasitol. Res.* 108, 985–989. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2142-1>
- Xia, H., Wang, Y., Shi, C., Atoni, E., Zhao, L., Yuan, Z. (2018) Comparative Metagenomic Profiling of Viromes Associated with Four Common Mosquito Species in China. *Virol. Sin.* 33, 59–66. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0015-4>
- Wang, Y.-H., Chang, M.-M., Wang, X.-L., Zheng, A.-H., Zou, Z. (2018). The immune strategies of mosquito *Aedes aegypti* against microbial infection. *Dev. Comp. Immunol., Insect innate immunity in China* 83, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.001>
- Wei, G., Lai, Y., Wang, G., Chen, H., Li, F., Wang, S. (2017). Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 5994–5999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703546114>
- Whiteman, A., Loaiza, J.R., Yee, D.A., Poh, K. C., Watkins, A.S., Rapp, T.J., Klinne, L., Ahmed, A., Chen, S., Delmelle, E., Oguzie, J.U. (2020). Do socioeconomic factors drive *Aedes* mosquito vectors and their arboviral diseases? A systematic review of dengue, chikungunya, yellow fever, and Zika Virus. *One Health.* 10.1016/j.onehlt.2020.100188
- Whittaker, R.H. (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon* 21, 213–251. <https://doi.org/10.2307/1218190>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd ed, Use R! Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>

Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.-W., Lambkin, C., Bertone, M.A., Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Pape, T., Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S.N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G.E., Thompson, F.C., Grimaldi, D.A., Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K. (2011). Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5690–5695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012675108>

Willison, H.J., Jacobs, B.C., van Doorn, P.A. (2016). Guillain-Barré syndrome. *The Lancet* 388, 717–727. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00339-1)

Zhao, Y., Tang, H., Ye, Y. (2012). RAPSearch2: a fast and memory-efficient protein similarity search tool for next-generation sequencing data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 28, 125–126. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr595>

Zhou, Y., Chen, J., Zhu, X., Wang, Y., Liu, X., Fan, H., Duan, Y., Chen, L. (2021). Efficacy of *Bacillus megaterium* strain Sneb207 against soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in soybean. *Pest Manag Sci.* 77:1, 568-576. 10.1002/ps.6057