

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

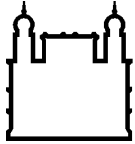
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Diversidade bacteriana da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em áreas com diferentes paisagens no estado do Rio de Janeiro**

**João Miranda da Costa Baltar**

Rio de Janeiro

Setembro de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***João Miranda da Costa Baltar***

**Diversidade da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em áreas com diferentes paisagens do Rio de Janeiro**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Orientador (es):** Prof. Dr<sup>a</sup>. Mariana Rocha David

**RIO DE JANEIRO**

Setembro de 2022

Baltar, João Miranda da Costa .

Diversidade bacteriana da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em áreas com diferentes paisagens no estado do Rio de Janeiro / João Miranda da Costa Baltar. - Rio de Janeiro, 2022.

131 f.; il.

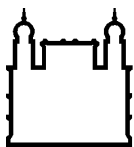
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientadora: Mariana Rocha David.

Bibliografia: f. 109-131

1. *Aedes albopictus*. 2. Microbiota. 3. Ambiente. 4. Sequenciamento 16S rDNA. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: João Miranda da Costa Baltar***

**Diversidade da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)  
em áreas com diferentes paisagens do Rio de Janeiro**

**ORIENTADORA: Prof. Dr<sup>a</sup>. Mariana Rocha David**

**Aprovada em: 28 de Setembro de 2022**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniele Castro - Presidente (Fiocruz/IOC)**

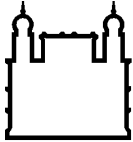
**Prof. Dr. Luis Eduardo Martínez Villegas (Ohio State University / EUA)**

**Prof. Dr. Erich Loza Telleria (Charles University / Rep.Tcheca)**

**Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Jr. (IOC / FIOCRUZ)**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Tatiane Marques Porangaba de Oliveira (USP / SP)**

Rio de Janeiro, Setembro de 2022



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

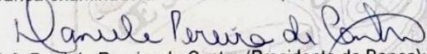
**Fundação Oswaldo Cruz**

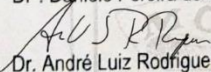


Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **João Miranda da Costa Baltar**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Mariana Rocha David. Ao vigésimo oitavo dia do mês de setembro de dois mil e vinte e dois, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: "**Diversidade bacteriana da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) em áreas com diferentes paisagens no estado do Rio de Janeiro**", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia de Parasita, Vetores e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Daniele Pereira de Castro – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Luis Eduardo Martínez Villegas – Universidade Estadual de Ohio/EUA, Dr. Erich Loza Telleria – Charles University/Rep. Tcheca, e como suplentes: Dr. Ademir de Jesus Martins Junior - IOC/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Tatiane Marques Porangaba de Oliveira - USP/SP. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 28 de setembro de 2022.

  
Dr<sup>a</sup>. Daniele Pereira de Castro (Presidente da Banca):

  
Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimentooseac@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimentooseac@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/iocensino](http://www.fiocruz.br/iocensino)

**Dedico,**

**A minha eterna avó Eny Miranda da Costa, vítima da pandemia de COVID-19, que é meu exemplo de ser humano e inspiração para meu futuro. Todo o esforço e dedicação depositados nesta dissertação são em memória da pessoa que, junto a mim, sempre sonhou com a chegada deste momento em minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é resultado de uma grande superação, a partir de um projeto pensado desde a minha iniciação científica e que passou por diversas incertezas, altos e baixos durante o árduo processo. Cabe aqui nesta seção agradecer a todos que contribuíram, para que eu pudesse alcançar meu objetivo que é a finalização deste trabalho.

Agradeço primeiramente à minha família, meu pai Cláudio Baltar e minhas mães Ellen Miranda e Karin Palhano, que de formas diferentes se uniram em um momento delicado de pandemia para que eu tivesse todo o suporte possível para ter condições de seguir com meu trabalho. Além de toda a educação, carinho e confiança depositada em todo o meu processo acadêmico.

Aos meus irmãos Vicente, Lia e Teresa. Sou extremamente feliz de ter irmãos unidos, que acompanharam meus momentos ruins e também fizeram questão de afirmar que sou uma figura de inspiração. Obrigado por todo carinho com o irmão mais velho e a confiança que depositam em mim!

A minha tia Brígida e ao meu avô Jorge, pessoas queridas e exemplos de resiliência, perseverança e resistência. Grato pelo apoio e por mostrarem através de suas atitudes que nunca devemos desistir, mesmo com a presença de grandes dificuldades.

Ao meu padrinho Marcelo, que sempre me apoia e é aquele que está sempre disposto a me ajudar a qualquer custo. Sou grato por todos os momentos que tenho o prazer de tê-lo presente ao meu lado.

A minha tia Eliani e ao meu primo Tobias, obrigado por todo o orgulho que vocês têm de mim e os momentos únicos que me proporcionaram. A mãe das minhas irmãs, Luisa Buarque, minha eterna Lulu, fonte de inspiração pela profissional que é e as palavras certeiras de apoio e orientação, como alguém que já trilhou este caminho que estou traçando.

Minha namorada e parceira Ana Isabelle. Além de todo o amor, confiança e carinho, só ela me acompanhou nos piores momentos da pandemia e a cada pequena conquista deste trabalho. Se algum momento eu duvidei da minha capacidade, ela estava presente para me lembrar do meu potencial. Registro aqui a importância de uma parceira de vida para este trabalho de grande dedicação.

Agradeço a minha falecida avó Eny Miranda, vítima da Covid-19, que durante todas as conquistas da minha vida esteve presente. Sempre me educou e me orientou a ser um grande profissional e ser humano onde quer que eu esteja.

A toda a equipe do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (LATHEMA), por ter me recebido quando estava ainda me descobrindo na Biologia e me deu todo o suporte para que eu me tornasse o profissional que sou hoje. Em especial destaco a equipe do quinto andar da sala 46, que me apoiaram e estenderam a mão para mim quando eu mais precisei: Aline, Celestino, Gabriela Azambuja, Gabriela Almeida, Jéssica, Lucas, Manuela, Mauro, Mikel e Rafael.

Ao Renato, agente de saúde do laboratório que participou ativamente das coletas do meu trabalho, que muitas vezes foi sozinho a campo comigo e nos divertíamos como nunca ao capturar diversos mosquitos. Vítima da Covid-19, este trabalho só foi possível graças à contribuição dele. Obrigado pelas suas palavras de inspiração e admiração com meu esforço, serei eternamente grato pelos seus ensinamentos!

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Mariana David, um exemplo de profissional e de inspiração como cientista. Obrigado pelos ensinamentos, orientações, apoio e a qualidade com a qual executa seus trabalhos! Eu a tenho como uma das minhas principais referências profissionais, tanto por sua excelência, pela confiança, apoio e carinho que depositou durante a minha trajetória. Dando-me o prazer de fazer ciência ao lado de uma pesquisadora tão incrível.

Ao meu co-orientador de coração Dr. Márcio Pavan, também uma referência profissional e de uma trajetória que tenho imensa admiração. Como professor também, o vejo como uma inspiração ao lecionar qualquer tipo de conteúdo e admiração com a paciência e clareza com a qual ajuda a mim e a todos do laboratório. Obrigado pela confiança e apoio em dias difíceis!

Agradeço à Plataforma de sequenciamento de Alto Desempenho do Pavilhão Leônidas Deane, que me recebeu e me deu a oportunidade de acompanhar do início ao fim o processo de sequenciamento das minhas amostras. Obrigado Marília e Giovanna, que se dispuseram a tirar todas as minhas dúvidas e sempre foram solícitas quando precisei de ajuda!

Aos meus amigos Daniel Anibolet, pela ajuda com a confecção de mapas, Davi Coutinho, pelo suporte e amparo com a parte de programação, Mariana de Paula, pelas imagens autorais confeccionadas de forma brilhante para elevar ainda mais a originalidade desse trabalho, Jéssica Corrêa, pela ajuda crucial no processo de extração de DNA, as palavras carinhosas e de apoio para me amparar em momentos difíceis. A minha segunda mãe Karin Palhano, que além de toda a força diária, revisou e editou comigo todos os gráficos dos meus resultados e por fim aos moderadores do fórum oficial da plataforma de análise de microbiomas Qiime2, que demonstraram que a colaboração na ciência é necessária para que



o conhecimento científico seja perpetuado, independente de barreiras geográficas e linguísticas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, por me permitir ter o contato com excelentes pesquisadores e viver o dia a dia em uma instituição que é de referência internacional, que é de extrema importância para salvar a vida de milhões todos os dias, me sinto extremamente orgulhoso de fazer parte do Instituto Oswaldo Cruz e FIOCRUZ. Agradeço a Comissão de Pós-graduação pela indicação como bolsista de mestrado FAPERJ nota 10, sendo um reflexo de todo o empenho e dedicação que tive com este trabalho. A secretaria acadêmica pela pronta ajuda sempre que precisei, em especial a Rita, por estar sempre disponível para ajudar não só a mim, mas todos os alunos com muita gentileza e solicitude.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa, CAPES, FAPERJ e a VPEIC que possibilitaram, diante das dificuldades da pandemia, que eu pudesse dar continuidade a este trabalho.

Por fim agradeço aos membros e suplentes de minha banca. Excelentes pesquisadores, que tive o prazer de aprender e progredir como biólogo tendo contato com seus trabalhos científicos. Obrigado a Dr. Erich Telleria, Dr. Luiz Villegas, Dra. Tatiane Oliveira, Dr. Ademir Martins e em especial a Dra. Daniele Castro, por aceitar revisar esta dissertação e ser a presidente da banca.

## **Epígrafe**

“A persistência é o que te leva ao sucesso. Quando estiver prestes a largar tudo, simplesmente olhe para trás e veja todo o percurso que já trilhou para chegar até aqui. Vale mesmo a pena desistir agora?”  
(Autor desconhecido)

## RESUMO

### Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária

João Miranda da Costa Baltar

*Aedes albopictus* é responsável pela transmissão de DENV e CHIKV na Ásia e África, respectivamente. Em condições de laboratório possui competência para transmitir diversos arbovírus. No Brasil, esta espécie tem um papel vetorial ainda indefinido, porém com potencial de atuar como vetor-ponte de vírus em interfaces urbano-florestal. Fatores com potencial em influenciar infecções por arbovírus em mosquitos, além de afetar o desenvolvimento e biologia destes vetores, vêm sendo investigados, como é o caso da microbiota intestinal. Sabe-se que o ambiente é importante na formação da microbiota, contudo pouco se sabe a respeito da influência da paisagem e seus elementos na estrutura da microbiota de mosquitos vetores. Assim, o presente estudo visa caracterizar a microbiota intestinal de três populações de *Ae. albopictus* provindas de áreas com diferentes paisagens (comunidade / bairro arborizado / floresta) no Rio de Janeiro (Brasil). Além de analisar o efeito da colonização de mosquitos em laboratório no perfil da microbiota destes insetos. Para tanto, os mosquitos foram coletados em três diferentes localidades, em dois períodos de coleta correspondendo a duas estações distintas. Ovos também foram coletados e criados em laboratório para a geração de grupos F1 referentes às localidades de coleta. Como grupo controle de laboratório, uma colônia de *Ae. albopictus* com mais de 20 gerações de criação em insetário foi mantida nas mesmas condições de F1. Os mosquitos tiveram os intestinos dissecados, armazenados individualmente e o DNA foi extraído de 96 amostras, que prosseguiram para sequenciamento do gene 16S rRNA, em Illumina Miseq. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa QIIME2 (versão 2021.4), fazendo uso de quatro variáveis categóricas (local, período, origem e população), para investigação da diversidade dentro (alfa) e entre (beta) a microbiota das amostras intestinais, além da abundância relativa dos principais táxons encontrados, *core* bacteriano de *Ae. albopictus* e análise da composição dos microbiomas (ANCOM). Diferenças significativas em relação à diversidade alfa e beta, entre a microbiota de mosquitos de campo e laboratório e entre os diferentes períodos de coleta foram observadas. Em geral, o grupo de mosquitos F1 demonstrou uma queda na riqueza e diversidade, além de agrupar na composição da microbiota com o grupo de laboratório. Este resultado indica que apenas uma geração de criação em laboratório (F1) foi suficiente para que a estrutura da microbiota de mosquitos de campo sofresse mudanças significativas. Em relação à composição da microbiota intestinal dos diferentes grupos, levando-se em conta abundância relativa dos 12 táxons mais dominantes, os resultados obtidos indicaram uma dominância de Acetobacteraceae em mosquitos criados em laboratório e uma ausência em mosquitos de campo. Esta dominância de Acetobacteraceae em F1 foi correlacionada com a ausência de *Wolbachia* neste grupo, com este táxon apresentando uma abundância elevada e uma assinatura bacteriana em mosquitos de campo. Hipotetizamos que este resultado seja em função de uma correlação negativa entre ambos os táxons, já apresentada em outros trabalhos. O *core* geral de *Ae. albopictus* foi composto por Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Moraxellaceae, Actinomycetales e Halomonadaceae. Estudos que investiguem a microbiota de diferentes populações de mosquitos vetores são de extrema importância, visando ampliar o conhecimento acerca de quais são os fatores que influenciam na formação de sua microbiota, quais táxons estão associados a determinadas espécies independente de origem geográfica, perfil genético ou sazonalidade. Além disso, gera conhecimento básico para ser aplicado em abordagens de controle vetorial a partir destas bactérias, tal qual a paratransgênese.

**ABSTRACT**  
**MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY**

**João Miranda da Costa Baltar**

*Aedes albopictus* is responsible for the transmission of several DENV and CHIKV in Asia and Africa, respectively, being under laboratory conditions competent to transmit several arboviruses. In Brazil, this mosquito has an undefined vector role, but is designated as a potential bridge vector of viruses at urban-forest interfaces. The microbiota has been recognized for its potential to influence arbovirus infections in mosquitoes, the development and biology of these vectors. It is known that the environment is important in shaping the microbiota, however little is known about the influence of the landscape and its elements on the structure of the microbiota of vector mosquitoes. Thus, the present study aims to characterize the intestinal microbiota of three populations of *Ae. albopictus* from areas with different landscapes (slum / wooded neighborhood / forest) in Rio de Janeiro (Brazil) and the effect of laboratory colonization on the microbiota profile of these insects. Therefore, the mosquitoes were collected in three different locations, in two collection periods corresponding to two different seasons. Eggs were also collected and reared in the laboratory to generate F1 groups referents to the collection locations. As a laboratory control group, a colony of more than 20 generations of insectary rearing was created under the same conditions as F1. Mosquitoes had their guts dissected, stored individually and DNA was extracted from 96 samples, which proceeded to sequencing the 16S rRNA gene in Illumina Miseq. The sequences obtained were analysed using the QIIME2 program (version 2021.4), using four categorical variables (locality, period, origin and population), to investigate diversities within (alpha) and between (beta) gut microbiota samples, also the relative abundance of the main taxa found, bacterial core of *Ae. albopictus* and analysis of compositions of microbiomes (ANCOM). Significant differences were observed in relation to alpha and beta diversity, between the microbiota of field and laboratory mosquitoes and between the different collection periods. In general, the F1 group showed a decrease in richness and diversity, in addition to grouping according to the composition of the microbiota with the group referred as laboratory colony. This result indicates that only one generation of breeding in the laboratory was enough to alter the structure of the microbiota of field mosquitoes. Regarding the composition of the intestinal microbiota of the different groups, taking into account the relative abundance of the 12 most dominant taxa, the results obtained indicate a dominance of Acetobacteraceae in laboratory-bred mosquitoes and an absence in field mosquitoes. This dominance of Acetobacteraceae in F1 was correlated with an absence of *Wolbachia* in this group, with this taxon showing high abundance and a bacterial signature in field mosquitoes. We hypothesize that this result is due to a negative correlation between both taxa, already presented in other works. The general core of *Ae. albopictus* was composed by Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Moraxellaceae, Actinomycetales and Halomonadaceae. Studies that investigate the microbiota of different populations of mosquitoes are extremely important, aiming to expand the knowledge about what are the factors that influence the shaping of their microbiota, which taxa are associated with certain species regardless of geographic origin, genetic profile or seasonality. Also, promoting vector control approaches from these bacteria, such as paratransgenesis.

# ÍNDICE

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                                                                                                                      | 19 |
| <b>1.1 Arboviroses</b> .....                                                                                                                                                                                                    | 19 |
| <b>1.2 O mosquito <i>Aedes albopictus</i></b> .....                                                                                                                                                                             | 20 |
| 1.2.1 <i>Aedes albopictus</i> e sua importância epidemiológica global .....                                                                                                                                                     | 22 |
| 1.2.2 <i>Aedes albopictus</i> e sua importância epidemiológica no Brasil .....                                                                                                                                                  | 24 |
| 1.2.3 Fatores que modulam a competência vetorial de mosquitos a arbovírus                                                                                                                                                       | 25 |
| <b>1.3 Microbiota</b> .....                                                                                                                                                                                                     | 27 |
| <b>1.4 Microbiota de mosquitos</b> .....                                                                                                                                                                                        | 28 |
| 1.4.1 Impactos da microbiota na biologia dos mosquitos.....                                                                                                                                                                     | 28 |
| 1.4.2 Microbiota e o sistema imune dos mosquitos .....                                                                                                                                                                          | 32 |
| 1.4.3 Microbiota e capacidade vetorial .....                                                                                                                                                                                    | 33 |
| 1.4.4 <i>Wolbachia</i> .....                                                                                                                                                                                                    | 36 |
| 1.4.5 Vias de aquisição da microbiota .....                                                                                                                                                                                     | 38 |
| 1.4.6 Fatores que modulam a composição e diversidade da microbiota de mosquitos.....                                                                                                                                            | 41 |
| <b>1.5 Justificativa</b> .....                                                                                                                                                                                                  | 45 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                                                                                                                                                                                       | 46 |
| <b>2.1 Objetivo geral</b> .....                                                                                                                                                                                                 | 46 |
| <b>2.2 Objetivos específicos</b> .....                                                                                                                                                                                          | 46 |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                                                                                                                                                                             | 47 |
| <b>3.1 Coleta de mosquitos e locais de estudo</b> .....                                                                                                                                                                         | 47 |
| <b>3.2 Processamento de intestinos e extração de DNA</b> .....                                                                                                                                                                  | 49 |
| <b>3.3 Amplificação de DNA, preparação de bibliotecas e sequenciamento em Illumina Miseq</b> .....                                                                                                                              | 51 |
| <b>3.4 Análises de bioinformática e estatística acerca da diversidade bacteriana intestinal de <i>Ae. albopictus</i></b> .....                                                                                                  | 54 |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....                                                                                                                                                                                                      | 60 |
| <b>4.1 Sequenciamento do gene 16s rRNA bacteriano</b> .....                                                                                                                                                                     | 60 |
| <b>4.2 Descontaminação</b> .....                                                                                                                                                                                                | 61 |
| <b>4.3 Análises de diversidade</b> .....                                                                                                                                                                                        | 62 |
| 4.3.1 Índices de diversidade- $\alpha$ indicam diferenças na microbiota quanto ao período de coleta e origem dos mosquitos, mas não entre locais de campo e populações.....                                                     | 64 |
| 4.3.2 Índices de diversidade- $\beta$ indicam dissimilaridades entre a microbiota de <i>Ae. albopictus</i> , com agrupamentos formados principalmente de acordo com a origem e período de coleta de <i>Ae. albopictus</i> ..... | 72 |
| 4.3.3 Composição e abundância da microbiota de <i>Ae. albopictus</i> varia ao nível individual e entre mosquitos de campo e laboratório .....                                                                                   | 73 |
| 4.3.4 A microbiota core bacteriana de <i>Ae. albopictus</i> foi composta por cinco táxons .....                                                                                                                                 | 75 |
| 4.3.5 A microbiota intestinal de <i>Ae. albopictus</i> possui bactérias diferencialmente abundantes de acordo com a localidade e período de coleta.....                                                                         | 81 |

|                                            |     |
|--------------------------------------------|-----|
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....                  | 84  |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....                 | 107 |
| <b>7. PERSPECTIVAS</b> .....               | 108 |
| <b>8. ANEXOS</b> .....                     | 109 |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> ..... | 110 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Morfologia de fêmea de <i>Aedes albopictus</i> .....                                                                                                                         | 20 |
| <b>Figura 2:</b> Susceptibilidade à infecção de <i>Ae. albopictus</i> de diferentes estados brasileiros, a partir de resultados de infecção experimental por arbovírus. ....                  | 25 |
| <b>Figura 3:</b> Esquema representando impactos da microbiota em parâmetros da vida de mosquitos .....                                                                                        | 29 |
| <b>Figura 4:</b> Ciclo de vida holometábolo de <i>Ae. albopictus</i> .....                                                                                                                    | 40 |
| <b>Figura 5:</b> Representação do intestino de mosquitos. A – Intestino de larvas. B – Intestino de adultos .....                                                                             | 41 |
| <b>Figura 6:</b> Mapa representando os locais de coleta de mosquitos no estado do Rio de Janeiro .....                                                                                        | 48 |
| <b>Figura 7:</b> Fluxograma da análise de dados .....                                                                                                                                         | 55 |
| <b>Figura 8:</b> Curvas de rarefação. A – Curvas de rarefação de acordo com o número de ASVs diante do número de sequências B – Número de amostras de acordo com o número de sequências ..... | 63 |
| <b>Figura 9:</b> Boxplots de diversidade alfa de acordo com todos os grupos analisados. A – índice de Faith B – Riqueza (ASVs) C – Índice de Shannon D – Índice de Pielou .....               | 65 |
| <b>Figura 10:</b> Boxplots de diversidade alfa de acordo com a variável local. A – índice de Faith B – Riqueza (ASVs) C – Índice de Shannon D – Índice de Pielou .....                        | 67 |
| <b>Figura 11:</b> Boxplots de diversidade alfa de acordo com a variável período. A – índice de Faith B – Riqueza (ASVs) C – Índice de Shannon D – Índice de Pielou .....                      | 68 |
| <b>Figura 12:</b> Boxplots de diversidade alfa de acordo com a variável origem. A – índice de Faith B – Riqueza (ASVs) C – Índice de Shannon D – Índice de Pielou .....                       | 69 |
| <b>Figura 13:</b> Boxplots de diversidade alfa de acordo com a variável população. A – índice de Faith B – Riqueza (ASVs) C – Índice de Shannon D – Índice de Pielou .....                    | 71 |
| <b>Figura 14:</b> Gráfico PCoA de diversidade beta. A –Dissimilaridade de Bray-Curtis B – Unifrac Ponderado.....                                                                              | 73 |

|                                                                                                             |                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Figura 15:</b> Gráficos de barra empilhados representando a abundância relativa.                         |                                            |
| A – Top 10 táxons no nível de filo                                                                          | B – Top 12 táxons no nível de família      |
| C – Top 12 táxons no nível de gênero .....                                                                  | 77                                         |
| <b>Figura 16:</b> Gráficos do tipo volcano acompanhados de tabelas representativas dos resultados de ANCOM. |                                            |
| A – De acordo com a variável local                                                                          | B – De acordo com a variável período ..... |
|                                                                                                             | 82                                         |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1:</b> Representação dos principais fatores que influenciam na composição e diversidade da microbiota das três principais espécies de mosquitos vetores ..... | 44 |
| <b>Quadro 2:</b> Caracterização dos grupos utilizados nas análises de acordo com a população, origem, período de coleta e geração .....                                 | 50 |
| <b>Quadro 3:</b> Definição das variáveis utilizadas nas análises e seus respectivos grupos .....                                                                        | 57 |
| <b>Quadro 4:</b> Representação da microbiota <i>core</i> entre os grupos de <i>Ae. albopictus</i> .....                                                                 | 80 |
| <b>Tabela 1:</b> Quantidade de amostras por grupo de mosquito que prosseguiram para o sequenciamento .....                                                              | 52 |
| <b>Tabela 2:</b> Números brutos do sequenciamento e após a remoção de resquícios de iniciadores, adaptadores e sequências defeituosas .....                             | 60 |
| <b>Tabela 3:</b> Parâmetros do sequenciamento obtidos após <i>denoising</i> e exclusão de sequências não-bacterianas .....                                              | 61 |
| <b>Tabela 4:</b> Parâmetros do sequenciamento obtidos após o processo de descontaminação <i>in silico</i> .....                                                         | 62 |
| <b>Tabela 5:</b> Resultados do teste PERMANOVA após análises de diversidade beta .....                                                                                  | 73 |



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|             |                                                                                  |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 16S rRNA    | Componente de RNA ribossômico da subunidade menor de ribossomos de procariontes. |
| 16S rDNA    | Fragmento de DNA referente a sequência correspondente ao 16S rRNA                |
| pb          | Pares de bases                                                                   |
| pM          | Picomolar                                                                        |
| mM          | Milimolar                                                                        |
| ng          | Nanograma                                                                        |
| µL          | Microlitro                                                                       |
| ASV         | <i>Amplicon Sequence Variant</i>                                                 |
| BLASTN      | <i>Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool</i>                              |
| CHIKV       | Vírus Chikungunya                                                                |
| DENV        | Vírus dengue                                                                     |
| DNA         | Ácido desoxirribonucleico                                                        |
| F0          | Geração proveniente de campo                                                     |
| F1          | Primeira geração filial                                                          |
| F20         | Vigésima geração filial                                                          |
| LATHEMA     | Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários                          |
| MAYV        | Vírus Mayaro                                                                     |
| NaOH        | Hidróxido de Sódio                                                               |
| PBS         | Tampão-fosfato salino                                                            |
| PCR         | Reação em cadeia da polimerase                                                   |
| <i>Pool</i> | Agrupamento de amostras                                                          |
| Táxon       | Unidade taxonômica associada a um sistema de classificação científica            |
| Taxa        | Plural de Táxon (i.e. Táxons)                                                    |
| ZIKV        | Vírus Zika                                                                       |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Arboviroses

Doenças causadas por patógenos transmitidos por mosquitos se tornaram um problema de saúde pública, social e econômico a nível global. Há uma grande variedade de vírus transmitidos por mosquitos e outros artrópodes, os arbovírus, que se caracterizam por serem vírus envelopados, em sua grande maioria de RNA e que podem circular em humanos e animais vertebrados (Gubler 2006; Weaver e Reisen 2010).

Nos últimos 50 anos, doenças causadas por arbovírus emergiram ou reemergiram (Wilder-Smith et al. 2017), com algumas atingindo um nível global, como é o caso da dengue. O vírus da dengue (DENV) é endêmico em mais de 100 países, com uma estimativa de 400 milhões de casos anuais, sendo 100 milhões destes sintomáticos (Bhatt et al. 2013). Além disso, estima-se que 3,9 bilhões de pessoas vivam em áreas com o risco de infecção por DENV (Brady et al. 2012).

Outros arbovírus espalharam recentemente pelo mundo e causaram epidemias e surtos. O vírus Zika (ZIKV) causou diversos surtos nas Américas, incluindo o Brasil, no ano de 2015 (Basarab et al. 2016), além de estar associado a casos de microcefalia em neonatos (Mlakar et al. 2016). A febre amarela vem se expandindo, cujo vírus (YFV) chegou à China (Wilder-Smith and Leong 2017). Já o vírus da Chikungunya (CHIKV) teve uma emergência recente no leste africano e se espalhou de forma rápida para a Europa e Américas (Mayer et al. 2017). O vírus do Oeste do Nilo (WNV) segue uma expansão constante nas Américas (Gubler 2007). Por fim, o vírus Mayaro (MAYV) é apontado como um potencial causador de novas epidemias de arboviroses, já sendo encontrado na América Latina e no Caribe (Esposito and Fonseca 2017; Ganjian and Riviere-Cinnamond 2020).

Estes arbovírus que infectam humanos são frequentemente transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, com destaque para *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Ogunlade et al. 2021). Para que a transmissão ocorra, as fêmeas devem se alimentar de sangue (como fonte de proteínas para maturação de seus

ovos) de hospedeiros já infectados por um arbovírus. Este infecta os diferentes tecidos do mosquito até atingir as glândulas salivares, quando podem ser transmitidos a um novo hospedeiro via repasto sanguíneo (Consoli e Oliveira 1994).

Após o repasto e inoculação de um arbovírus, inicia-se um quadro de arbovirose, que se caracteriza por apresentar de forma geral: febre, mialgia, cefaléia, rash cutâneo, conjuntivite e em casos específicos quadros de hemorragia interna (Madewell 2020)

Poucas vacinas estão disponíveis contra arbovírus, por isso controlar os mosquitos vetores é a principal maneira de reduzir a incidência das arboviroses (Girard et al. 2020). Dito isso, o estudo da biologia destes insetos torna-se amplamente necessário para que métodos de controle sejam desenvolvidos e corretamente aplicados.

## 1.2 O mosquito *Aedes albopictus*

*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) é um mosquito originário do sudeste asiático, popularmente conhecido como “tigre asiático”. Morfológicamente este mosquito é identificado por apresentar uma coloração negra, com bandas brancas nas pernas e uma faixa longitudinal branca no escudo (Consoli e Oliveira 1994) (Figura 1).



**Figura 1:** Morfologia de fêmea de *Aedes albopictus* (adaptado de Ferreira-de-Lima et al. 2020)

Nos últimos 40 anos, *Ae. albopictus* vem aumentando sua distribuição rapidamente, estando presente em todos os continentes exceto a Antártida

(Benedict et al. 2007; Bonizzoni et al. 2013). O espalhamento deste mosquito se deu através da dispersão de ovos resistentes a dessecação por meio de atividades humanas, como o transporte de pneus e plantas ornamentais em navios comerciais (Reiter 1998; Lounibos and Kramer 2016; Bennett et al. 2019b). O rápido aumento da distribuição geográfica de *Ae. albopictus* fez com que este inseto fosse considerado uma das 100 espécies mais invasivas do mundo (GISD 2022).

Essa espécie de mosquito é também generalista e oportunista, pois alimenta-se em uma ampla gama de hospedeiros. Possui uma tendência à antropofilia, porém na ausência de fontes sanguíneas humanas pode se alimentar em diferentes espécies de mamíferos e aves (Delatte et al. 2010; Kamgang et al. 2012; Pereira dos Santos et al. 2018; Garcia-Rejon et al. 2021). Coloniza diferentes ambientes, habitando locais com alta ou média densidade de vegetação, como matas, áreas periurbanas e até parques urbanos (Maciel-De-Freitas et al. 2006; Honório et al. 2009; Heinisch et al. 2019), onde utiliza tanto recipientes naturais quanto artificiais como criadouros larvais (Honório e Lourenço-de-Oliveira 2001; Oliveira e Almeida Neto 2017; Pereira-Dos-Santos et al. 2020). Contudo, mesmo apontado originalmente como um mosquito da “borda de floresta” (Hawley 1988), *Ae. albopictus* é encontrado em áreas altamente urbanizadas, como comunidades periféricas no Brasil (Ayllón et al. 2018).

*Ae. albopictus* também sobrevive em ambientes com diferentes climas, sendo um mosquito resistente a baixas temperaturas (Delatte et al. 2009; Brady et al. 2013). Isso pode ser explicado pela ocorrência da diapausa dos ovos (Lounibos et al. 2003), um período de dormência dependente de condições ambientais (como baixas temperaturas de inverno). Assim, fêmeas adultas de *Ae. albopictus* de locais mais frios ovipõem ovos maiores, com maior quantidade de lipídios e mais resistentes à dessecação. Os embriões entram em estado de dormência e redução do metabolismo até que as condições ambientais estejam favoráveis para prosseguir com o desenvolvimento (Hanson e Craig Jnr 1994; Reynolds et al. 2012; Medley et al. 2019).

Essa espécie, *Ae. albopictus*, também é considerada um competidor superior a outra espécie de importância médica, *Ae. aegypti*, quando estão

dividindo o mesmo criadouro larvar em campo (Juliano 1998). Com a entrada do mosquito, tigre asiático, no território dos Estados Unidos da América (EUA), esta vantagem competitiva resultou em um declínio nas populações de *Ae. aegypti* em diversos locais, que foram substituídas quase que totalmente por *Ae. albopictus* (Hornby et al. 1994; O'Meara et al. 1995). O mecanismo utilizado para esta vantagem competitiva ainda não está muito claro. Porém, resultados de uma meta análise apontam para a capacidade de *Ae. albopictus* em sobreviver consumindo alimentos de baixa qualidade nutricional, o que é consistente com os resultados de estudo de campo (Juliano 2010).

Outra hipótese para explicar a vantagem competitiva de *Ae. albopictus* sobre *Ae. aegypti* seria a ocorrência da satirização, que é o cruzamento interespecífico de machos de uma espécie (*Ae. albopictus*) com fêmeas de outra espécie (*Ae. aegypti*), incapacitando-a de gerar uma prole viável e induzindo à esterilização (Tripet et al. 2011; Bargielowski e Lounibos 2016). Este fenômeno já foi observado em campo nos EUA, sendo o contrário (machos de *Ae. aegypti* copulando com fêmeas de *Ae. albopictus*) menos comum (Tripet et al. 2011; Bargielowski et al. 2015). Já no Brasil, um estudo observou que os machos de populações brasileiras não eram tão eficientes quanto os machos de populações americanas em satirizar fêmeas de *Ae. aegypti* (Honório et al. 2018a).

### **1.2.1 *Aedes albopictus* e sua importância epidemiológica global**

A capacidade vetorial de um artrópode é definida como a habilidade de uma população do vetor em transmitir um patógeno (Garrett-Jones 1964). Diferentes parâmetros estão envolvidos diretamente no cálculo da capacidade vetorial, como a sobrevivência do vetor, taxa de picada, período de incubação do patógeno no artrópode e a capacidade deste em se infectar e transmitir o patógeno, definida como competência vetorial (Kramer e Ebel 2003).

Vinte e seis arbovírus de diferentes famílias já foram isolados de *Ae. albopictus* coletados no campo, com a confirmação em laboratório da sua capacidade de transmitir ao menos 14 destes, incluindo dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) e febre amarela (YFV) (Paupy et al. 2009; Pereira-dos-Santos et al. 2020). Portanto, a plasticidade ecológica de *Ae. albopictus* (alimentação generalista, criadouros naturais e artificiais, colonização de matas

e cidades) e a sua competência para transmitir diferentes arbovírus, possibilita que este mosquito carregue patógenos entre os ambientes silvestre e urbano, atuando como um vetor-ponte (Pereira-Dos-Santos et al. 2018; Pereira-Dos-Santos et al. 2020).

No tigre asiático a disseminação de DENV ocorre pelo corpo, porém a transmissão é menos eficiente que em *Ae. aegypti* (Paupy et al. 2009; Lambrechts et al. 2010). Assim, *Ae. albopictus* é capaz de iniciar surtos de dengue em locais onde *Ae. aegypti* é ausente ou pouco abundante. Esta espécie de mosquito foi responsável, por exemplo, pelo primeiro caso autóctone de dengue na Europa (Schaffner et al. 2013) e esteve envolvido em surtos deste arbovírus na França, Itália e Espanha (La Ruche et al. 2010; Lazzarini et al. 2020; Monge et al. 2020). Além disso, é designado como vetor primário de DENV na China e no Havaí (Effler et al. 2005; Wu et al. 2010; Hasty et al. 2020).

No continente africano, *Ae. albopictus* foi identificado pela primeira vez no ano de 1989 na África do Sul (Cornel e Hunt 1991). Foi apontado como o principal vetor de CHIKV e ZIKV no Gabão em 2007 (Pagès et al. 2009; Grard et al. 2014). Além disso, uma revisão indicou o possível aumento do risco de transmissão de diferentes arbovírus endêmicos da África Central por *Ae. albopictus*, por conta de sua competência e capacidade de ocupar seus principais nichos ecológicos (Ngoagouni et al. 2015). Em países africanos com invasão recente, como Marrocos, populações de *Ae. albopictus* são competentes para a transmissão de linhagens locais de DENV, ZIKV, CHIKV e YFV (Amraoui et al. 2019).

*Ae. albopictus* foi considerado o principal vetor de CHIKV em ilhas do Oceano Índico (La Reunion, Mauritius e Madagascar), África Central e Itália (De Lamballerie et al. 2008) em 2006-2007. Análises moleculares em *Ae. albopictus* demonstraram uma mutação na glicoproteína E1 do envelope viral de CHIKV, que resultou na substituição do aminoácido alanina por valina na posição 226 (A226V). Esta modificação aumentou a eficiência de *Ae. albopictus* em transmitir este arbovírus (Tsetsarkin et al. 2007).

## 1.2.2 *Aedes albopictus* e sua importância epidemiológica no Brasil

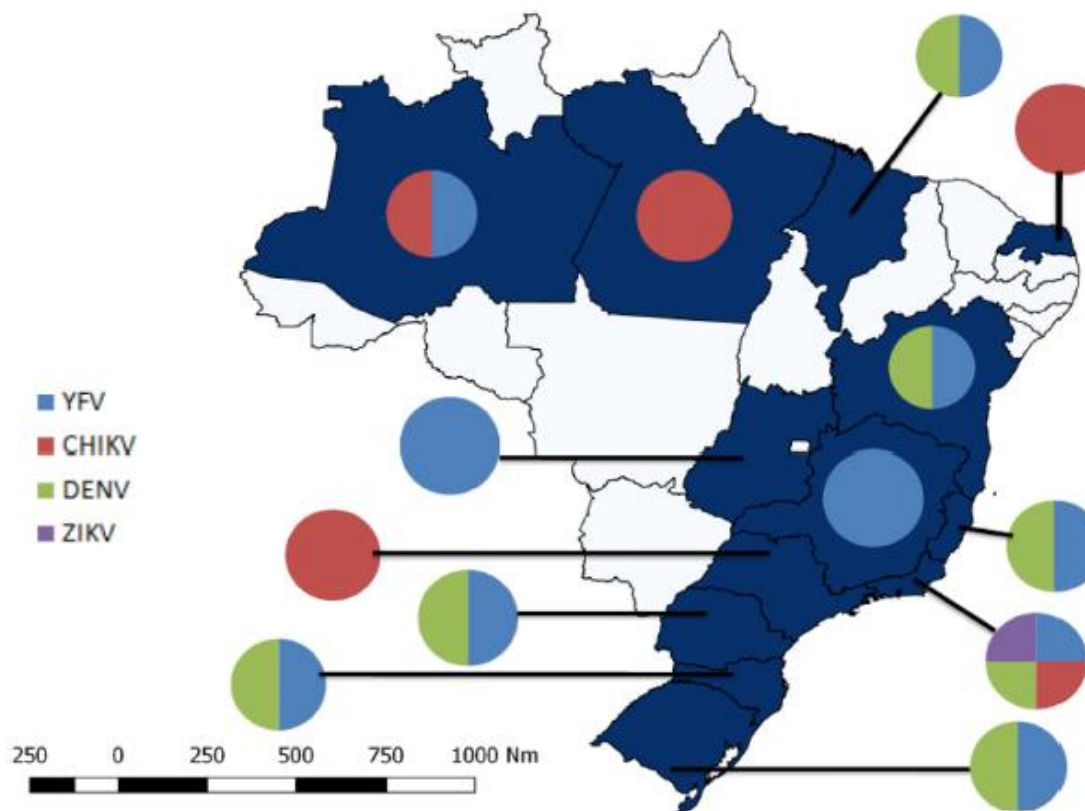
*Ae. albopictus* foi introduzido no Brasil no ano de 1986, sendo encontrado no sudeste no estado do Rio de Janeiro (Forattini 1986). Atualmente, este mosquito encontra-se presente em 26 estados do Brasil, não tendo sido encontrado apenas no Acre (Pancetti et al. 2015; Ferreira-de-Lima et al. 2020b).

Ovos, larvas e adultos de populações brasileiras de *Ae. albopictus* já foram encontrados esporadicamente naturalmente infectados com DENV, ZIKV e YFV (Serufo et al. 1993; Bezerra et al. 2016; Smartt et al. 2017; IEC 2018; Medeiros et al. 2018; Alencar et al. 2021). Em laboratório, mosquitos coletados no Brasil apresentam competência vetorial variável para transmissão de DENV, ZIKV, CHIKV, YFV e MAYV, com uma notável heterogeneidade quanto aos níveis de infecção, disseminação e presença de partículas virais na saliva dos mosquitos desafiados com estes arbovírus (DE FILIPPIS et al. 2003; Vega-Rua et al. 2014; Chouin-Carneiro et al. 2016; Couto-Lima et al. 2017; Honório et al. 2018b; Pereira et al. 2020). A partir desses dados, na Figura 2, pode-se observar um mapa indicando populações brasileiras de *Ae. albopictus* susceptíveis a estes arbovírus (Ferreira-de-Lima et al. 2020b).

Portanto, apesar de ainda não ter um papel vetorial definido no país, acredita-se que *Ae. albopictus* atue como um vetor secundário e seja capaz de manter a circulação de arbovírus em períodos inter epidêmicos (Bezerra et al. 2016; Ferreira-de-Lima et al. 2020a). Isso é possível devido à transmissão vertical de DENV e ZIKV, que já foi registrada em campo (Serufo et al. 1993; Cecílio et al. 2009; Pessanha et al. 2011; Ferreira-de-Lima e Lima-Camara 2018; Maia et al. 2019; Alencar et al. 2021), e de CHIKV, como visto em laboratório (Honório et al. 2019).

A transmissão dos arbovírus para a prole auxilia na manutenção dos arbovírus no ambiente em períodos de baixa susceptibilidade da população humana, permite a permanência destes vírus nos ovos resistentes à dessecação em períodos de seca e a sua circulação silenciosa em áreas silvestres (Ferreira-de-Lima et al. 2020a). Assim, a partir daí que pode-se iniciar surtos urbanos

(Yang et al. 2014) ou rurais de arboviroses por *Ae. albopictus* (Ricas Rezende et al. 2020).



**Figura 2:** Susceptibilidade à infecção de *Ae. albopictus* de diferentes estados brasileiros, a partir de resultados de infecção experimental por arbovírus. Legenda: Azul escuro, estados com populações de *Ae. albopictus* que demonstraram susceptibilidade à infecção; Azul claro, vermelho, verde e roxo, *Ae. albopictus* suscetíveis experimentalmente para YFV, CHIKV, DENV e ZIKV, respectivamente. (adaptado de Ferreira-de-Lima et al. 2020)

### 1.2.3 Fatores que modulam a competência vetorial de mosquitos a arbovírus

*Ae. albopictus* é um mosquito altamente invasivo, cuja erradicação se torna difícil mesmo com controle vetorial adequado e vigilância constante (Holder et al. 2010). Além disso, a resistência a inseticidas, já observada em diferentes populações, dificulta o controle químico desta espécie (Moyes et al. 2017; Auteri et al. 2018). No Brasil já foi registrada resistência para inseticidas organoclorados (Prophiro et al. 2011) e piretróides (Aguirre-Obando et al. 2017). Acredita-se que a pressão seletiva pelo uso de inseticidas contra *Ae. aegypti* selecionou populações resistentes de *Ae. albopictus* que viviam em simpatria com aquela espécie (Aguirre-Obando et al. 2017).



Diante das dificuldades para o controle de *Ae. albopictus* e sua capacidade de transmitir vários arbovírus, se faz necessária a escolha de métodos de controle alternativos e eficientes, baseados em estudos da ecologia, comportamento e outros parâmetros da vida destes vetores (Achee et al. 2019). Assim, para reduzir ou eliminar a transmissão de arbovírus é de extrema importância conhecer fatores que possam modular a competência vetorial de *Ae. albopictus*.

Dentre estes podemos citar a interação entre o genótipo do mosquito e o genótipo do arbovírus (G x G), na qual o sucesso da transmissão é frequentemente maior entre populações de mosquitos e linhagens de vírus oriundas de um mesmo local (Lambrechts et al. 2009).

Além disso, variações na competência vetorial podem também ser explicadas por fatores ambientais (Zouache et al. 2014). A temperatura é o principal fator abiótico que pode impactar diretamente nas taxas de infecção, disseminação e transmissão de arbovírus ou em seu período de incubação extrínseco (o tempo necessário para que o patógeno seja adquirido, se desenvolva e possa ser transmitido pelo vetor através da picada). Estudos com *Ae. albopictus* apontaram um aumento nas taxas de transmissão de ZIKV e DENV em maiores temperaturas (Liu et al. 2017; Chouin-Carneiro et al. 2020b), enquanto que para YFV foi observado um aumento da infectividade em mosquitos mantidos em 18°C comparado àqueles mantidos a 28°C (Adelman et al. 2013).

A imunidade do mosquito vetor também desempenha um papel no sucesso da disseminação de um patógeno nos tecidos do hospedeiro (Sim et al. 2014). Deste modo, diferenças na expressão de genes de imunidade podem estar correlacionadas com as diferenças na susceptibilidade *Ae. albopictus* a arbovírus (Diop et al. 2019). Recentemente, a interação com microrganismos simbiotes que colonizam os tecidos dos mosquitos, a microbiota, também se mostrou um modulador da competência vetorial aos arbovírus (Hegde et al. 2015; Yin et al. 2020).

### 1.3 Microbiota

Microrganismos (como bactérias, protozoários e leveduras) são considerados ubíquos, pois estão presentes em quase todos os locais do planeta, incluindo tecidos e órgãos de outros seres vivos. Estes microrganismos associados aos animais (vertebrados e invertebrados) e plantas são chamados de simbioses e possuem influência majoritariamente benéfica na biologia e fisiologia de seus hospedeiros. Assim, há uma teoria que defende que o hospedeiro e seus microrganismos associados (a microbiota) sejam considerados uma entidade biológica única e dinâmica, denominada “holobionte” (Zilber-Rosenberg e Rosenberg 2008).

Desta forma, o conjunto formado pelo genoma coletivo da microbiota e do hospedeiro é denominado “hologenoma” (Zilber-Rosenberg e Rosenberg 2008), entidade que seria a verdadeira unidade evolutiva. Portanto, neste novo nível de organização de um ser vivo estaria sujeito aos processos evolutivos, como a adaptação a um novo ambiente. Uma vez que o genoma de hospedeiros multicelulares complexos é conservado, ou seja, mudanças genéticas ocorrem geralmente mais devagar do que em organismos unicelulares. O holobionte responderia mais rapidamente às pressões seletivas ambientais através da seleção de mutações no genoma dos simbioses ou até mesmo via mudanças na composição da própria microbiota (Rosenberg e Zilber-Rosenberg 2018).

Exemplos da contribuição positiva dos simbioses na fisiologia de seus hospedeiros ocorrem em organismos filogeneticamente distintos na natureza. Os ruminantes possuem microrganismos fermentadores localizados em uma porção intestinal especializada, o rúmen, que degradam a celulose dos vegetais em nutrientes de alta qualidade para seus hospedeiros (Liu et al. 2021). Bactérias e algas simbioses de coral auxiliam na tolerância de seus hospedeiros ao aumento de temperatura dos oceanos (Avila-Magaña et al. 2021). Já as leguminosas possuem bactérias simbioses em suas raízes, em estruturas denominadas nódulos, que realizam a fixação de nitrogênio, nutriente essencial às plantas hospedeiras (Gage 2004).

Estima-se que o intestino humano possua  $3.8 \cdot 10^{13}$  células bacterianas, o que se equipara ao número total de células humanas de todo o corpo (Sender et al. 2016). Além de ter uma abundância expressiva, a microbiota intestinal

humana possui influência nos mais variados aspectos da fisiologia do hospedeiro, tais como absorção de nutrientes e sensação de saciedade, contribuindo para ocorrência de obesidade (Shen et al. 2013), maturação do sistema imune (Lathrop et al. 2011), angiogênese intestinal (Schirbel et al. 2013), desenvolvimento do autismo (Strati et al. 2017), além de influenciar no nível de neurotransmissores como a serotonina (O'Mahony et al. 2015).

Nesta dissertação iremos adotar as definições de microbiota e microbioma baseadas na revisão de Marchesi e Ravel 2015. Assim, a microbiota é definida como o conjunto de microrganismos de um ambiente definido, enquanto que microbioma é um termo que compreende os microrganismos e seus respectivos genomas (Marchesi e Ravel 2015).

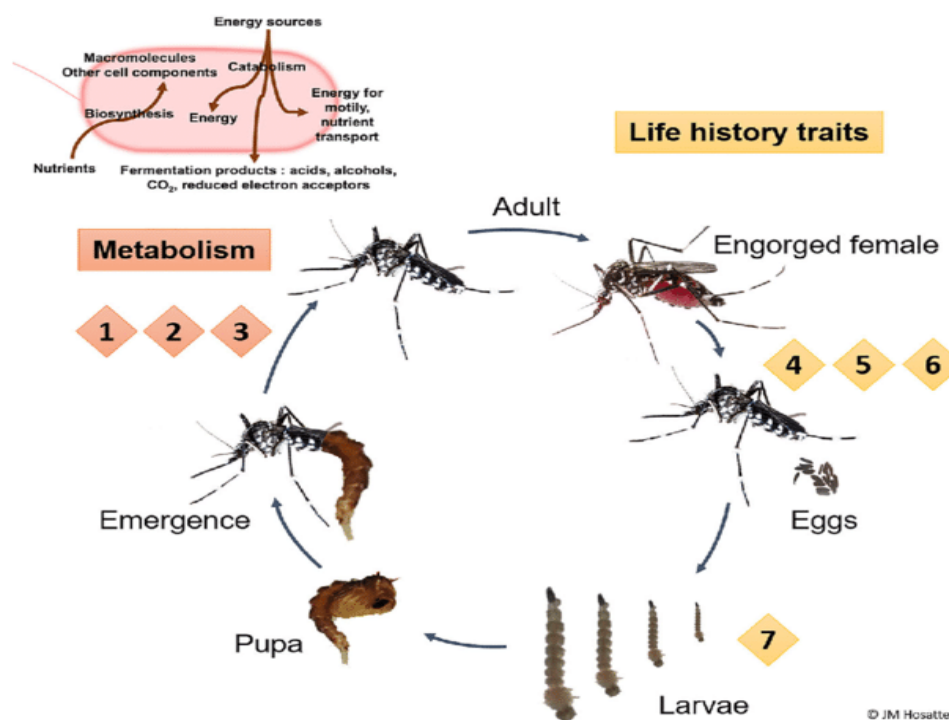
## **1.4 Microbiota de mosquitos**

Assim como em humanos, insetos possuem comunidades microbianas que ultrapassam em número o total de células de seus corpos (Dillon e Dillon 2004). A diversidade morfológica e ecológica dos insetos influencia na composição e função de sua microbiota (Engel e Moran 2013; Donaldson et al. 2016), que é formada por microrganismos obrigatórios e transientes. Estes podem ser classificados em duas categorias: endossimbiontes (intracelulares) e simbiotes extracelulares (Engel e Moran 2013). Ambos os tipos estão localizados em diferentes tecidos de seu hospedeiro, dentre eles o intestino médio, que será o foco principal deste estudo.

### **1.4.1 Impactos da microbiota na biologia dos mosquitos**

A microbiota influencia a biologia dos mosquitos de diferentes formas, contribuindo para que estes insetos completem seus ciclos de vida com sucesso, através dos impactos no desenvolvimento larvar, metabolismo, sobrevivência, oviposição, dentre outros (Figura 3) (Guégan et al. 2018b). A ausência de bactérias e seus metabólitos na água de criadouro implicam em uma queda significativa na eclosão dos ovos de *Ae. aegypti*, por exemplo (Ponnusamy et al. 2011). Já o uso de antibióticos na água de criadouro para depleção de bactérias impediu totalmente a pupação de *Ae. albopictus* (Wang et al. 2018). Ademais, intervenções antrópicas, como o uso de pesticidas e fertilizantes, perturbam a

microbiota do criadouro e, conseqüentemente, afetam eclosão dos ovos e desenvolvimento das formas imaturas (Muturi et al. 2016b, 2017a).



**Figura 3:** Impactos da microbiota em parâmetros de vida de mosquitos

1- Digestão sanguínea, 2- Digestão de açúcares, 3- Suplemento de vitaminas e aminoácidos, 4- Sobrevivência, 5- Influência na escolha do local de oviposição, 6- Produção de ovos, 7- Desenvolvimento larvar (adaptado de Guégan et al. 2018b)

Larvas axênicas (criadas sem microbiota após esterilização na superfície dos ovos e alimentação com comida esterilizada) de diferentes espécies, como *Ae. aegypti*, *Anopheles. gambiae*, *Ae. atropalpus*, *Ae. albopictus* e *Culex quinquefasciatus*, não se desenvolveram além do primeiro estágio larvar, indicando que a presença de bactérias e leveduras vivas são essenciais para o desenvolvimento destes culicídeos (Coon et al. 2014, 2016b; Díaz-Nieto et al. 2016). Contudo, posteriormente, larvas de *Ae. aegypti* axênicas foram criadas com sucesso até a fase adulta em uma dieta com extrato de fígado e levedura, porém com desenvolvimento mais lento e menor tamanho corporal dos adultos (Correa et al. 2018).

O papel destes microrganismos na nutrição dos hospedeiros foi confirmado por análises transcriptômicas que demonstraram expressão de genes ligados à aquisição/assimilação de nutrientes pelo microbioma (Vogel et al. 2017; Hyde et al. 2020). A microbiota de larvas de *Ae. aegypti*, por exemplo,

auxilia no desenvolvimento através da biossíntese de ácido fólico (vitamina B9) (Romoli et al. 2021).

Outro benefício da microbiota para insetos foi demonstrado pela colonização por *Asaia sp.* em *An. gambiae* que acarreta em aumento da expressão de genes ligados a síntese de cutícula, contribuindo para o aumento de tamanho corporal e taxa de muda de larvas (Mitraka et al. 2013). A ausência desta bactéria também provocou atraso no tempo de desenvolvimento e redução da pupação de *An. stephensi* (Chouaia et al. 2012). Já a colonização intestinal de *Ae. aegypti* por *Escherichia coli*, mutante para o gene citocromo bd oxidase (envolvido no metabolismo de respiração aeróbia), afetou negativamente o desenvolvimento larvar destes mosquitos. Observou-se que a respiração do oxigênio por bactérias, sem alterações no citocromo bd oxidase, presentes no lúmen intestinal gera uma condição de hipóxia que estabiliza fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIFs), estes ativam vias de sinalização moleculares envolvidas nos processos de crescimento e ecdise, estimulando assim o desenvolvimento das larvas (Coon et al. 2017).

A microbiota também influencia a biologia dos mosquitos adultos (Guégan et al. 2018b), contribuindo, por exemplo, para a oviposição de *Ae. aegypti*. Diversos táxons bacterianos da microbiota intestinal, como *Paenibacillus*, *Sphingobacterium* e *Comamonas*, foram correlacionados com o sucesso da oviposição em relação a grupos controle de mosquitos criados de maneira convencional. Já *Ae. atropalpus*, um mosquito autógeno facultativo (capaz de ovipor pela primeira vez sem a necessidade de um repasto sanguíneo), possui bactérias específicas em sua microbiota, como *Comamonas sp.*, que influenciam positivamente na reserva de nutrientes necessários para a produção de ovos (Coon et al. 2016a).

Bactérias intestinais são fundamentais para a digestão do sangue: *Enterobacter* e *Serratia* demonstraram atividade hemolítica *in vitro* e mosquitos tratados com antibióticos apresentaram um retardo na digestão e redução na fecundidade (Gaio et al. 2011). Porém, mosquitos *Ae. aegypti* axênicos colonizados com microrganismos ambientais também apresentaram um aumento na eficiência da digestão sanguínea (Steven et al. 2021), demonstrando que esta capacidade hemolítica está atrelada a diferentes bactérias que

colonizam o intestino médio de mosquitos. A microbiota está correlacionada com vias do metabolismo de aminoácidos, como observado em *Anopheles coluzzi*, onde mosquitos tratados com antibióticos demonstraram alterações no metabolismo de carbono e nitrogênio, com decréscimo na quantidade de aminoácidos livres disponíveis (Chabanol et al. 2020).

Bactérias simbiotes possuem o potencial de atuar como biorremediadores contra defensivos agrícolas e inseticidas, graças a sua habilidade de degradar moléculas xenobióticas (De Almeida et al. 2017; Itoh et al. 2018). Em mosquitos da espécie *Anopheles albimanus* observou-se que bactérias de sua microbiota eram capazes de metabolizar organofosfatos, piretróides, fipronil e DDT (Dada et al. 2018). Já em *Ae. aegypti* da Colômbia, populações resistentes e suscetíveis a lambda-cialotrina (piretróide) apresentaram diferenças na composição da microbiota. *Pseudomonas viridiflava*, por exemplo, uma bactéria ambiental, capaz de colonizar o intestino de mosquitos, foi associada à resistência a piretróides ao ser isolada em laboratório e foi encontrada apenas nos insetos resistentes (Selvam et al. 2013; Arévalo-Cortés et al. 2020). Em *Ae. albopictus*, insetos resistentes à deltametrina (piretróide) apresentaram uma elevada abundância relativa de *Serratia oryzae*. Este microrganismo utiliza o inseticida como fonte de carbono e induz a expressão de genes de detoxificação no hospedeiro (Wang et al. 2022).

A microbiota intestinal também parece influenciar o comportamento dos mosquitos, visto que mudanças na carga e diversidade bacteriana no intestino e órgãos reprodutivos de anofelinos, seja via tratamento com antibióticos ou transgênese, foram correlacionadas com preferências de acasalamento (Pike et al. 2017). Este fenômeno pode estar relacionado à alterações no perfil de feromônios sexuais, conforme já observado em *Drosophila melanogaster* (Sharon et al. 2010).

#### **1.4.2 Microbiota e o sistema imune dos mosquitos**

O sistema imune dos insetos possui quatro vias principais de imunidade inata: Toll, IMD, JAK-STAT e RNAi (Sim et al. 2014). Cada via é ativada por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS) reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Diferentes estudos apontam

que a microbiota pode induzir a ativação de algumas destas vias, o que pode de maneira indireta afetar a infecção por patógenos, como arbovírus e parasitos (Rodgers et al. 2017a; Caragata et al. 2019; Gabrieli et al. 2021).

*Ae. aegypti* e *Anopheles sp.* tratados com antibióticos são mais suscetíveis a vírus (como DENV e Sindbis) e *Plasmodium falciparum*, respectivamente, em comparação a insetos que possuem a microbiota inalterada. Esta suscetibilidade à infecção foi relacionada à microbiota, pela ativação de respostas imunes mediadas pelas vias Toll e IMD (Xi et al. 2008; Dong et al. 2009; Barletta et al. 2017). Acredita-se que a proliferação de bactérias simbiotes, cujos PAMPs induzem a ativação das vias imunes (Saraiva et al. 2016; Gabrieli et al. 2021), prepara o hospedeiro para lidar com infecções subsequentes por patógenos. Este tipo de mecanismo foi definido como *priming* imunológico, como foi visto para mosquitos *Anopheles sp.* em resposta a infecções por *Plasmodium sp.* (Simões e Dimopoulos 2015).

Após a alimentação sanguínea de fêmeas adultas, a microbiota intestinal se prolifera, aumentando a carga bacteriana em cerca de mil vezes (Kumar et al. 2010). Para evitar uma resposta imune crônica, frente ao aumento de PAMPs em contato com células do epitélio intestinal, são produzidas barreiras protetoras estimuladas pela proliferação bacteriana, tais como a matriz peritrófica e uma rede de ditirosina formada pelas enzimas imuno-peroxidase (ImPer) e Dual Oxidase (DUOX) (Kumar et al. 2010; Rodgers et al. 2017b; Song et al. 2018). Adicionalmente, como um mecanismo de proteção da resposta imunológica, a microbiota é capaz de fazer o uso de classes específicas de lectinas tipo C como revestimento da parede celular bacteriana, protegendo da ação de peptídeos antimicrobianos e conseqüentemente mantendo a homeostase intestinal (Pang et al. 2016).

A matriz peritrófica é uma membrana acelular, formada por quitina e glicoproteínas, que compartimentaliza a digestão sanguínea. Possui permeabilidade seletiva, além de representar a primeira linha de defesa imune e uma barreira entre a microbiota e o epitélio intestinal (Hegedus et al. 2008). Larvas de culicídeos possuem matriz peritrófica do tipo II secretada continuamente por células da cárdia. Já as fêmeas adultas apresentam a matriz

peritrófica do tipo I secretada por células intestinais após o repasto sanguíneo (Shao et al. 2001; Hegedus et al. 2008).

### 1.4.3 Microbiota e capacidade vetorial

O potencial da microbiota de mosquitos em impactar a capacidade vetorial vem sendo amplamente estudado, com destaque para efeitos na competência vetorial (Cansado-utrilla et al. 2021). Dentre estes parâmetros estão a densidade do vetor, período de incubação extrínseco, taxa de picada e sobrevivência (Garrett-Jones 1964). Além da competência vetorial que como elucidado na seção 1.2.3, se mostra heterogênea entre diferentes populações de mosquitos por conta de diversos fatores, incluindo a microbiota.

Microrganismos podem impactar na sobrevivência de mosquitos de diferentes formas. Por exemplo, bactérias entomopatogênicas, como *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis*, produzem toxinas com ação larvicida e seu uso foi uma das primeiras abordagens de controle vetorial via microrganismos (Baumann et al. 1991; Laurence et al. 2011). Contudo, casos de resistência a estas toxinas já foram notificados para algumas espécies de mosquitos (Georghiou e Wirth 1997; Paris et al. 2011; Tetreau et al. 2013; Stalinski et al. 2014), mas a exposição prolongada às toxinas de *B. thuringiensis* não selecionou indivíduos resistentes de *Ae. aegypti* (Carvalho et al. 2018).

Devido aos fenótipos de resistência, tanto para inseticidas químicos e toxinas bacterianas, surge a necessidade de investigação de outros microrganismos com potencial mosquitocida. Uma bactéria do gênero *Chromobacterium* foi isolada do intestino médio de *Ae. aegypti* e reduziu a sobrevivência tanto de larvas quanto de adultos (Ramirez et al. 2014), através da produção de compostos com ação entomopatogênica (Short et al. 2018; Caragata et al. 2020). Além disso, *Chromobacterium violaceum* isolado de *An. gambiae* foi capaz de reduzir a sobrevivência, sucesso da alimentação sanguínea e fecundidade de *An. coluzzi* resistente a inseticidas (Gnambani et al. 2020).

Diferentes espécies de mosquitos expostas a *Serratia marcescens* também sofreram redução da sobrevivência e sucesso de alimentação sanguínea (Bahia et al. 2014; Kozlova et al. 2021). Um mecanismo de ação



larvicida desta bactéria foi observado em *An. dirus* através da produção de proteases e quitinases (Jupatanakul et al. 2020). Além de bactérias, fungos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* também possuem ação mosquitocida tanto para larvas quanto para adultos de *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* e *Anopheles spp.* (Scholte et al. 2007; Farenhorst et al. 2009).

O intestino médio é o local de entrada de patógenos adquiridos via repasto sanguíneo por mosquitos vetores e onde ocorre o primeiro contato entre a microbiota e o patógeno (Jupatanakul et al. 2014). Paralelamente, este tecido também é a primeira barreira de replicação a arbovírus, onde ocorre uma redução drástica da população viral (Forrester et al. 2014; Franz et al. 2015). Os fatores que levam a esse decréscimo na quantidade de patógenos ainda vêm sendo discutidos, porém incluem a microbiota intestinal. Microrganismos simbiotes ativam o sistema imune do hospedeiro (Saraiva et al. 2016), podem competir com patógenos por receptores e nutrientes (Cirimotich et al. 2011b), além de produzir moléculas antivirais e antiparasitárias (Azambuja et al. 2005; Saraiva e Dimopoulos 2020).

Bactérias, vírus, fungos e microsporídios podem modular a competência vetorial dos mosquitos (Jupatanakul et al. 2014; Hegde et al. 2015; Caragata et al. 2019; Scolari et al. 2019; Gao et al. 2020; Huang et al. 2020; Cansado-utrilla et al. 2021). Considerando arbovírus, microrganismos podem favorecer a susceptibilidade ou a resistência à infecção do hospedeiro (Hegde et al. 2015). *Chromobacterium sp.* isolado de *Ae. aegypti*, por exemplo, secreta uma protease e uma aminopeptidase que degradam o envelope viral de DENV (Saraiva et al. 2018a), reduzindo a infecção do vetor. De forma similar, *Proteus sp.* e *Paenbacillus sp.* também reduzem a densidade de DENV quando administrados para *Ae. aegypti* via alimentação sanguínea (Ramirez et al. 2012). Em cultura de células de *Ae. albopictus*, 12 isolados bacterianos reduziram significativamente a infectividade do vírus La Crosse (Joyce et al. 2011).

Foi observado, em uma abordagem de bactérias cultiváveis de *Ae. aegypti*, que isolados de *Lysinibacillus* foram associados à redução do número de cópias de ZIKV, na cabeça e glândulas salivares dos mosquitos (do Nascimento et al. 2022). Já o fungo entomopatogênico *B. bassiana* demonstrou atividade anti-DENV em *Ae. aegypti* via ativação das vias imunológicas JAK-STAT e Toll (Dong

et al. 2012). Em anofelinos, a transmissão de *Plasmodium sp.* também pode ser desestabilizada pela ação da microbiota por indução de resposta imune, produção de romidepsina (uma molécula antiparasitária) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Cirimotich et al. 2011a; Bahia et al. 2014; Saraiva et al. 2018b; Bai et al. 2019).

Por outro lado, certos microrganismos podem favorecer a infecção de mosquitos por patógenos. Para *An. gambiae* verificou-se que o uso de antibióticos torna-os menos suscetíveis ao vírus O'nyong nyong (Carissimo et al. 2015). Em *Ae. aegypti*, *Serratia odorifera* favorece a infecção por DENV e CHIKV através da síntese do polipeptídeo P40 que se associa com a proteína de membrana proibitina, facilitando a entrada dos arbovírus nas células hospedeiras (Apte-Deshpande et al. 2012, 2014). De forma similar, *S. marcescens* favorece a infecção por DENV em *Ae. aegypti* ao degradar a camada de mucina do epitélio intestinal, através da secreção da proteína smEnhancina (Wu et al. 2019). Um fungo do gênero *Talaromyces*, isolado da microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, favorece a replicação de DENV através da inibição da ação de enzimas digestivas (Angleró-Rodríguez et al. 2017).

Além de microrganismos capazes de afetar a competência vetorial de forma inata, outros integrantes da microbiota de mosquitos podem ser modificados geneticamente para este fim. Esta estratégia alternativa se chama paratransgênese e consiste na modificação genética de simbiontes do hospedeiro para que secretem moléculas capazes de afetar negativamente o estabelecimento de patógenos nos tecidos do vetor (Wang e Jacobs-Lorena 2017). O microorganismo selecionado para utilização em abordagens de paratransgênese deve: (I) estar associado de forma estável à espécie de mosquito de interesse; (II) ser cultivável em laboratório e manipulável geneticamente; (III) não ser patogênico para humanos e outros animais e; (IV) ser capaz de expressar a molécula antipatógeno de interesse (Wilke e Marrelli 2015).

Seguindo tais preceitos, *Enterobacter cloacae* e *S. marcescens* são bactérias candidatas às aplicações de paratransgênese, estando presentes em aedinos e anofelinos (Gao et al. 2020), pois não comprometem o *fitness* dos hospedeiros (Ezemuoka et al. 2020). Nesse intuito, *Serratia*, *Pantoea* e *Asaia*

foram modificadas geneticamente para expressar proteínas anti-*Plasmodium*, tornando os mosquitos colonizados por estas bactérias refratários ao parasita (Wang et al. 2012, 2017; Bongio e Lampe 2015). Além disso, *Asaia* se espalhou rapidamente em populações de *An. stephensi* e *An. gambiae* em experimentos de gaiola e semicampo (Mancini et al. 2016). Apesar da maioria destas abordagens serem direcionadas para o combate à malária, estas bactérias são frequentemente encontradas em mosquitos do gênero *Aedes*, o que indica um potencial para expressar moléculas antivirais.

#### **1.4.4 *Wolbachia***

*Wolbachia pipientis* é um simbiote intracelular presente em ao menos 40% das espécies de artrópodes (Zug e Hammerstein 2012). Esta bactéria é geneticamente diversa e possui 18 diferentes subgrupos (A-R), dos quais A e B são mais comuns nos insetos, incluindo mosquitos (Landmann 2019). *Ae. albopictus* é naturalmente infectado (simultaneamente ou não) com duas cepas da bactéria: wAlbA (subgrupo A) e wAlbB (subgrupo B) (Sinkins et al. 1995).

A disseminação de *Wolbachia* em populações naturais de artrópodes se dá por transmissão materna. Além disso, a bactéria pode ser capaz de manipular a reprodução dos seus hospedeiros, induzindo diferentes fenótipos que facilitam seu espalhamento, como feminização, partenogênese, morte de machos e incompatibilidade citoplasmática (IC) (Werren et al. 2008). IC é o mais comum, pois ocorre em diversas ordens de insetos, incluindo Diptera (Werren et al. 2008; Landmann 2019). Consiste em uma incompatibilidade durante o processo de fertilização de um macho infectado por *Wolbachia* em uma fêmea não infectada ou infectada com uma cepa diferente da bactéria que inviabiliza a prole. Esta é causada por defeitos na condensação da cromatina paterna, que impedem a segregação das cromátides irmãs durante a primeira mitose embrionária, levando a letalidade de embriões (Serbus et al. 2008). Assim, através da IC a bactéria se espalha pela população, pois garante que fêmeas não infectadas ou com uma cepa diferente tenham uma desvantagem reprodutiva frente àquelas infectadas (Serbus et al. 2008; Werren et al. 2008).

A descoberta da IC abriu portas para utilizar *Wolbachia* como um método de controle biológico, visando à supressão populacional de mosquitos vetores

(Crawford et al. 2020; Beebe et al. 2021). Exemplos desta aplicação estão na liberação em campo de *Ae. albopictus* infectados com a cepa wPip de *Cx. Pippiens*, além de wAlbA e wAlbB. A redução populacional ocorre em função do cruzamento entre machos infectados com as três cepas com fêmeas de campo (Mains et al. 2016; Zheng et al. 2019). A infecção de *Cx. pipiens* com as cepas wAlbA e wAlbB de *Ae. albopictus* também já foi testada, com o fenótipo de IC atuando de forma bidirecional, na qual machos com wAlbB e wPip inviabilizam fêmeas selvagens e machos selvagens inviabilizam a prole de fêmeas com wAlbB e wPip. Já em mosquitos com a cepa wAlbB em cruzamentos com *Culex* selvagens de forma unidirecional envolvendo mosquitos com a cepa wAlbA, os machos com wAlbA e wPip inviabilizam fêmeas com wPip (Ant et al. 2020).

Além da manipulação reprodutiva, *Wolbachia* também é capaz bloquear/reduzir a infecção dos seus hospedeiros por vírus de RNA, como observado inicialmente em *D. melanogaster* (Hedges et al. 2008; Teixeira et al. 2008). Em *Ae. albopictus* as cepas wAlbA e B reduziram a infecção de DENV nas glândulas salivares, limitando a quantidade de partículas virais encontradas na saliva, porém não eram capazes de tornar o mosquito refratário à infecção (Mousson et al. 2012). Um experimento *in cellulo* indicou que estas cepas também impactam negativamente na infecção de CHIKV (Raquin et al. 2015).

Em geral, observa-se a refratariedade a arbovírus induzida por *Wolbachia* em transinfecções com cepas oriundas de outros hospedeiros, como já foi testado em *Ae. albopictus* com as cepas wMel e wAU de *D. melanogaster* e *Drosophila simulans*, respectivamente (Blagrove et al. 2012, 2013; Mancini et al. 2020). Além disso, tanto as cepas wAlbA quanto wAlbB demonstraram a capacidade de bloqueio de infecção por arbovírus quando transinfectadas em *Ae. aegypti* (Chouin-Carneiro et al. 2020a; Flores et al. 2020; Ahmad et al. 2021). Os mecanismos pelo qual *Wolbachia* interfere na infecção viral ainda não estão claros. Dentre alguns já explorados estão o aumento da expressão de microRNA, ativação do sistema imune basal, produção de ROS, inibição direta da replicação viral e competição por recursos como lipídios e outros metabólitos (Caragata et al. 2019).

Apesar de ser uma bactéria intracelular, *Wolbachia* interage ecologicamente com as comunidades bacterianas de *Ae. albopictus* e *Cx.*

*quinquefasciatus* (Hegde et al. 2018). Em *Ae. aegypti* com a cepa wMel, a presença do endossimbionte foi associada a diferenças na abundância de táxons bacterianos específicos da microbiota intestinal, mas sem influência na atividade antiviral de *Wolbachia* (Audsley et al. 2017, 2018). Igualmente, em *An. stephensi* e *An. coluzzi*, com as cepas wAlbB e wAnga, respectivamente, a presença de *Wolbachia* casou pouco impacto na composição da microbiota (Chen et al. 2016; Straub et al. 2020).

Em contrapartida, *Wolbachia* apresentou relação de co-exclusão com bactérias da microbiota intestinal de *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus*, tais como: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Asaia*, *Chryseobacterium* e *Serratia* (Hegde et al. 2018). Este fenômeno também ocorre no tecido reprodutivo, local de maior concentração de *Wolbachia*, onde o microbioma de *An. gambiae* interferiu na transmissão vertical da cepa wAlbB (Hughes et al. 2014a). Portanto, tornam-se imprescindíveis estudos que analisem a microbiota de mosquitos, que levem em conta também a interação entre simbioss, além das relações com o hospedeiro (Brinker et al. 2019).

#### **1.4.5 Vias de aquisição da microbiota**

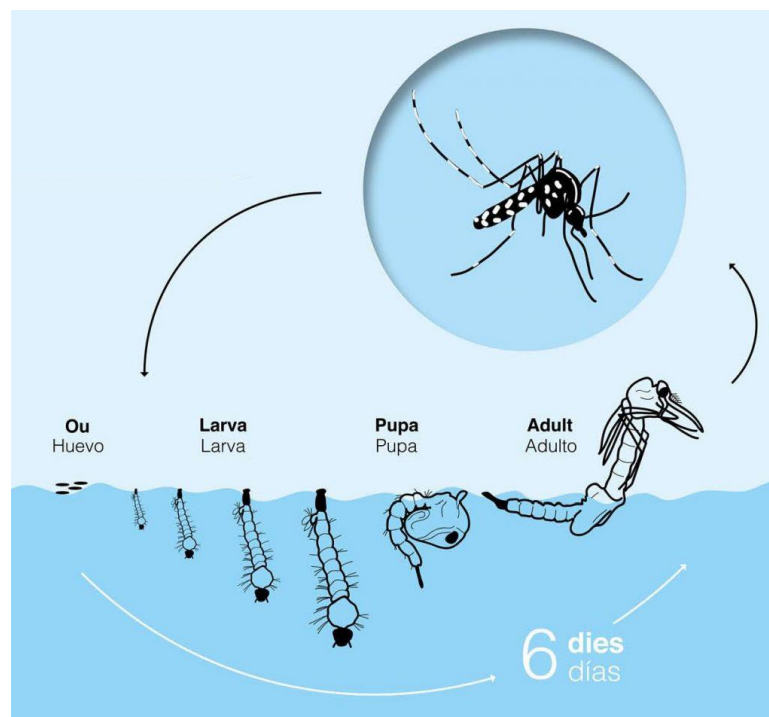
Mosquitos apresentam principalmente duas vias de aquisição de seus simbioss, vertical (mãe/pai para prole) e horizontal (ambiente para o hospedeiro ou entre hospedeiros) (Strand 2018; Vogel e Coon 2020). Em relação a transmissão vertical, bactérias como *Asaia sp.* (extracelular) e *Wolbachia* (intracelular) apresentam este modo de transmissão, com *Asaia sp.* também sendo capaz de ser adquirida através do ambiente (Favia et al. 2007). Para *Asaia sp.*, a transmissão vertical ocorre através do mecanismo de *egg smearing*, no qual a bactéria é depositada na casca dos ovos e é então ingerida pelas larvas recém emergidas (Damiani et al. 2010). Para *Wolbachia*, a transmissão se dá obrigatoriamente via linhagem materna, uma vez que está presente no citoplasma dos oócitos (Kittayapong et al. 2002).

Porém, apesar da transmissão vertical de alguns simbioss, a principal fonte de aquisição de microrganismos da microbiota é de modo horizontal, através do ambiente (Minard et al. 2013a). Insetos holometábolos, como os mosquitos, passam pelo processo de metamorfose, frequentemente ocupando

diferentes habitats durante o seu ciclo de vida (Consoli e Oliveira 1994) (Figura 4). Larvas de mosquitos são aquáticas e têm a água de criadouro como principal fonte de microrganismos da microbiota intestinal (Coon et al. 2014; Scolari et al. 2021). Enquanto os adultos dominam o ambiente terrestre adquirindo microrganismos através da alimentação, que pode ser via fonte de carboidratos ou, no caso de fêmeas, adicionalmente via repastos sanguíneos em hospedeiros vertebrados (Consoli e Oliveira 1994). Assim, a alimentação de néctar como fonte açucarada é uma via de aquisição de certos microrganismos (Fridman et al. 2012; Bassene et al. 2020), enquanto a alimentação sanguínea permite o contato destes insetos com outras bactérias presentes na pele de hospedeiros (Dillon e Dillon 2004).

Além disso, formas imaturas e adultas possuem diferenças estruturais e fisiológicas no sistema digestório. Larvas possuem uma divisão baseada em cecos gástricos, intestino médio anterior e intestino médio posterior (Figura 5). Enquanto que adultos dividem seu aparato digestivo basicamente em intestino médio anterior e posterior (Dixon et al. 2017) (Figura 5), adicionalmente possuem uma estrutura onde armazenam a alimentação açucarada, denominada divertículo (Gusmão et al. 2007).

Tais diferenças refletem na composição da microbiota intestinal de larvas e adultos. Um estudo comparando larvas de *An. coluzzi* e *An. gambiae* demonstrou que a composição bacteriana do intestino de larvas é dominada pelo filo Firmicutes, mas na fase adulta a abundância deste filo decresce expressivamente, com o intestino médio sendo dominado por cerca de 90% pelo filo Proteobacteria (Gimonneau et al. 2014).

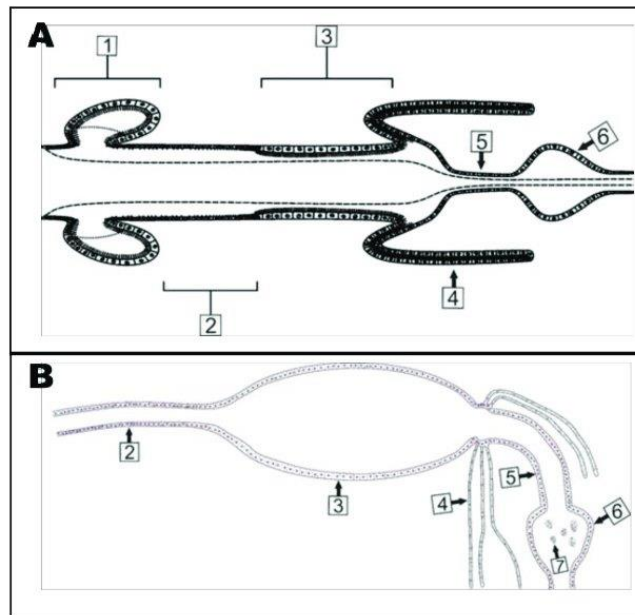


**Figura 4:** Ciclo de vida holometábolo de *Aedes albopictus*: Ovo – 4 estágios larvais – Pupa – Adulto.

**Fonte:** (<http://www.mosquitoalert.com/en/info-mosquitoes/biology/>).

O processo de metamorfose para a fase adulta gera impactos significativos para a microbiota intestinal dos mosquitos, visto que há um remodelamento geral do tubo digestório. Os adultos recém-emergidos eliminam a membrana peritrófica meconial e o mecônio, o que resulta em uma esterilização quase completa do intestino (Moll et al. 2001). Contudo, algumas bactérias são transmitidas de maneira transtadial, ou seja, das formas imaturas para as formas adultas (Coon et al. 2014; Duguma et al. 2015; Chen et al. 2020). Os mecanismos deste tipo de transmissão ainda vêm sendo discutidos, mas uma hipótese é de que ocorra o “sequestro” de bactérias nos túbulos de Malpighi (Chavshin et al. 2015). Mosquitos recém emergidos também podem adquirir a microbiota larvar através da ingestão da água de criadouro (Lindh et al. 2008a).

Por fim, a transmissão venérea (sexual) de bactérias da microbiota já foi observada em mosquitos para *Asaia* sp. e a cepa AS1 de *Serratia*, que colonizam o trato reprodutivo tanto de machos quanto de fêmeas (Damiani et al. 2008; Wang et al. 2017). Em ambos os estudos verificou-se que estas bactérias eram passadas de machos para fêmeas, já que colonizam as gônadas masculinas, se espalhando pelas populações de *An. stephensi* em laboratório (Damiani et al. 2008; Wang et al. 2017)



**Figura 5:** Anatomia do trato digestório de larva e adulto de mosquito. **(A)** O canal alimentar larvar é composto pelo intestino anterior e cárdia (não mostrado), ceco gástrico **(1)**, intestino médio anterior **(2)**, intestino médio posterior **(3)**, intestino médio **(4)**, íleo **(5)** e reto **(6)** (adaptado de [5]); **(B)** O canal alimentar adulto é composto pelo intestino médio anterior **(2)**, intestino médio posterior **(3)**, intestino médio **(4)**, íleo **(5)**, reto **(6)** e papilas retais **(7)** (Adaptado de Dixon et al. 2017).

### 1.4.6 Fatores que modulam a composição e diversidade da microbiota de mosquitos

É notória a contribuição da microbiota para diferentes aspectos da biologia dos mosquitos, porém esta é variável mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Osei-Poku et al. 2012). Assim, alguns estudos buscaram elucidar os fatores que podem afetar a diversidade e composição da comunidade de microrganismos associada a estes insetos (Minard et al. 2013a; Guégan et al. 2018b).

A microbiota varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do hospedeiro e tecido em questão (Gimonneau et al. 2014; Tchioffo et al. 2016; Mancini et al. 2018; Alfano et al. 2019). De forma geral, observa-se uma maior diversidade e densidade bacteriana associada as larvas do que em relação aos adultos (Wang et al. 2018; Bennett et al. 2019a; Birnberg et al. 2021; Scolari et al. 2021). Órgãos reprodutivos como ovários e testículos possuem uma diversidade maior em relação as glândulas salivares e o intestino médio, como observado em diferentes espécies de *Anopheles sp.*, porém em *Ae. albopictus* o



intestino foi considerado o tecido com maior riqueza e diversidade (Mancini et al. 2018).

Fatores intrínsecos e extrínsecos aos hospedeiros possuem correlação com a diversidade e riqueza da microbiota intestinal de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Anopheles sp.* adultos (Quadro 1). Dentre os fatores intrínsecos, o status nutricional do mosquito afeta a diversidade da microbiota, possivelmente porque a disponibilidade de nutrientes de acordo com a fonte alimentar (carboidrato ou sangue) favorece bactérias específicas. A alimentação sanguínea das fêmeas parece causar um decréscimo na diversidade em relação a fêmeas alimentadas com açúcar (Wang et al. 2011; Chen et al. 2020). Porém, o contrário foi observado em *Ae. aegypti*, o que demonstra a necessidade de se levar em consideração o tipo de hospedeiro, a espécie do vetor e a quantidade de dias pós-repasto sanguíneo para a análise da microbiota (Muturi et al. 2021).

O sexo impacta na diversidade da microbiota de acordo com diferenças na ecologia e fisiologia entre machos e fêmeas de mosquitos (Minard et al. 2013a). Machos tendem a dispersar menos que fêmeas e ficam mais associados ao criadouro (Foster 1995), restringindo o contato com novas fontes de microrganismos. A dieta de fêmeas inclui a alimentação sanguínea, não realizada por machos (Consoli e Oliveira 1994), o que causa uma pressão seletiva para certas bactérias. Além disso, a matriz peritrófica é produzida apenas pelas fêmeas em resposta a digestão sanguínea, não havendo uma compartimentalização dos processos digestivos em machos (Hegedus et al. 2008), tornando assim o ambiente intestinal diferente entre os dois sexos.

Em relação a idade, mosquitos mais velhos mantidos em uma dieta exclusiva de açúcar apresentaram diferenças na microbiota intestinal em relação aos insetos jovens, com o aumento de táxons bacterianos correlacionados à metabolização desse tipo de alimento (David et al. 2016).

Variações na microbiota de mosquitos também podem estar associadas ao perfil genético de diferentes populações, com mudanças na ativação de determinados genes, selecionando táxons e assim remodelando a diversidade do microbioma (Stathopoulos et al. 2014). Cepas geneticamente diferentes de *Ae. aegypti*, tiveram variações na microbiota intestinal correlacionadas com

diferenças na transcrição de genes ligados a cadeia de transporte de aminoácidos (Short et al. 2017).

Interações entre microrganismos também podem modular a presença e ausência de certos táxons. Diferentes gêneros bacterianos, da microbiota intestinal de mosquitos, interagem de diferentes maneiras. Observando as associações entre táxons da microbiota de *Ae. albopictus*, verificou-se que uma mesma bactéria pode estabelecer correlações positivas e negativas dentro da comunidade bacteriana intestinal; *Asaia sp.* associou positivamente com *Serratia* e negativamente com *Chryseobacterium*, por exemplo (Hegde et al. 2018). Para *Ae. aegypti*, demonstrou-se uma relação de amensalismo, em que *Serratia* criava uma zona inibitória para o crescimento de *Sphingomonas* (Terenius et al. 2012).

A exposição a inseticidas exerce uma pressão seletiva a favor de bactérias capazes de metabolizar estes compostos químicos (Dada et al. 2019). Estudos apontam que o mecanismo utilizado para degradar xenobióticos por bactérias de mosquitos é pela ação de enzimas detoxificantes, como esterases, citocromo P450 monoxigenase e glutathione s-transferase (Scates et al. 2019; Wang et al. 2022). Populações de mosquitos também apresentam diferenças na composição da microbiota de acordo com o status de resistência a inseticidas, como foi observado para *Ae. aegypti* e *An. albimanus* (Dada et al. 2018; Arévalo-Cortés et al. 2020).

Fatores extrínsecos que modulam a diversidade microbiana de mosquitos adultos são ligados ao ambiente, tais como o hábitat e variáveis climáticas (Dada et al. 2021b). O aumento de temperatura favorece a presença de bactérias tolerantes ao calor, como foi observado favorecendo *Bacillus* em *Ae. aegypti* (Onyango et al. 2020). Mudanças sazonais também podem alterar a diversidade de microrganismos no ambiente, com reflexo no perfil de bactérias em mosquitos analisados em diferentes momentos no tempo, principalmente considerando bactérias adquiridas a partir do ambiente (Wang et al. 2018).

O hábitat e a paisagem, definida como a entidade visual observada a partir de uma escala, que leva em conta os elementos que compreendem o hábitat da espécie a ser analisada (Metzger 2001), contribuem significativamente para a variabilidade intraespecífica da microbiota, pois diferentes perfis de diversidade

bacteriana são descritos de acordo com a localidade de coleta (Osei-Poku et al. 2012; Muturi et al. 2018). Observou-se uma distinção na riqueza de famílias bacterianas entre ambientes urbanos e rurais da África para *An. coluzzi* e *An. gambiae* (Akorli et al. 2016) e diferenças na diversidade da microbiota de *Ae. albopictus* mosquitos coletados em uma fazenda, um parque, um condomínio e uma floresta da Malásia (Lee et al. 2020). A colonização em laboratório também é outro fator que impacta a composição da microbiota, com frequente declínio da diversidade (Boissière et al. 2012; Coon et al. 2016b; Hegde et al. 2018).

**Quadro 1:** Fatores que influenciam na composição e diversidade da microbiota de mosquitos

| <b>Espécie Mosquito</b> | <b>Fator modulador da microbiota</b>                              | <b>Referências</b>                                                   |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <i>Ae. aegypti</i>      | Status nutricional                                                | (Muturi et al. 2021; Sarma et al. 2022)                              |
|                         | Sexo                                                              | (Mancini et al. 2018)                                                |
|                         | Idade                                                             | (David et al. 2016)                                                  |
|                         | Interações entre microrganismos                                   | (Hegde et al. 2018; Kozlova et al. 2021; Terenius et al. 2012)       |
|                         | Infecção por patógeno (ZIKV, DENV e <i>Dirofilaria immitis</i> )  | (Charan e Pawar 2013; Villegas et al. 2018; Adegoke et al. 2020)     |
|                         | Temperatura                                                       | (Onyango et al. 2020)                                                |
|                         | Status de resistência a inseticidas                               | (Arévalo-Cortés et al. 2020)                                         |
|                         | Localidade de coleta                                              | (Osei-Poku et al. 2012; Coon et al. 2016b; Thongsripong et al. 2017) |
| <i>Ae. albopictus</i>   | Status nutricional                                                | (Yadav et al. 2016; Chen et al. 2020)                                |
|                         | Sexo                                                              | (Zouache et al. 2011; Valiente Moro et al. 2013; Minard et al. 2018) |
|                         | Idade                                                             | (Chen et al. 2020)                                                   |
|                         | Interações entre microrganismos                                   | (Hegde et al. 2018; Lee et al. 2020)                                 |
|                         | Infecção por patógeno (CHIKV e <i>Ascogregarina taiwanensis</i> ) | (Zouache et al. 2012; Seabourn et al. 2020)                          |
|                         | Temperatura                                                       | (Onyango et al. 2021)                                                |
|                         | Status de resistência a inseticidas                               | (Wang et al. 2022)                                                   |
|                         | Localidade de coleta                                              | (Lee et al. 2020; Seabourn et al. 2020; Tuanudom et al. 2021)        |
| <i>Anopheles sp.</i>    | Status nutricional                                                | (Wang et al. 2011)                                                   |
|                         | Sexo                                                              | (Rani et al. 2009)                                                   |
|                         | Idade                                                             | (Singh et al. 2022)                                                  |
|                         | Infecção por patógeno ( <i>Plasmodium sp.</i> )                   | (Oliveira et al. 2020)                                               |
|                         | Status de resistência a inseticidas                               | (Dada et al. 2019)                                                   |
|                         | Localidade de coleta                                              | (Boissière et al. 2012; Osei-Poku et al. 2012; Bascuñán et al. 2018) |

## 1.5 Justificativa

O papel de *Ae. albopictus* como vetor de arbovírus segue indefinido no Brasil. Porém, diante da sua capacidade de atuar como vetor-ponte, carreando patógenos entre o ambiente silvestre e urbano, e o risco de estabelecimento de ciclos silvestres de arbovírus com a participação deste mosquito (Althouse et al. 2016; Favoretto et al. 2016; Alencar et al. 2021), faz-se necessário o estudo da biologia desta espécie. Além disso, investigar sua ecologia e capacidade vetorial pode auxiliar no desenvolvimento de futuras estratégias de controle.

Considerando que a microbiota intestinal pode impactar a infecção dos mosquitos por arbovírus (Hegde et al. 2015), variações na sua composição podem explicar ao menos parte da heterogeneidade observada na competência vetorial entre populações de vetores. Além disso, conhecer sua diversidade pode possibilitar aplicações futuras de microrganismos para mitigar a transmissão destes patógenos. Por exemplo, estudos neste sentido podem viabilizar a descoberta de táxons microbianos efetivos contra arbovírus (Saraiva et al. 2018a), o isolamento de metabólitos secundários produzidos por bactérias com ação antipatógeno ou inseticida (Saraiva e Dimopoulos 2020) e a manipulação genética de simbioses para expressar moléculas que bloqueiem o desenvolvimento viral no inseto vetor, abordagem denominada paratransgênese (Wilke e Marrelli 2015).

Outro aspecto crucial da investigação das interações hospedeiro-microbiota é entender como sua composição se estabelece. O ambiente influencia a composição e diversidade da microbiota de *Anopheles* e *Culex*, por exemplo, promovendo heterogeneidade de acordo com a localidade de coleta (Bascuñán et al. 2018) e distinção entre ambientes rurais e urbanos (Akorli et al. 2016). Neste cenário, a ação antrópica pode impactar os criadouros larvares, importante fonte de microrganismos ambientais para a microbiota dos mosquitos (Muturi et al. 2016b; Guégan et al. 2018a). Portanto, compreender a influência da paisagem no perfil da microbiota de *Ae. albopictus* é parte essencial do estudo das relações microbiota-hospedeiro.

Assim, o presente trabalho testou a hipótese de que populações naturais de *Ae. albopictus* possuem diferenças na composição e diversidade de sua microbiota intestinal de acordo com o ambiente e período em que foram

coletadas no campo ou devido à colonização em laboratório. Os diferenciais deste estudo levam em conta a utilização de mosquitos de campo, que representam maior relevância para determinar a composição autêntica da microbiota intestinal destes vetores (Romoli e Gendrin 2018). Ademais, a investigação da microbiota de populações brasileiras de *Ae. albopictus* possibilitará a comparação com estudos que utilizam populações da mesma espécie de diferentes locais do mundo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar variações na diversidade da microbiota de populações naturais de *Aedes albopictus* provenientes de locais com diferentes graus de urbanização.

### **2.2 Objetivos específicos**

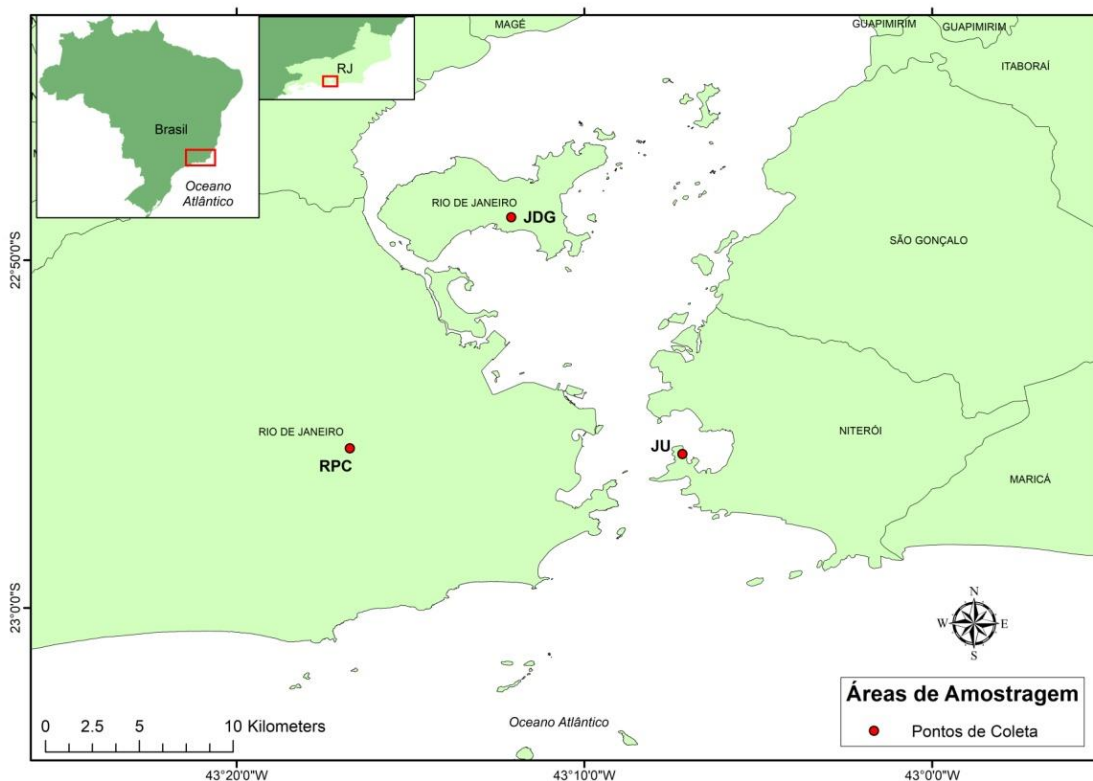
- Comparar os perfis da microbiota intestinal quanto a sua composição e variação temporal de insetos coletados em área silvestre, urbana com infraestrutura padrão e uma comunidade carente.
- Avaliar o efeito da colonização em laboratório na composição e diversidade da microbiota intestinal. Através da comparação por dissimilaridades, níveis de diversidade e riqueza de mosquitos de campo em relação aos colonizados por uma geração em laboratório e uma colônia de *Ae. albopictus* criada por mais de vinte gerações.
- Identificar táxons bacterianos que sejam pertencentes à microbiota *core* dos diferentes grupos de *Ae. albopictus*.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Coleta de mosquitos e locais de estudo

Fêmeas adultas e ovos de *Ae. albopictus* foram coletados com aspiradores costais e armadilhas ovitrampas, respectivamente, em áreas do Rio de Janeiro e Niterói, RJ, conhecidamente infestadas por esta espécie (Honório et al. 2003; de Oliveira et al. 2017). Estes locais foram escolhidos por possuírem distintas paisagens, cuja distância linear varia de 16,5 a 20km (Figura 6):

- Represa dos Ciganos (RPC), Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ (22°55'S,43°18'O), localizada na borda de uma das maiores florestas urbanas do mundo, a Floresta da Tijuca. Possui densa vegetação, temperaturas mais baixas e alta umidade em relação às áreas urbanas. As fontes sanguíneas para mosquitos hematófagos são geralmente animais de pequeno porte e pessoas que transitam esporadicamente na área.
- Jardim Guanabara (JDG), Rio de Janeiro, RJ (22°48'S,43°12'O), bairro urbano padrão de classe média composto majoritariamente por casas e arborizado, presença de diversas praças e bosques com vegetação abundante. A proximidade das casas com áreas arborizadas e a capacidade de dispersão de *Ae. albopictus* de 300 metros em média (Pereira dos Santos et al. 2018) possibilitam que este mosquito seja encontrado nas residências do bairro.
- Jurujuba (JU), Niterói, RJ (22°55'S,43°06'O), é uma comunidade com alta densidade humana e abastecimento de água e coleta de lixo irregulares. Vegetação muito próxima as casas, além de maior abundância de criadouros artificiais colonizados por *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*.



**Figura 6:** Mapa de parte da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro mostrando os locais de coleta de mosquitos *Aedes albopictus*. Mapa feito com programa ArcGIS

As coletas de mosquitos adultos foram realizadas no ano de 2019 em 10-15 pontos por 15-20 minutos cada, compreendendo as estações chuvosa (fevereiro 2019/1) e seca (julho - agosto 2019/2). Além das coletas por aspiração, ovos foram obtidos através da instalação de 30 armadilhas ovitrampas (Fay e Eliason 1966) em cada local de coleta nas duas estações.

Mosquitos adultos coletados por aspiração foram levados ao laboratório em gaiolas, identificados taxonomicamente segundo Consoli e Oliveira (1994) e as fêmeas anestesiadas em gelo para dissecação do intestino. Paralelamente colônias de *Ae. albopictus* foram estabelecidas em laboratório a partir dos ovos obtidos através das ovitrampas, obedecendo-se um mínimo inicial de 500 larvas por área amostrada. As palhetas das ovitrampas foram levadas para laboratório, onde tiveram os ovos viáveis contados na lupa.

As palhetas foram submergidas em bacias contendo 3L de água e 265 mg de levedo para eclosão dos ovos. Larvas emergidas foram alimentadas diariamente com 0,45g de Tetramim® (Tetra, Alemanha). Ao atingirem o estágio de pupa, os mosquitos de cada bacia foram transferidos para gaiolas segundo a

área de origem. Após a identificação taxonômica, mosquitos *Ae. albopictus* foram alimentados *ad libitum* com solução 10% de glicose e em camundongos anestesiados uma vez por semana para obtenção de ovos da geração F1 (CEUA:LW-32/14).

Os mosquitos da geração F1 foram criados, mantidos em insetário a  $27 \pm 2$  °C e  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e alimentados *ad libitum* com solução 10% de glicose. Uma colônia de *Ae. albopictus* estabelecida a partir de insetos oriundos do Rio de Janeiro, mantida há mais de 10 anos no insetário do Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (LATHEMA), foi mantida no mesmo local e condições descritas acima no período de dezembro - 2020 e incluída nas análises da microbiota como um grupo controle de mosquitos criados em laboratório há muitas gerações.

Posteriormente às coletas e processamento dos mosquitos, os valores médios de temperatura e pluviosidade referente aos períodos das coletas foram adquiridos através do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Foram obtidas tabelas de condições climáticas registradas pelas estações de Jacarepaguá e Niterói, no intervalo das datas referentes às coletas. Com a média sendo calculada para as colunas de “Temperatura instantânea” e “Chuva” (INMET 2022).

### **3.2 Processamento de intestinos e extração de DNA**

Para determinar a diversidade bacteriana da microbiota de *Ae. albopictus*, foram analisados intestinos de fêmeas adultas vivas coletadas nas três localidades de campo em duas estações (2019/1 e 2019/2), criadas em laboratório a partir de ovos provindos do campo (geração F1 de 2019/2) e da colônia LATHEMA (2020/2), totalizando dez grupos de mosquitos (Quadro 2). Os grupos criados em laboratório (F1 e colônia LATHEMA) foram processados com 6-7 dias de vida.



**Quadro 2:** Grupos utilizados para análise da microbiota intestinal de *Aedes albopictus*, separados de acordo com sua população, origem, período de coleta e geração

| Grupo  | População           | Origem      | Período da coleta | Geração |
|--------|---------------------|-------------|-------------------|---------|
| JDG    | Jardim Guanabara    | Campo       | 2019-1            | F0      |
| JU     | Jurujuba            | Campo       | 2019-1            | F0      |
| RPC    | Represa dos ciganos | Campo       | 2019-1            | F0      |
| JDG    | Jardim Guanabara    | Campo       | 2019-2            | F0      |
| JU     | Jurujuba            | Campo       | 2019-2            | F0      |
| RPC    | Represa dos ciganos | Campo       | 2019-2            | F0      |
| JDG-F1 | Jardim Guanabara    | Laboratório | 2019-2            | F1      |
| JU-F1  | Jurujuba            | Laboratório | 2019-2            | F1      |
| RPC-F1 | Represa dos ciganos | Laboratório | 2019-2            | F1      |
| LAB    | Colônia LATHEMA     | Laboratório | 2020-2*           | >F20**  |

\*Referente ao período de criação em colônia dos mosquitos do grupo LAB

\*\* Estimamos acima de 20 gerações por obtermos a informação de que esta população se encontra sendo criado em insetário há cerca de 10 anos

Os insetos foram processados de forma individual, anestesiados em gelo e tiveram a superfície corporal esterilizada em etanol 70% por 1 minuto, seguida de três lavagens em PBS 1x estéril e uma última lavagem em um microtubo contendo 200µL de PBS 1x. Deste microtubo, 100µL de PBS foram plaqueados em meio Luria-Bertani (LB) como um controle negativo da metodologia de esterilização. Os meios foram incubados em temperatura ambiente por 48h para verificar se haveria crescimento de microrganismos provenientes da superfície corporal dos mosquitos dissecados, o que não ocorreu.

Os intestinos foram dissecados com o auxílio de um microscópio estereoscópio (Zeiss), em lâminas contendo uma gota de PBS 1x (8µL) e com o uso de pinças esterilizadas com etanol 70% e PBS estéril 1x. Antes da remoção dos intestinos verificou-se visualmente a presença de sangue no intestino de cada mosquito e apenas insetos sem sangue aparente foram utilizados. Os intestinos médios foram removidos e armazenados individualmente em

microtubos contendo 200µL de PBS 1x estéril, armazenados em seguida a -20°C.

A extração de DNA foi realizada utilizando o DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) em uma cabine de segurança biológica (Trox®, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. O protocolo para extração de DNA de bactérias Gram-positivas foi utilizado com pequenas modificações. Em suma, adicionou-se 20µL de proteinase K e 180µL de tampão ATL, incubando as amostras *overnight* a 56°C em um banho-maria digital. Após este processo adicionou-se 180µL de uma mistura de tampão de lise enzimática com lisozima (20mg lisozima — 1000µL tampão) e as amostras foram incubadas por 1h a 37°C. Em seguida 20µL de proteinase K e 200µL de tampão AL foram adicionados, as amostras foram incubadas por 10 minutos à 1 hora a 56°C em um bloco térmico.

Durante o processo de extração foram utilizadas amostras brancas como controle negativo, estas amostras consistiam em todos os reagentes utilizados nesta etapa, com a ausência de intestinos de *Ae. albopictus*. As 94 amostras intestinais foram processadas em três rodadas, portanto três amostras brancas foram obtidas. Por fim, duas alíquotas de 20µL e 15µL referentes a duas eluições do DNA a partir da coluna de sílica do kit foram armazenadas em -30°C.

### **3.3 Amplificação de DNA, preparação de bibliotecas e sequenciamento em Illumina Miseq**

As regiões variáveis V3-V4 do gene ribossomal bacteriano 16S rRNA foram amplificadas através de PCR com iniciadores específicos 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) e 805R (GACTACHVGGGTATCTAATC) (Klindworth et al. 2013), contendo adaptadores para o sequenciamento (TCGTCCGCGAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG e GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG), seguindo o protocolo de preparação de biblioteca de 16S da Illumina (Illumina 2013).

Uma vez que intestinos individualizados possuem baixa quantidade de material biológico, este protocolo passou por modificações, aumentando-se o volume de DNA por reação de 5µL para 10.5µL(1ng) de DNA, 1µL(10mM) de 341F, 1µL(10mM) de 805R e um aumento de mais 10 ciclos nas condições de

ciclagem das amostras. Além das condições modificadas utilizou-se 12.5 µL de 2 × KAPA HiFi HotStart PCR mix (Roche, Switzerland) e uma amostra com adição de 10.5µL de água livre de DNA em vez de DNA intestinal, para ser usada como controle negativo da PCR. A amplificação ocorreu em um termociclador Veritti (Applied Biosystems) com as seguintes condições: 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Após a amplificação três amostras escolhidas aleatoriamente e o controle negativo da PCR foram visualizados por eletroforese em um gel de agarose (1%) para verificar a eficiência do processo de amplificação e a ausência de contaminação.

Os produtos obtidos pela PCR foram encaminhados para a Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho do IOC (Fiocruz) em microplacas de 96 poços. Em suma, 96 amostras, compreendendo 94 amostras descritas na Tabela 1 e dois controles negativos que foram preparados para o sequenciamento. Os controles negativos foram preparados no formato de *pools*, correspondendo a um composto por amostras brancas do processo de extração de DNA (*pool* de três rodadas de extração) e outro referente aos controles negativos da PCR (*pool* de duas rodadas de amplificação).

As amostras encaminhadas foram extraídas e amplificadas misturando-se os grupos. Tal método foi aplicado para evitar o efeito de lote em possíveis contaminações (Eisenhofer et al. 2019).

**Tabela 1:** Quantidade de amostras por grupo de mosquito que prosseguiram para o sequenciamento.

| Grupo        | Período   |           |           | Total     |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|              | 2019/1    | 2019/2    | 2020/2    |           |
| RPC          | 10        | 10        | -         | 20        |
| JU           | 10        | 10        | -         | 20        |
| JDG          | 10        | 10        | -         | 20        |
| RPC-F1       | -         | 8         | -         | 8         |
| JU-F1        | -         | 8         | -         | 8         |
| JDG-F1       | -         | 8         | -         | 8         |
| LAB          | -         | -         | 10        | 10        |
| <b>Total</b> | <b>30</b> | <b>54</b> | <b>10</b> | <b>94</b> |

As amostras foram purificadas com a adição de 20µL de AMPure XP *beads*, seguida de incubação em temperatura ambiente por 5 minutos e descarte do sobrenadante. Em sequência foram realizadas duas lavagens adicionando-se

200µL de etanol 80% por duas vezes, com incubações de 30 segundos entre as duas rodadas e descarte de sobrenadante. Após secagem por 10 minutos adicionou-se 52.5µL de tampão Tris (10mM) e as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos, até que 50µL foram transferidos para outras microplacas de 96 poços para a execução de uma nova rodada de amplificação.

Uma segunda PCR foi realizada para anexar indexadores usando o kit Nextera® XT. Os reagentes utilizados por amostra foram 25µL de 2 × KAPA HiFi HotStart PCR mix (Roche, Switzerland), 5µL de Index N7, 5µL de Index S5, 5µL de água livre de DNA e 10µL de DNA das amostras pré-purificadas. As condições de ciclagem foram as mesmas definidas para a primeira PCR, porém com 12 ciclos. Após a amplificação as amostras passaram por mais uma rodada de purificação com *beads* magnéticas, com o uso de 56µL de AMPure XP *beads*, adição de 27,5µL de tampão Tris (10mM) e transferência para uma nova microplaca de 96 poços de 25µL por amostra purificada.

As amostras foram quantificadas com Qubit® 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA), utilizando Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit, para aquelas com DNA acima de 60 ng/µL utilizou-se Qubit® dsDNA BR (Broad-Range) Assay Kit para se obter a quantificação exata. A concentração de DNA foi ajustada para 2mM através de diluição com água livre de nucleases.

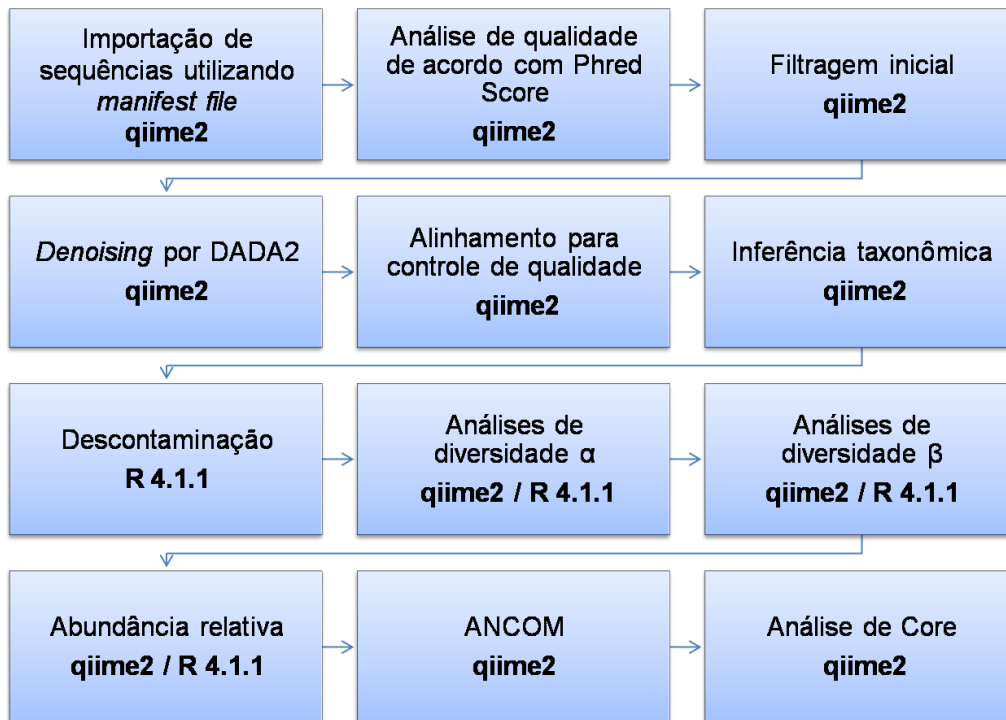
Para preparação da biblioteca, as amostras foram agrupadas em um único tubo, retirando-se 2µL das 96 amostras já com a concentração de DNA normalizada. Para confirmação da qualidade da biblioteca, o *pool* de amostras foi submetido a uma corrida de eletroforese automatizada no equipamento Agilent TapeStation. Observou-se como resultado um fragmento de 607pb, correspondente à região amplificada do gene 16S rRNA somado aos indexes adicionados no momento da segunda PCR.

Por fim, a biblioteca foi submetida a um processo de desnaturação antes do sequenciamento. Adicionou-se em um novo tubo 10µL de NaOH 1x e 10µL da biblioteca, seguido de incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 980µL de HT1, para a diluição da biblioteca de mM para pM. Foi descartado 200µL da mistura e 200µL de Phix (20%) foram adicionados. Um novo tubo foi utilizado, recebendo 240µL da amostra com Phix (20%) e

360µL de HT1, sendo incubado por 2 minutos a 96°C em um *heat block*, seguido de resfriamento em gelo por 5 minutos. O tubo então prosseguiu para o sequenciamento *paired-end* 2x250pb, que consiste no fragmento sendo sequenciado nos dois sentidos (3' para 5' e 5' para 3'), possibilitando uma maior confiança para a inferência dos nucleotídeos que formarão as sequências a serem obtidas. Este foi realizado em Illumina Miseq utilizando o kit MiSeq®v2 Reagent 500 ciclos (Illumina Inc, San Diego, CA, USA).

### **3.4 Análises de bioinformática e estatística acerca da diversidade bacteriana intestinal de *Ae. albopictus***

As sequências obtidas tiveram seus iniciadores e indexadores removidos pelo processo de *demultiplex*, através do programa *BaseSpace Sequence Hub* (Illumina 2017), gerando múltiplos arquivos fastq com as sequências identificadas pela sua amostra de origem. As sequências foram analisadas usando o programa QIIME2 (versão 2021.4) (Bolyen et al. 2019). As sequências *paired-end* demultiplexadas foram importadas no ambiente de análise (*qiime2*) através de um *manifest file*, arquivo de entrada em *qiime2*, seguindo o tutorial “*Moving Pictures*” (Caporaso et al. 2010). Abaixo, segue um fluxograma com os principais passos da etapa de análise de dados (Figura 7).



**Figura 7:** Fluxograma com os principais passos da análise dos dados obtidos pelo sequenciamento

As sequências foram visualizadas para verificação de qualidade através de um gráfico interativo gerado pelo comando *qiime demux summarize*. Foi estabelecido como padrão de qualidade um *Phred score* >25 para cada posição das sequências *forward* e *reverse*, a partir deste parâmetro iniciou-se os processos de filtragem.

Para a manutenção de sequências que correspondessem apenas a bactérias da microbiota, resquícios de iniciadores, adaptadores e sequências defeituosas foram removidos com a ferramenta *cutadapt* (Martin 2011). Os dados brutos foram inspecionados novamente quanto a sua qualidade seguindo a mesma metodologia, de visualização gráfica, citada anteriormente e a quantidade de sequências remanescentes foi aferida. Tais sequências foram direcionadas para mais uma etapa de filtragem (ou *denoising* - eliminação de ruído) pelo programa DADA2 (Callahan et al. 2016).

A etapa de *denoising* realizou mais um controle de qualidade e utilizou as sequências para obter ASVs (*amplicon sequence variants*). Estas são unidades de observação, baseadas em sequências que se diferenciam em no máximo um nucleotídeo na região do gene 16S rRNA (Callahan et al. 2017). Esta etapa de filtragem consistiu na remoção de quimeras, desreplcação para condensação dos dados, combinando todas as leituras de sequenciamento idênticas em

“sequências únicas” com uma “abundância” correspondente igual ao número de leituras com a sequência única referente e ajuste do *score* de qualidade (*Phred*) das sequências de DNA através de cortes nas extremidades 3’ e 5’.

Finalizada a etapa de *denoising*, foram gerados uma tabela de ASVs por amostra e um arquivo contendo todas as sequências de DNA com o tamanho final de 120. Estes foram submetidos a mais uma etapa de filtragem, na qual apenas sequências que se alinharam com o banco de dados de 16S rDNA bacteriano fossem mantidas, excluindo sequências provenientes de arqueas, mitocôndrias e cloroplastos, por exemplo (Camacho et al. 2009). O alinhamento foi realizado utilizando uma porcentagem de 65% da extensão das sequências para ser comparada ao banco de dados SILVA 138 341F/805R (Quast et al. 2013). Este parâmetro foi definido com o objetivo apenas de manter sequências referentes a bactérias, para isso não foi utilizada uma porcentagem tão rigorosa.

A inferência taxonômica das ASVs filtradas foi realizada a partir de um classificador bayesiano pré-treinado a partir do banco de sequências Greengenes 13\_8 99% OTUs *full-length sequences* (McDonald et al. 2012; Bokulich et al. 2018). A partir dos resultados, buscou-se analisar mais a fundo as sequências de alguns grupos taxonômicos, como aqueles pertencentes à família Acetobacteraceae. Para tal, a inferência taxonômica também foi feita a partir de dados do GenBank por BLASTN (Camacho et al. 2009) e através do *Ribosomal data Project (RDP) classifier* (Wang et al. 2007) (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>, Release 11).

Antes de prosseguir para as análises comparativas, os dados foram ainda submetidos a um procedimento de descontaminação *in silico*, utilizando o *software* R (versão 4.1.1) e o pacote *microDecon* (McKnight et al. 2019). Para tal, foram utilizados os controles negativos da extração e da PCR como base comparativa para as outras 94 amostras. Durante o processo, foram removidas parcialmente sequências consideradas contaminação cruzada e sequências consideradas contaminantes reais (que não eram oriundos de nenhuma amostra biológica utilizada e sim contaminantes externos) (Tabela Suplementar 1).

A ferramenta *microDecon* foi selecionada por ser adequada para a execução do processo de descontaminação, de acordo com a quantidade de controles negativos disponíveis. Além disso, seu funcionamento se baseia na

remoção de sequências baseadas apenas em ASVs, não removendo os táxons por completo. Após a etapa de descontaminação, prosseguiu-se para as análises de diversidade comparativas entre os grupos do estudo utilizando 94 amostras em *qiime2*. Tais grupos foram analisados a partir da perspectiva de cada variável explicada no quadro abaixo (Quadro 3).

**Quadro 3:** Variáveis categóricas utilizadas nas análises e seus respectivos grupos de acordo com a descrição da variável

| Variável         | Descrição                                                                                                            | Grupos                                   |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>Local</b>     | Local de coleta dos mosquitos e criação em laboratório, independentemente do período                                 | JDG, JU, RPC, JDG-F1, JU-F1, RPC-F1, LAB |
| <b>Período</b>   | Período em que os insetos foram coletados, independentemente do local                                                | 2019-1, 2019-2, F1, LAB                  |
| <b>Origem</b>    | Local de criação dos mosquitos (campo ou laboratório), independentemente de sua localidade exata e período de coleta | Campo, F1, LAB                           |
| <b>População</b> | População independentemente do local de coleta/criação e período                                                     | JDG, JU, RPC, LAB                        |

Curvas de rarefação foram geradas para verificar o esforço de amostragem, uma vez que ilustram o número de ASVs segundo o número de sequências obtidas. Além disso, a partir da visualização das curvas foi possível identificar qual profundidade mínima de sequenciamento seria adequada para realizar a rarefação dos dados. Isso se deu através da escolha de um número de sequências que amostrasse a diversidade da maioria dos grupos, porém mantendo um número de amostras suficiente para as análises estatísticas que virão a seguir. Além disso, a rarefação foi utilizada para igualar o número de sequências por amostra, evitando-se qualquer tipo de viés nos resultados.

A diversidade bacteriana foi descrita a partir de medidas de diversidade- $\alpha$  (diversidade alfa), utilizando quatro métricas diferentes: ASVs observadas (riqueza), índice de Shannon (diversidade levando em consideração a riqueza e abundância), equitabilidade de Pielou (considera distribuição relativa de táxons) e diversidade filogenética de Faith (diversidade levando em consideração a



diversidade genética dos táxons presentes na amostra) (Faith 1992; Thukral 2017).

Métricas de diversidade- $\alpha$  foram comparadas entre os grupos utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal e Wallis 1952). Quando a diferença geral entre os grupos foi considerada significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), prosseguiu-se com comparações em pares utilizando o mesmo teste com a correção do  $p$ -valor pelo método de Benjamini-Hochberg (Benjamini e Hochberg 1995).

A diversidade entre as amostras foi comparada a partir da diversidade- $\beta$  (diversidade beta), utilizando as métricas: dissimilaridade de Bray-curtis (diferenças entre grupos baseadas na riqueza e abundância de táxons bacterianos) e Unifrac ponderado (diferenças entre grupos baseadas na diversidade genética e abundância dos táxons). Além disso, uma análise de coordenadas principais (PCoA) foi feita a partir dos dados obtidos pelas métricas de diversidade- $\beta$  para a comparação visual das comunidades bacterianas dos diferentes grupos. Para comparação estatística dos grupos, empregou-se o teste PERMANOVA (*Permutational multivariate analysis of variance*) (Anderson 2001), com 999 permutações.

A abundância relativa dos táxons bacterianos foi visualizada a partir de gráficos de barra empilhados. Uma vez que o gene 16S rRNA não apresenta resolução para identificação taxonômica ao nível de espécie (Scolari et al. 2019), os resultados levaram em consideração os níveis de filo, família e gênero. Os gráficos foram confeccionados com o uso do pacote qiime2rR no *software* R (versão 4.1.1), sendo plotados os dez táxons mais dominantes para o nível de filo. Para os demais níveis taxonômicos, consideraram-se os 12 táxons mais dominantes. Os táxons com uma abundância média baixa ( $< 3\%$ ) foram agrupados em “Outros”.

A análise de composição de microbiomas (ANCOM) (Mandal et al. 2015) foi empregada para identificar ASVs com abundância relativa diferencial significativa entre os grupos de amostras. Por ser um método sensível a ASVs pouco frequentes, foram removidas ASVs com menos de dez sequências e *singletons* (ASVs que ocorrem em apenas uma amostra do grupo). A análise foi realizada considerando o nível de gênero. Resultados foram visualizados em um

gráfico do tipo *Volcano* e os parâmetros estatísticos do teste *W* e o *clr* (*centered log ratio*) foram utilizados para sua interpretação.

O valor de *W* consiste no número de vezes que a hipótese nula (a abundância média de certo táxon é igual entre os grupos comparados) foi rejeitada. O *clr* representa uma estatística *F* e mede o quão diferente um grupo é da média para um táxon específico. A hipótese nula consiste em que todos os grupos analisados não possuem diferenças na abundância média de um determinado táxon. Portanto quanto menor o valor de *clr*, é mais provável que a hipótese nula não possa ser rejeitada (Lee et al. 2019).

As variáveis utilizadas para ANCOM foram: local e período. Considerou-se um táxon com uma abundância diferencial elevada quando este possuía um percentil entre grupos acima do valor 1000 ou estritamente próximo. Uma abundância diferencial moderada foi considerado um percentil entre grupos que estivesse entre 100-990, enquanto que uma abundância diferencial baixa/indetectável considerou-se um percentil entre grupos que estivesse entre 1-90.

Após os grupos serem comparados quanto à composição taxonômica, definiu-se o *core* bacteriano, que consiste em táxons que são frequentemente encontrados em diferentes populações de uma mesma espécie. Para tal, considerou-se ASVs com pelo menos 10 sequências que mostraram prevalência superior a 90% nos indivíduos, utilizando um conceito “flexível” de *core* (Segata et al. 2016; Guégan et al. 2018b).

Os resultados foram organizados a partir de tabelas, considerando o nível taxonômico de família. Observou-se o *core* entre grupos de campo (JDG, JU, RPC), de laboratório (JDG-F1, JU-F1, RPC-F1, LAB) e dentre uma mesma população: JDG (JDG-1, JDG-2, JDG-F1), JU (JU-1, JU-2, JU-F1) e RPC (RPC-1, RPC-2, RPC-F1).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano

O sequenciamento em Illumina Miseq das regiões variáveis V3-V4 do 16SrDNA gerou um total de 4.169.369 sequências, com uma média de 43.431 sequências por amostra. Após a primeira etapa de filtragem (remoção de resquícios de iniciadores, adaptadores e sequências defeituosas) foram retidas 2.939.095 sequências (70%), com uma média de 30.615 sequências por amostra (Tabela 2).

Após a submissão dos dados à etapa de *denoising*, verificou-se que a maioria das sequências na direção *reverse* apresentava qualidade abaixo do mínimo estabelecido (*Phred score* >25). Portanto, a análise dos dados prosseguiu através de uma abordagem *single-end* (utilizando apenas as sequências na direção *forward*). Estudos anteriores mostraram que esta metodologia possui resolução suficiente para identificação da diversidade de bactérias e comparações entre amostras (Caporaso et al. 2011) e já foi empregada com sucesso em trabalhos que investigaram a microbiota de mosquitos (Muturi et al. 2016a; Sharma et al. 2020). Deste modo, as sequências *forward* de 250pb foram aparadas em suas extremidades nas posições 80 (extremidade 3') e 200 (extremidade 5'), obtendo-se um tamanho final de sequência de 120 pb. Estes pontos de corte foram estabelecidos com base na literatura e buscando-se o melhor balanço entre o comprimento e a quantidade das sequências preservadas para as análises seguintes.

**Tabela 2:** Resultados brutos do sequenciamento do 16S rDNA de amostras de intestino de *Aedes albopictus* e após a remoção de resquícios de iniciadores, adaptadores e sequências defeituosas.

| <b>Nº sequências</b> | <b>Números brutos</b> | <b>Remoção de resquícios de adaptadores, iniciadores e sequências defeituosas</b> |
|----------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mínimo</b>        | 445                   | 331                                                                               |
| <b>Mediana</b>       | 29.325                | 21.013                                                                            |
| <b>Média</b>         | 43.431                | 30.615                                                                            |
| <b>Máximo</b>        | 481.809               | 346.268                                                                           |
| <b>Total</b>         | 4.169.369             | 2.939.095                                                                         |

Após a eliminação de ruído, geração de ASVs, o alinhamento e exclusão de sequências não bacterianas, foram preservadas 1.871.448 sequências (45% do total inicial), correspondentes a 1.619 ASVs (Tabela 3).

**Tabela 3:** Resultados do sequenciamento do 16S rDNA de amostras de intestino de *Aedes albopictus* após *denoising* e exclusão de sequências não-bacterianas.

| <b>Parâmetros do Sequenciamento</b> | <b>Após <i>denoising</i></b> | <b>Após exclusão de sequências não-bacterianas</b> |
|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Frequência mínima</b>            | 122                          | 120                                                |
| <b>1st quartil</b>                  | 10.206                       | 10.033                                             |
| <b>Frequência mediana</b>           | 13.799                       | 13.699                                             |
| <b>3st quartil</b>                  | 25.394                       | 24.961                                             |
| <b>Frequência máxima</b>            | 223.509                      | 221.176                                            |
| <b>Frequência média</b>             | 19.692                       | 19.494                                             |
| <b>ASVs</b>                         | 2.378                        | 1.619                                              |
| <b>Frequência total</b>             | 1.890.402                    | 1.871.448                                          |

## 4.2 Descontaminação

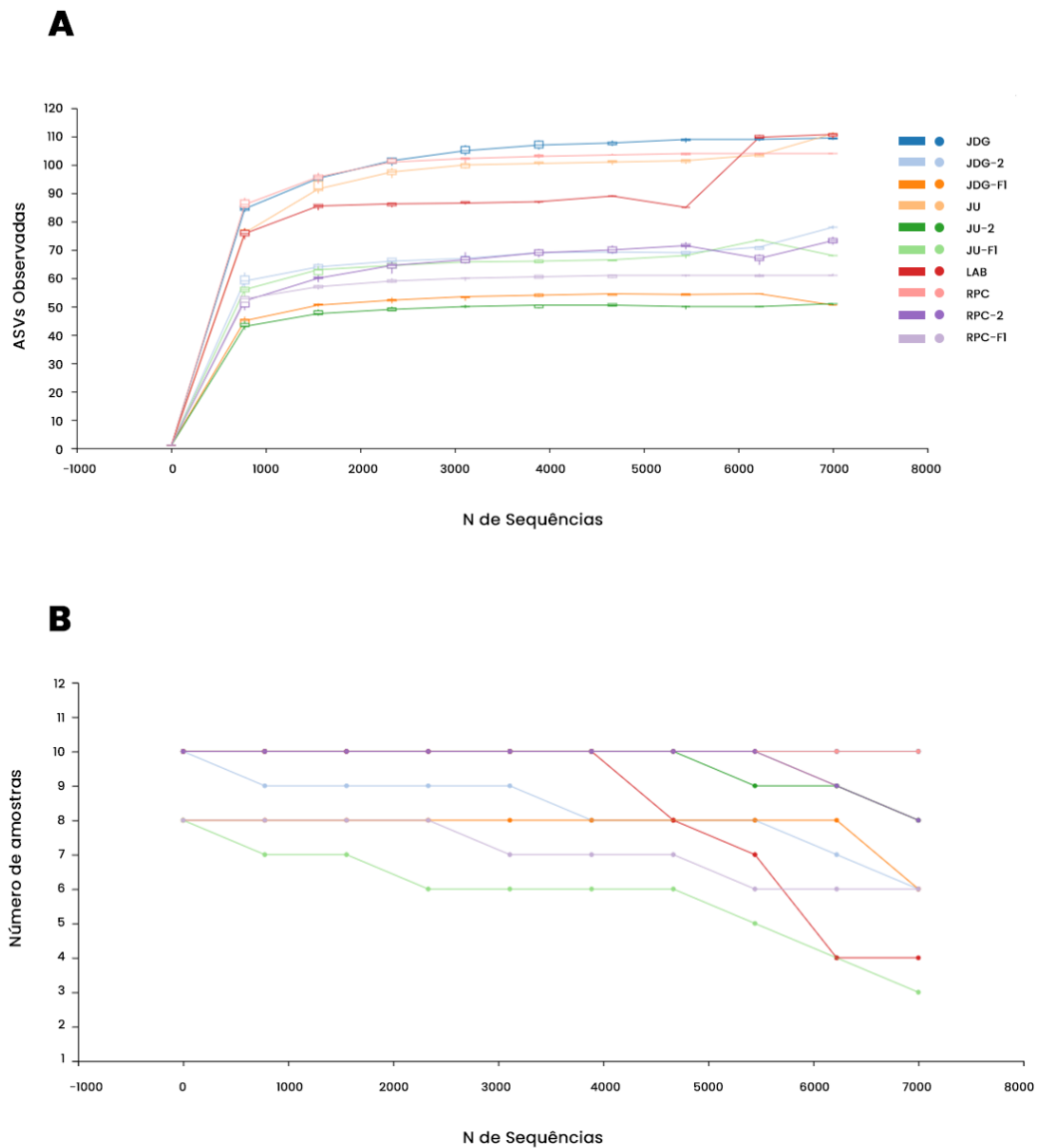
Os controles negativos referentes a extração e PCR apresentaram 23.196 e 4.709 sequências, respectivamente. Assim, os dados foram submetidos a uma descontaminação *in silico*, a partir da qual foram retidas 1.245.552 sequências (~30% do total inicial) (Tabela 4). Sete ASVs (0,5%) foram excluídas totalmente, uma vez que foram identificadas como contaminantes. Um total de 1.612 ASVs (99,5% do total após *denoising*) prosseguiu para as análises de diversidade da microbiota.

**Tabela 4:** Resultados do sequenciamento do 16S rDNA de amostras de intestino de *Aedes albopictus* após o processo de descontaminação *in silico*.

| <b>Parâmetros do sequenciamento</b> | <b>Descontaminação</b> |
|-------------------------------------|------------------------|
| <b>Frequência mínima</b>            | 25                     |
| <b>1st quartil</b>                  | 6.971                  |
| <b>Frequência mediana</b>           | 8.905                  |
| <b>3st quartil</b>                  | 15.857                 |
| <b>Frequência máxima</b>            | 123.983                |
| <b>Frequência média</b>             | 13.250                 |
| <b>ASVs</b>                         | 1.612                  |
| <b>Frequência total</b>             | 1.245.552              |

### 4.3 Análises de diversidade

A análise das curvas de rarefação e do número de amostras, de acordo com o aumento do número de sequências, possibilitou estabelecer um patamar de rarefação em 3.800 sequências (Figuras 8A e B). Quatro amostras, que possuíam uma profundidade de sequenciamento abaixo de 3.800 sequências foram excluídas da continuidade das análises. A partir do patamar de rarefação definido, as curvas de rarefação demonstraram uma redução no crescimento exponencial e para alguns grupos atingindo um platô. Isto sugere que a maioria das ASVs foi amostrada, porém não foi possível a detecção de algumas, visto que três grupos apresentaram ainda curvas com um aumento na inclinação após o patamar estabelecido (Figura 8A).

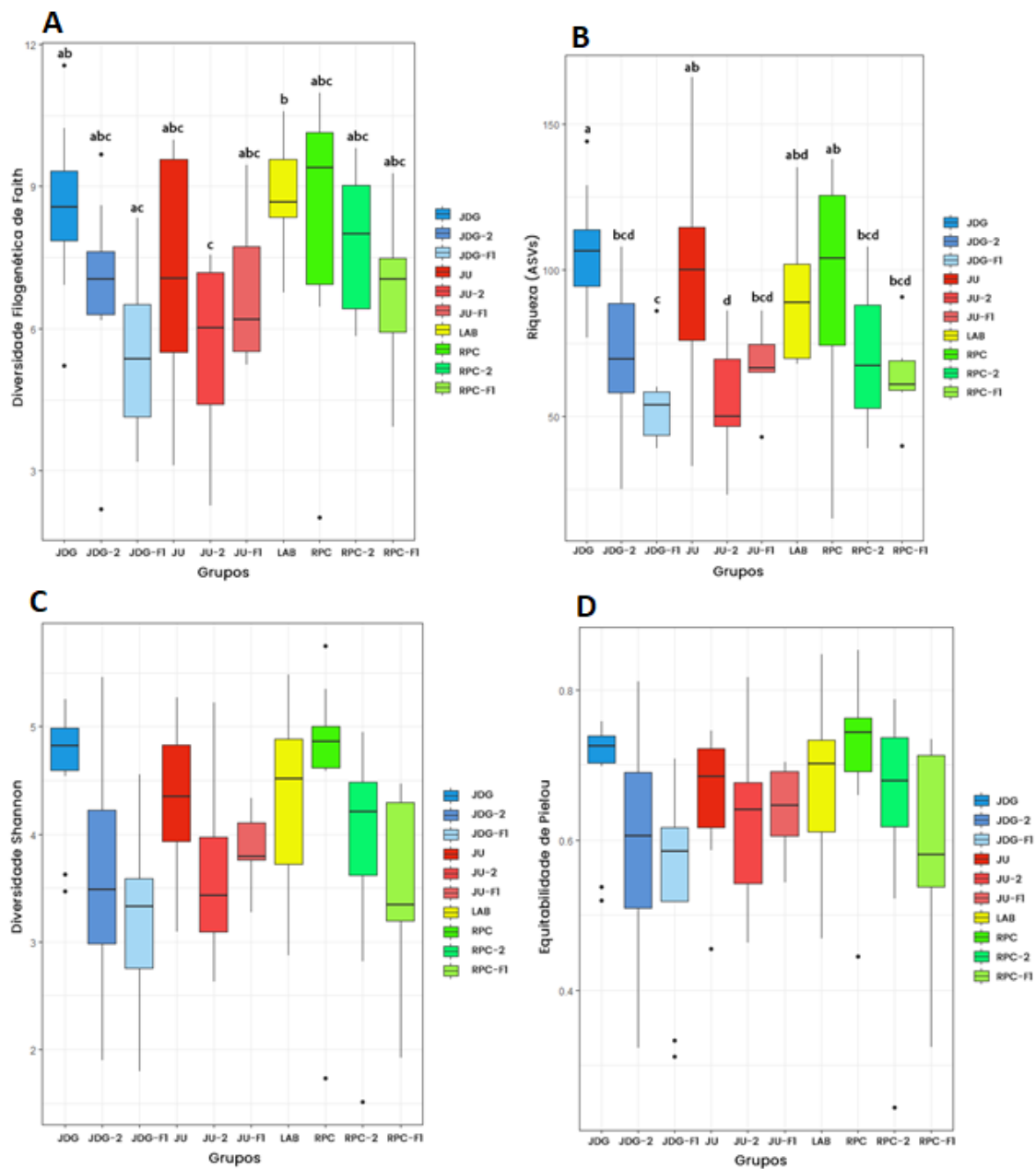


**Figura 8: Curvas de rarefação (A)** Curvas de rarefação por grupos. A métrica de diversidade ASVs observadas foi utilizada, com as curvas traçadas a partir do número de ASVs por grupo, plotadas diante do número de sequências geradas através do sequenciamento em Illumina Miseq (tamanho amostral). **(B)** Número de amostras diante do tamanho amostral. Decréscimo do número de amostras por grupos de acordo com o aumento do tamanho amostral.

### **4.3.1 Índices de diversidade- $\alpha$ indicam diferenças na microbiota quanto ao período de coleta e origem dos mosquitos, mas não entre locais de campo e populações**

Após a rarefação, 90 amostras da microbiota de *Ae. albopictus* prosseguiram para as análises ecológicas. De forma geral, os resultados apontam para uma variação significativa para pelo menos uma métrica de diversidade- $\alpha$  em relação à localidade, período, origem e população. As amostras foram inicialmente comparadas entre todos os grupos descritos anteriormente no Quadro 3 e em seguida, agrupadas de acordo com população, origem, período e localidade de coleta.

O índice de Faith e riqueza (ASVs) apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Faith: Kruskal–Wallis:  $H = 26,16$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ; Riqueza: Kruskal–Wallis:  $H = 33,23$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ). Para o índice de Faith, as comparações pareadas apontaram para aumento deste índice para JDG *versus* JU-2, LAB *versus* JU-2 e LAB *versus* JDG-F1. Já para a riqueza, o número de ASVs foi considerado mais elevado em JGD *versus* JDG-2 e JDG-F1, JU *versus* JU-2 e JDG-F1 e RPC *versus* JDG-F1 e JU-2 (Figuras 9A e B, Tabela Suplementar 2 e 3). Quanto aos índices de Shannon e Pielou, observaram-se diferenças significativas gerais entre os grupos, porém sem variações significativas nas comparações em pares (Shannon: Kruskal–Wallis teste:  $H = 26,58$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ; Pielou: Kruskal–Wallis teste:  $H = 18,12$ ;  $p$ -valor  $< 0,05$ ).



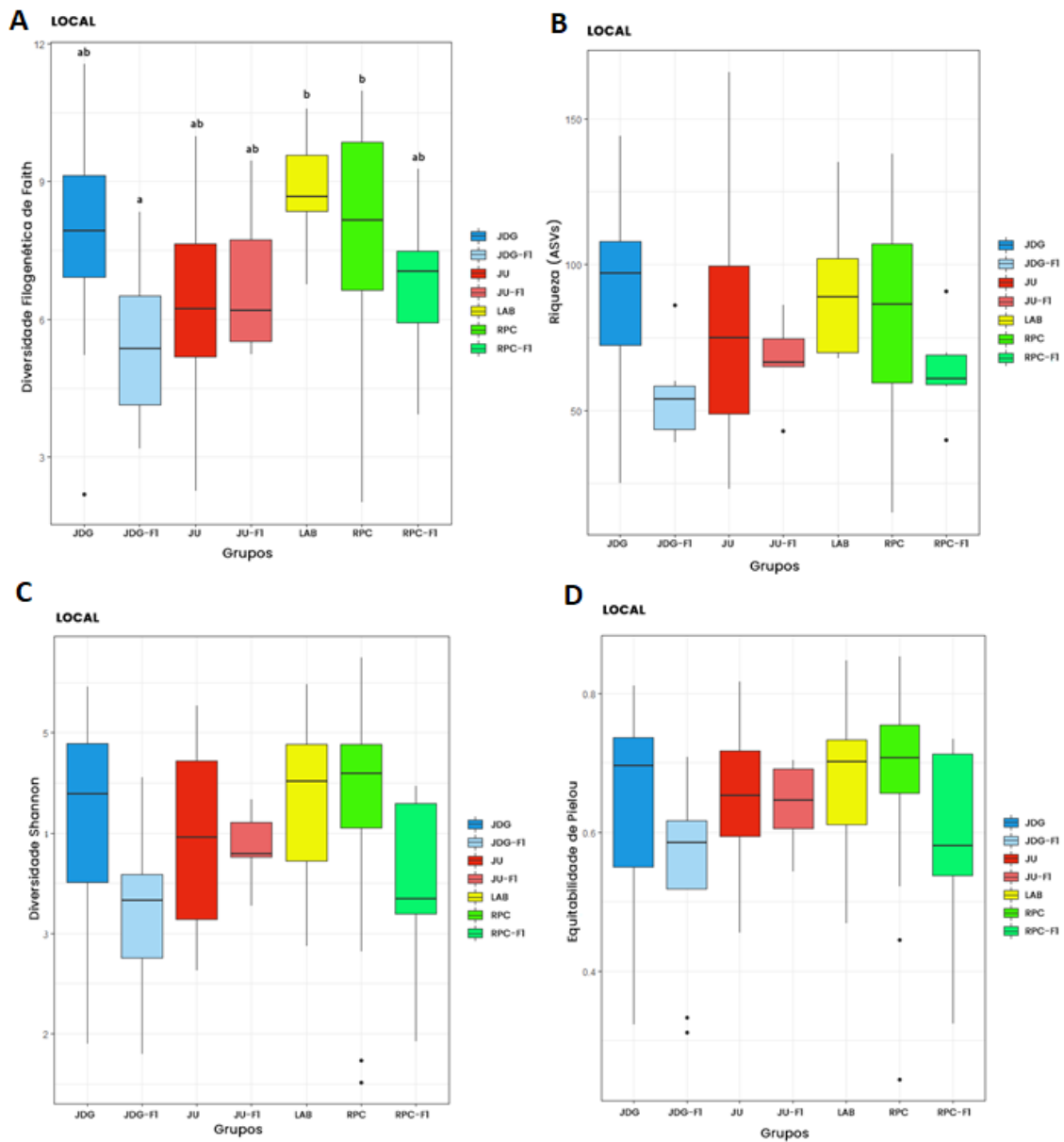
**Figura 9:** Diversidade alfa da microbiota intestinal de *Aedes albopictus*. A: diversidade filogenética de Faith; B: riqueza (ASVs); C: diversidade Shannon; D: Equitabilidade de Pielou. Linhas pretas indicam medianas e pontos pretos *outliers*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre pares (Kruskal–Wallis: p-valor ajustado < 0,05), observadas apenas para índice de Faith e Riqueza (ASVs). Estatísticas de teste para as comparações em pares de podem ser visualizadas nas Tabelas Suplementares 2 e 3.

Quanto à localidade de coleta dos mosquitos, o índice de Faith variou significativamente entre a microbiota dos grupos (Kruskal–Wallis:  $H = 19,54$ ; p-valor < 0,05), com valor inferior para JDG-F1 em relação à LAB e RPC (Figura 10A, Tabela Suplementar 2). Por outro lado, os índices de Shannon (Kruskal–

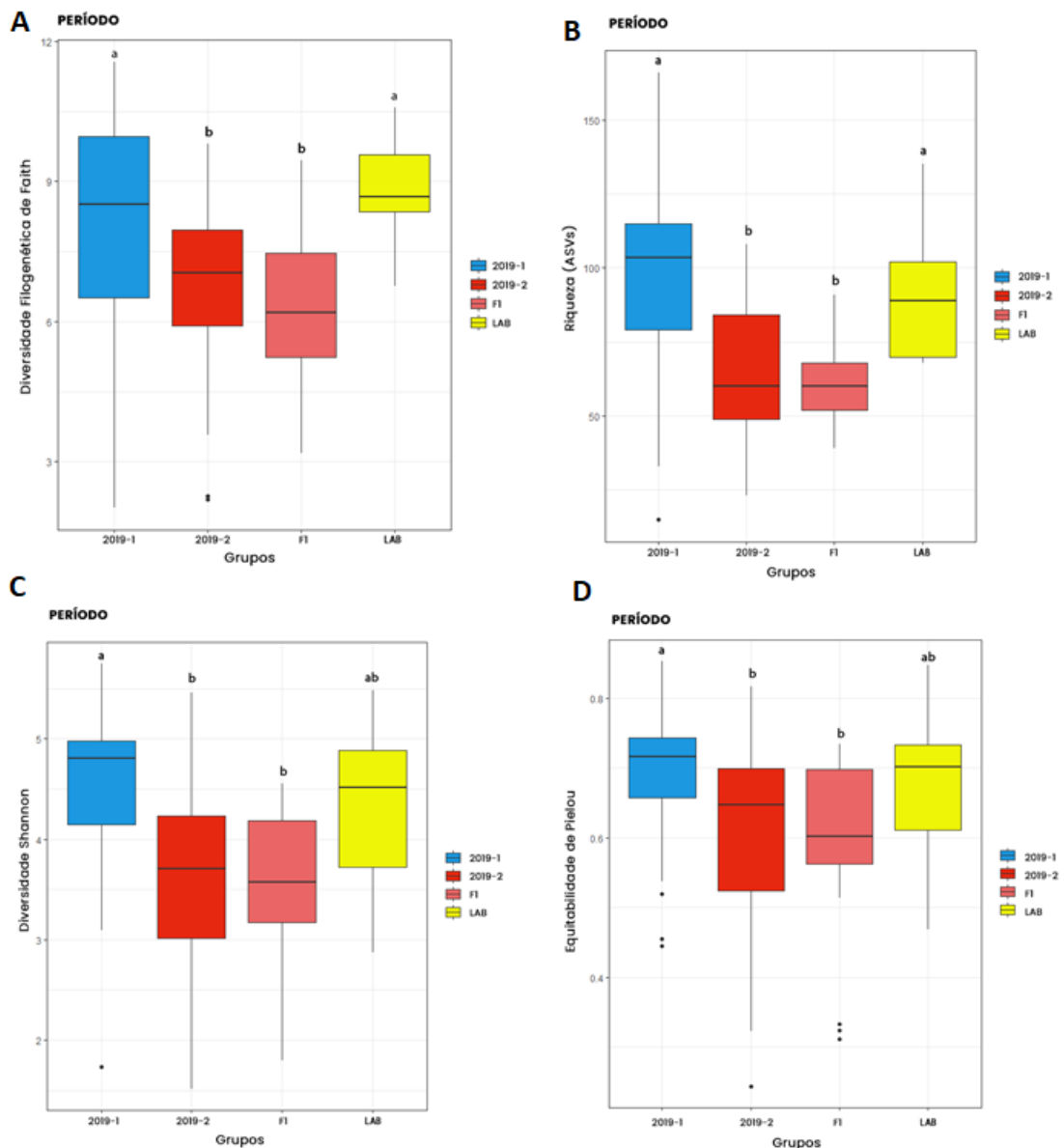


Wallis:  $H = 11,39$ ;  $p$ -valor = 0,07), Pielou (Kruskal–Wallis:  $H = 9,95$ ;  $p$ -valor = 0,12) e riqueza (ASVs) (Kruskal–Wallis:  $H = 12,73$ ;  $p$ -valor = 0,05) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os mosquitos oriundos de diferentes locais (Figura 10B, C e D).

Quanto ao período de coleta, foram encontradas diferenças significativas para todas as métricas de diversidade adotadas (Kruskal–Wallis para riqueza (ASVs):  $H = 29,60$ ,  $p$ -valor < 0.001; Kruskal–Wallis para diversidade filogenética de Faith:  $H = 17,58$ ,  $p$ -valor < 0.001; Kruskal–Wallis para diversidade de Shannon:  $H = 21,94$ ,  $p$ -valor < 0,001; Kruskal–Wallis para equitabilidade de Pielou:  $H = 11,95$ ,  $p$ -valor < 0,05) (Figura 11). A microbiota intestinal de *Ae. albopictus* dos grupos LAB e 2019-1 demonstrou uma maior diversidade filogenética de Faith e riqueza em relação a 2019-2 e F1 (Figuras 11A e B, Tabelas Suplementares 2 e 3). Já os índices de Shannon e Pielou indicaram uma maior diversidade e equitabilidade, respectivamente, para a microbiota de mosquitos do grupo 2019-1 em relação a 2019-2 e F1 (Figuras 11C e D, Tabelas Suplementares 4 e 5).



**Figura 10:** Diversidade alfa da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* de acordo com o local. A: diversidade filogenética de Faith; B: riqueza (ASVs); C: diversidade Shannon; D: Equitabilidade de Pielou. Linhas pretas indicam medianas e pontos pretos *outliers*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre pares (Kruskal–Wallis: p-valor ajustado < 0,05). Índices de Shannon, Pielou e Riqueza (ASVs) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Diferenças em pares de Índice de Faith podem ser visualizadas em Tabela Suplementar 2.



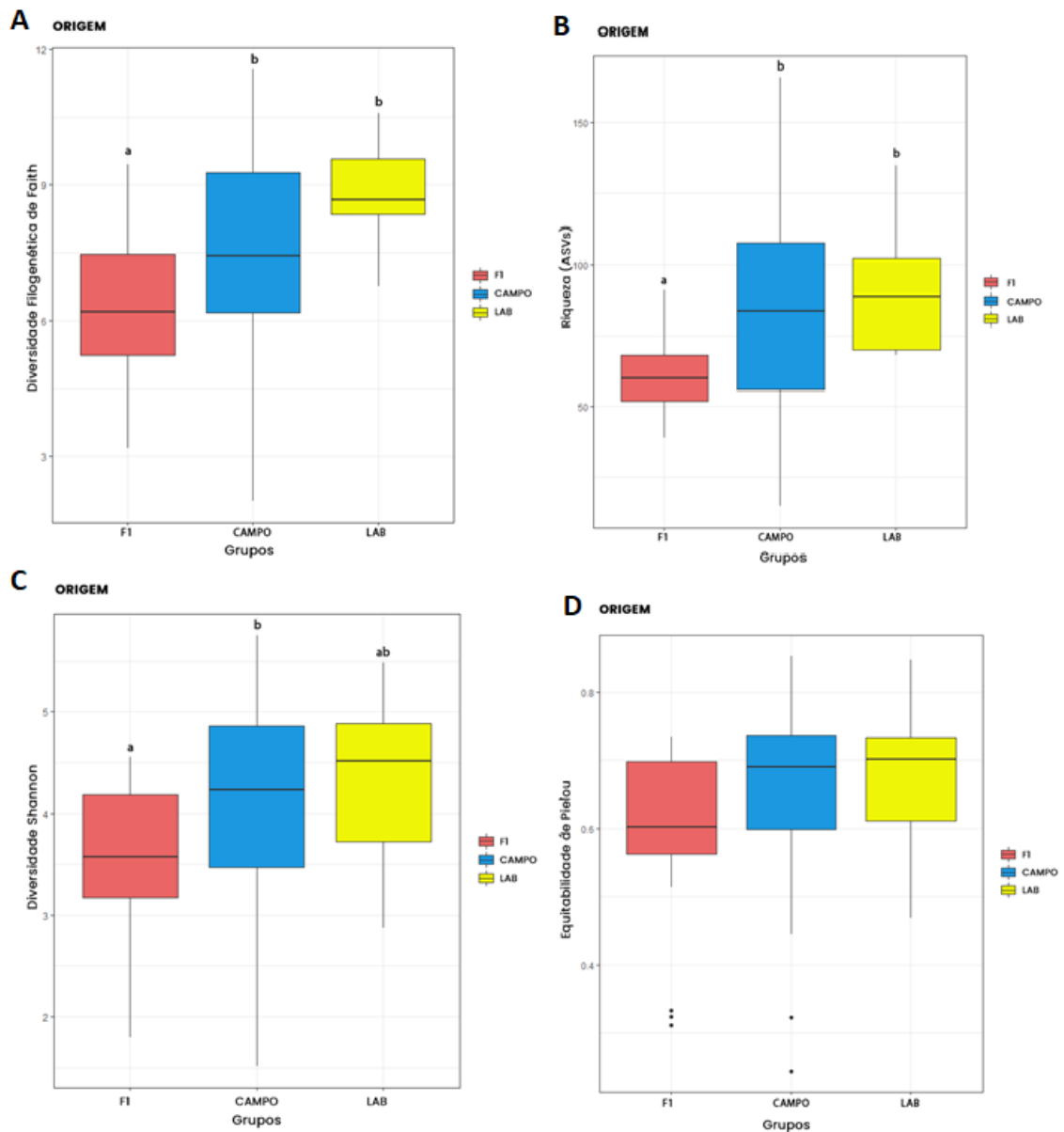
**Figura 11:** Diversidade alfa da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* de acordo com o período. A: diversidade filogenética de Faith; B: riqueza (ASVs); C: diversidade Shannon; D: Equitabilidade de Pielou.

Linhas pretas indicam medianas e pontos pretos *outliers*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre pares (Kruskal–Wallis: p-valor ajustado < 0,05). Diferenças em pares de Índices de Faith, Riqueza (ASVs), Shannon e Pielou observadas podem ser visualizadas nas Tabelas Suplementares 2,3,4 e 5.

Quanto à origem (campo ou laboratório), observaram-se diferenças estatísticas significativas para riqueza (ASVs) (Kruskal–Wallis teste:  $H = 9,73$ ; p-valor < 0,001), diversidade de Faith (Kruskal–Wallis teste:  $H = 11,44$ ; p-valor < 0,05) e índice de Shannon (Kruskal–Wallis teste:  $H = 7,38$ ; p-valor < 0,05), ao passo que isso não ocorreu para o índice de Pielou (Kruskal–Wallis teste:  $H = 5,52$ , p-valor = 0,06) (Figura 12). Segundo as comparações pareadas, a

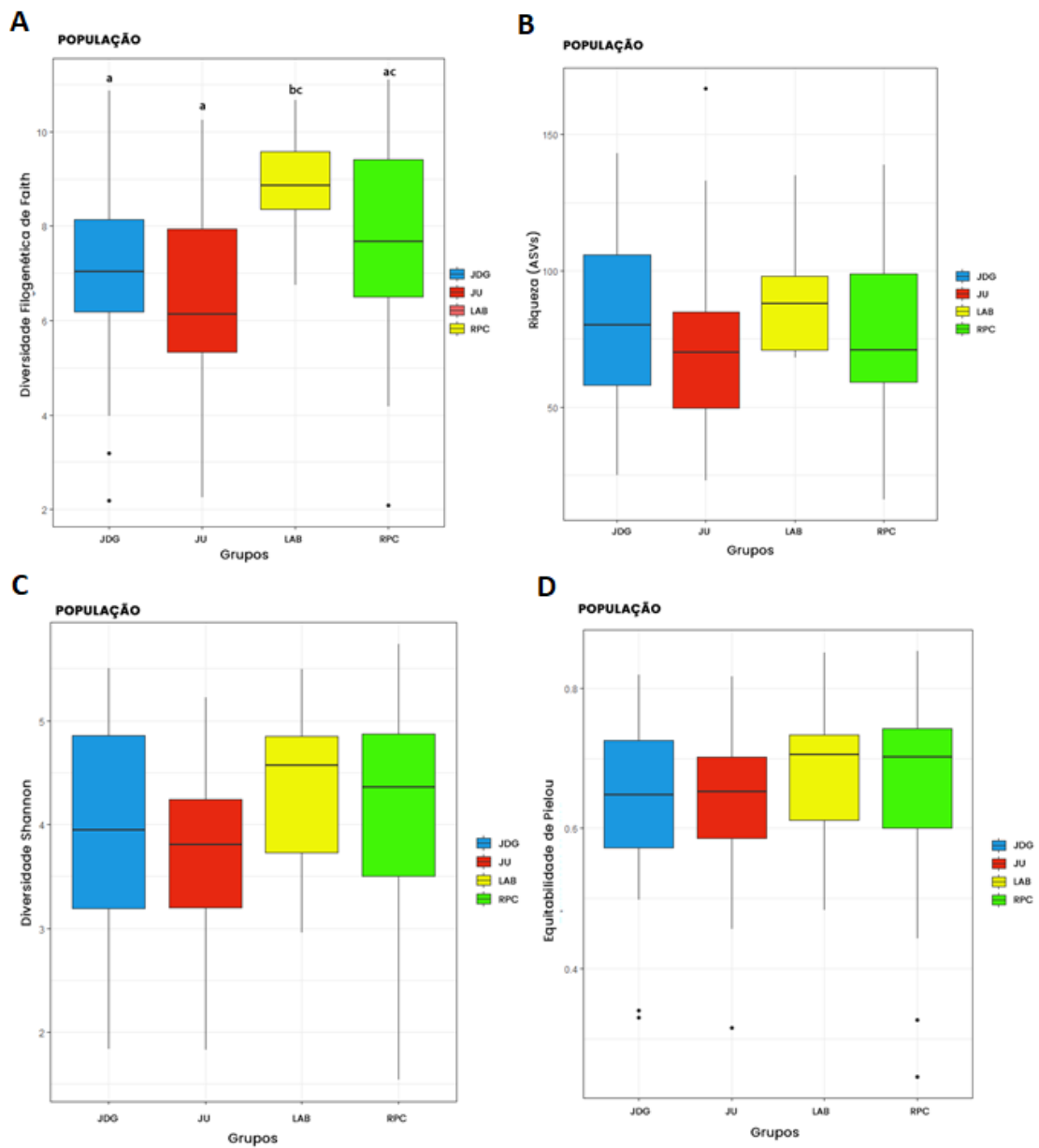
microbiota de fêmeas de *Ae. albopictus* oriundas do campo, (ou seja, independentemente do período ou localidade de coleta) e do grupo LAB apresentaram uma maior diversidade de Faith e riqueza de ASVs em relação a F1 (Figuras 12A e B, Tabelas Suplementares 2 e 3). Já o nível de diversidade a partir do índice de Shannon demonstrou um padrão similar, porém com diferença significativa apenas entre campo e F1 (Figura 12C, Tabela Suplementar 4).

Em relação à população, buscou-se observar diferenças na diversidade e riqueza da microbiota possivelmente relacionadas a fatores genéticos. Não houve diferenças significativas entre os grupos segundo a riqueza (ASVs) (Kruskal–Wallis:  $H = 1,93$ ,  $p\text{-valor} = 0,59$ ) e os índices de Shannon (Kruskal–Wallis:  $H = 2,22$ ,  $p\text{-valor} = 0,52$ ) e Pielou (Kruskal–Wallis:  $H = 3,13$ ,  $p\text{-valor} = 0,37$ ). Apenas o índice de Faith apresentou diferenças significativas gerais entre as populações (Kruskal–Wallis:  $H = 10,90$ ,  $p\text{-valor} < 0,05$ ). De acordo com a comparação em pares, LAB apresenta maior diversidade que JDG e JU, enquanto RPC não foi diferente dos outros grupos (Figura 13A, Tabela Suplementar 2).



**Figura 12:** Diversidade alfa da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* de acordo com a origem. A: diversidade filogenética de Faith; B: riqueza (ASVs); C: diversidade Shannon; D: Equitabilidade de Pielou.

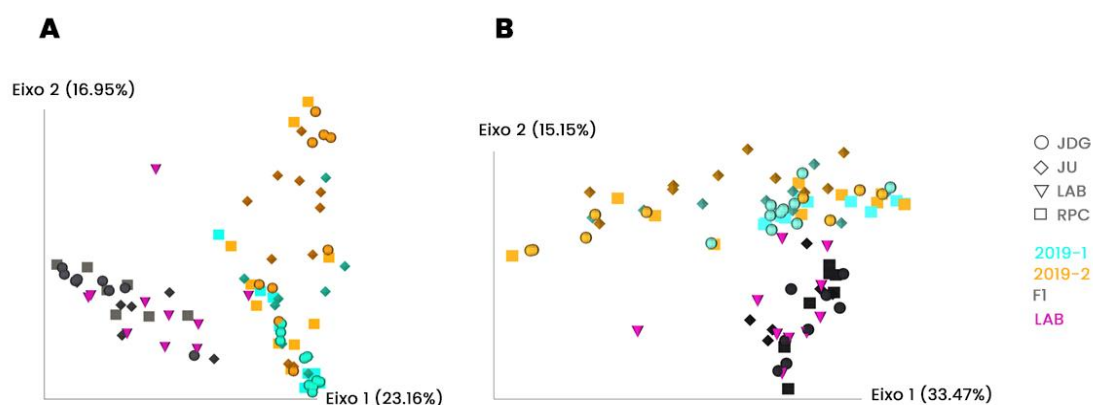
Linhas pretas indicam medianas e pontos pretos *outliers*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre pares (Kruskal–Wallis: p-valor ajustado < 0,05). Índice de Pielou não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Diferenças em pares de Índices de Faith, Riqueza (ASVs) e Shannon podem ser visualizadas nas Tabelas Suplementares 2,3 e 4.



**Figura 13:** Diversidade alfa da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* de acordo com a população. A: diversidade filogenética de Faith; B: riqueza (ASVs); C: diversidade Shannon; D: Equitabilidade de Pielou. Linhas pretas indicam medianas e pontos pretos *outliers*. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre pares (Kruskal–Wallis: p-valor ajustado < 0,05). Índices de Shannon, Pielou e Riqueza (ASVs) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Diferenças em pares de índice de Faith podem ser visualizadas em Tabela Suplementar 2.

#### **4.3.2 Índices de diversidade- $\beta$ indicam dissimilaridades entre a microbiota de *Ae. albopictus*, com agrupamentos formados principalmente de acordo com a origem e período de coleta de *Ae. albopictus***

Diferenças significativas na microbiota de *Ae. albopictus* quanto às variáveis local, período, origem e população foram observadas a partir da PERMANOVA dos índices de dissimilaridade de Bray-Curtis e Unifrac ponderado (Tabela 7). As PCoAs construídas a partir de ambos os índices mostraram o agrupamento das amostras de acordo com a origem (campo ou laboratório). Assim, as amostras da microbiota dos insetos criados por uma geração em laboratório (F1) formaram um grupo único, independentemente da população, junto com as amostras de LAB, obtidas a partir de *Ae. albopictus* da colônia do LATHEMA, enquanto as amostras de espécimes do campo formaram outro grupo, sem distinção quanto à localidade e período de coleta (Figura 14). Além disso, as amostras de 2019-2 apresentam maior dispersão que as amostras de 2019-1, F1 e LAB em relação ao eixo 2 para PCoA baseada em dissimilaridade de Bray-Curtis (Figura 14A) e ao eixo 1 para PCoA de Unifrac ponderado (Figura 14B). Este resultado indica maior heterogeneidade na microbiota intestinal dos mosquitos coletados em 2019-2 quando comparados àqueles de 2019-1, F1 e LAB.



**Figura 34:** Análise de componentes principais (PCoA) da microbiota intestinal de *Aedes albopictus*. A: baseada na dissimilaridade de Bray-Curtis; B: Unifrac ponderado. Legenda no canto superior direito indica as localidades, referentes aos mosquitos analisados, de acordo com as formas indicadas. Legenda no canto inferior direito indica o período, referente à coleta/processamento dos mosquitos, de acordo com as cores indicadas.

**Tabela 5:** Comparações de diversidade beta da microbiota intestinal de grupos de *Aedes albopictus* segundo as diferentes variáveis utilizadas. Diferenças estatísticas foram obtidas utilizando o teste PERMANOVA (999 permutações). Significância foi determinada com p-valor < 0,05.

| Variáveis | Bray-Curtis |         | Unifrac ponderado |         |
|-----------|-------------|---------|-------------------|---------|
|           | pseudo-F    | p-valor | pseudo-F          | p-valor |
| Local     | 5,379484    | 0,001   | 3,810412          | 0,001   |
| Período   | 12,301657   | 0,001   | 8,704538          | 0,001   |
| Origem    | 13,164436   | 0,001   | 8,545712          | 0,001   |
| População | 2,396939    | 0,001   | 2,516725          | 0,003   |

### 4.3.3 Composição e abundância da microbiota de *Ae. albopictus* varia ao nível individual e entre mosquitos de campo e laboratório

A identificação taxonômica das sequências resultou em mais de 100 taxa ao nível de gênero. Para comparar visualmente o perfil da microbiota dos diferentes grupos de *Ae. albopictus* quanto a sua abundância relativa, utilizou-se os táxons mais dominantes. De maneira geral, os mosquitos analisados apresentaram uma microbiota intestinal com a composição entre espécimes de



um mesmo grupo, variando ao nível individual. Além disso, a partir dos níveis de família e gênero, observa-se uma diferença entre os táxons dominantes em mosquitos de campo (JDG, JU e RPC) em relação aos grupos F1 e LAB.

Ao nível taxonômico de filo, a microbiota intestinal de *Ae. albopictus* foi dominada por Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. Proteobacteria foi o filo com maior abundância relativa, independentemente de período de coleta, localidade e origem (campo ou laboratório), variando entre 69% e 88% das sequências. O filo Firmicutes foi o segundo mais abundante, variando entre 3% e 13%. Em seguida, Actinobacteria variou entre 2% e 13%, sendo ligeiramente mais abundante que Firmicutes apenas no grupo RPC-F1. O quarto mais abundante foi o filo Bacteroidetes, que variou entre 1,5% e 4%. Os demais filios identificados (Cyanobacteria, Planctomycetes, OD1, Spirochaetes, TM7, Acidobacteria) apresentaram uma abundância relativa < 1% considerando todas as amostras dos grupos analisados (Figura 15A).

Ao nível de família e gênero, é possível notar maior heterogeneidade inter e intragrupos na composição da microbiota intestinal de *Ae. albopictus*. Por exemplo, Acetobacteraceae foi a família mais dominante em mosquitos criados em laboratório, com uma abundância média de 48, 45, 33 e 27% em JDG-F1, RPC-F1, LAB e JU-F1, respectivamente, enquanto apresentou uma abundância média irrelevante (< 0,2%) em mosquitos coletados no campo (JDG, JU e RPC). As sequências do 16S rDNA correspondentes à esta família não puderam ser identificadas ao nível de gênero, uma vez que a comparação destas ao banco de dados do GenBank via BLASTN indicou 100% de identidade com os gêneros *Gluconacetobacter*, *Asaia* e *Gluconobacter*. Também não foi possível obter uma classificação em nível de gênero pela ferramenta RDP *classifier*, considerando uma confiança mínima de 90%. Já a família Vibrionaceae foi abundante entre os grupos de insetos de campo, apresentando uma abundância média de 14, 13 e 15% em JDG, JU e RPC, respectivamente, enquanto foi menos comum em espécies de F1 e LAB (Figura 15B).

Por fim, ao nível de gênero, destaca-se a variabilidade na detecção e na abundância relativa de *Wolbachia* no intestino de *Ae. albopictus* de campo (JDG, JU e RPC) e da colônia de laboratório (LAB). Por exemplo, para JDG e RPC, *Wolbachia* apresentou uma frequência média baixa (<0,2% e <0,7%,

respectivamente) ou indetectável para todos os mosquitos coletados em 2019-1. Por outro lado, *Wolbachia* foi o táxon mais abundante em alguns mosquitos destas populações em 2019-2, com uma abundância chegando a 84% em amostras de RPC e chegando a 77% em amostras de JDG. Considerando LAB, *Wolbachia* foi detectada em 4 dos 10 espécimes (40%), sendo que em um destes representou aproximadamente 38% das sequências. Já para *Ae. albopictus* dos grupos F1, o endossimbionte foi ausente ou indetectável (Figura 15C).

Levando em conta os dois períodos de coletas, o gênero *Sphingomonas* apresentou uma elevada abundância, chegando a 49% em amostras de JDG de 2019-2, ao passo que em 2019-1 foi observada uma menor abundância deste gênero na maioria dos insetos (< 0,3%). De forma geral, o gênero *Propionibacterium* foi encontrado em maior abundância em mosquitos de campo, com uma média de 8, 6 e 4,5% respectivamente (JDG, JU e RPC) do que nos mosquitos de laboratório, com exceção do grupo RPC-F1 com uma abundância média de 2,5% (Figura 15C).

#### **4.3.4 A microbiota core bacteriana de *Ae. albopictus* foi composta por cinco táxons**

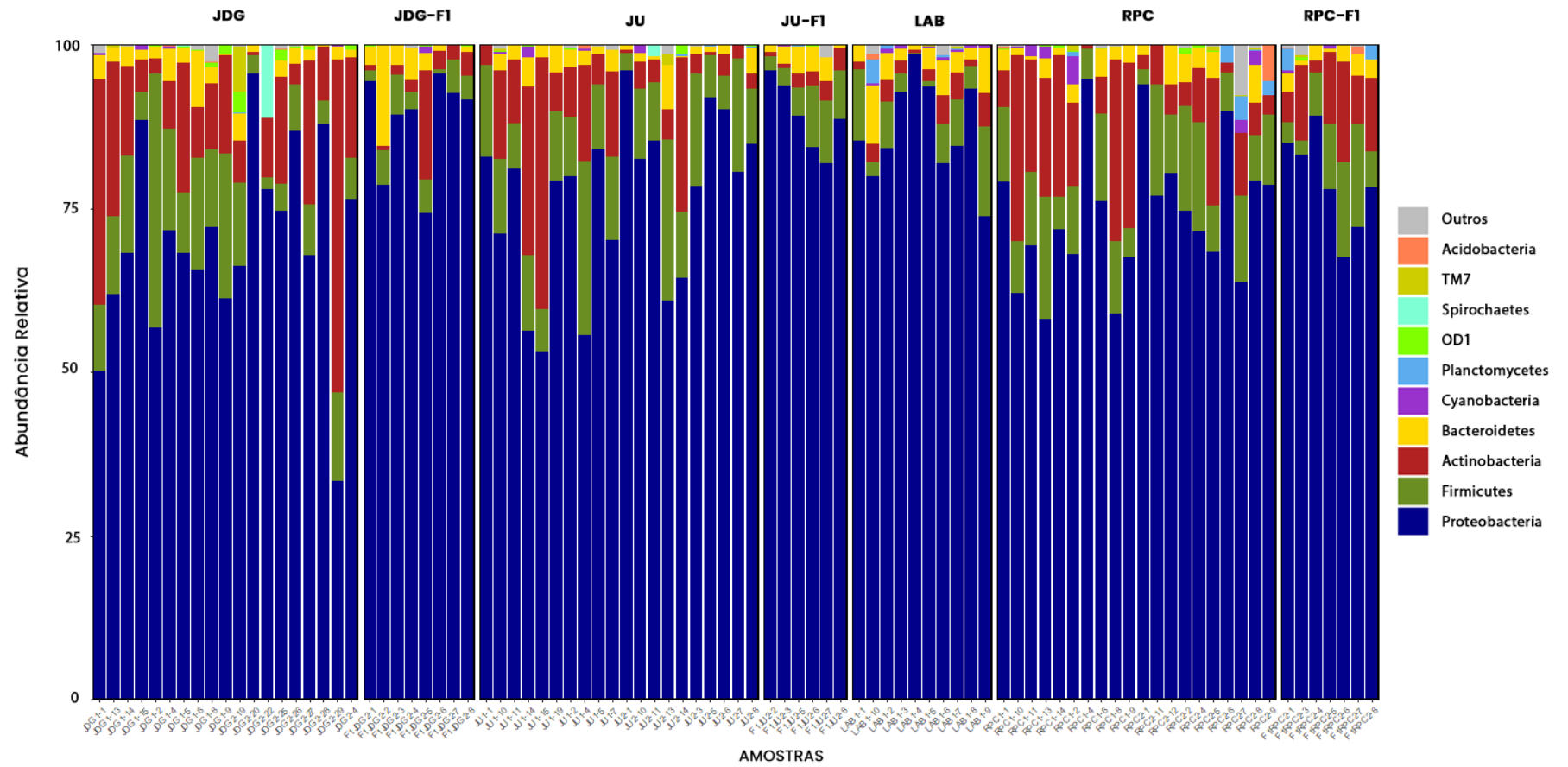
Quatro famílias e uma ordem formaram a microbiota core “geral” de fêmeas adultas de *Ae. albopictus* analisadas neste estudo: Enterobacteriaceae, Halomonadaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae e Actinomycetales, estando presentes em >90% de todos os indivíduos analisados (Quadro 4). As famílias Pseudomonadaceae e Moraxellaceae não apresentaram uma abundância relativa expressiva, cuja média variou de 1,6% (RPC-F1) a 2,5% (RPC) e 1% (LAB) a 4,5% (JDG), respectivamente (Figura 15B). A ordem Actinomycetales apresentou um padrão similar, com uma abundância relativa média variando de aproximadamente 1% (JU-F1) a 5% (JDG) (Figura 15B). As famílias Enterobacteriaceae e Halomonadaceae apresentaram uma abundância relativa mais elevada: a primeira variou de aproximadamente 3,5% (RPC-F1) a 15% (JU-F1), enquanto Halomonadaceae variou aproximadamente de 3% (RPC-F1) a 12% (JDG) (Figura 15B).

Os táxons que formaram a microbiota core de mosquitos de campo foram as famílias Bacillaceae, Propionibacteriaceae, Sphingomonadaceae,

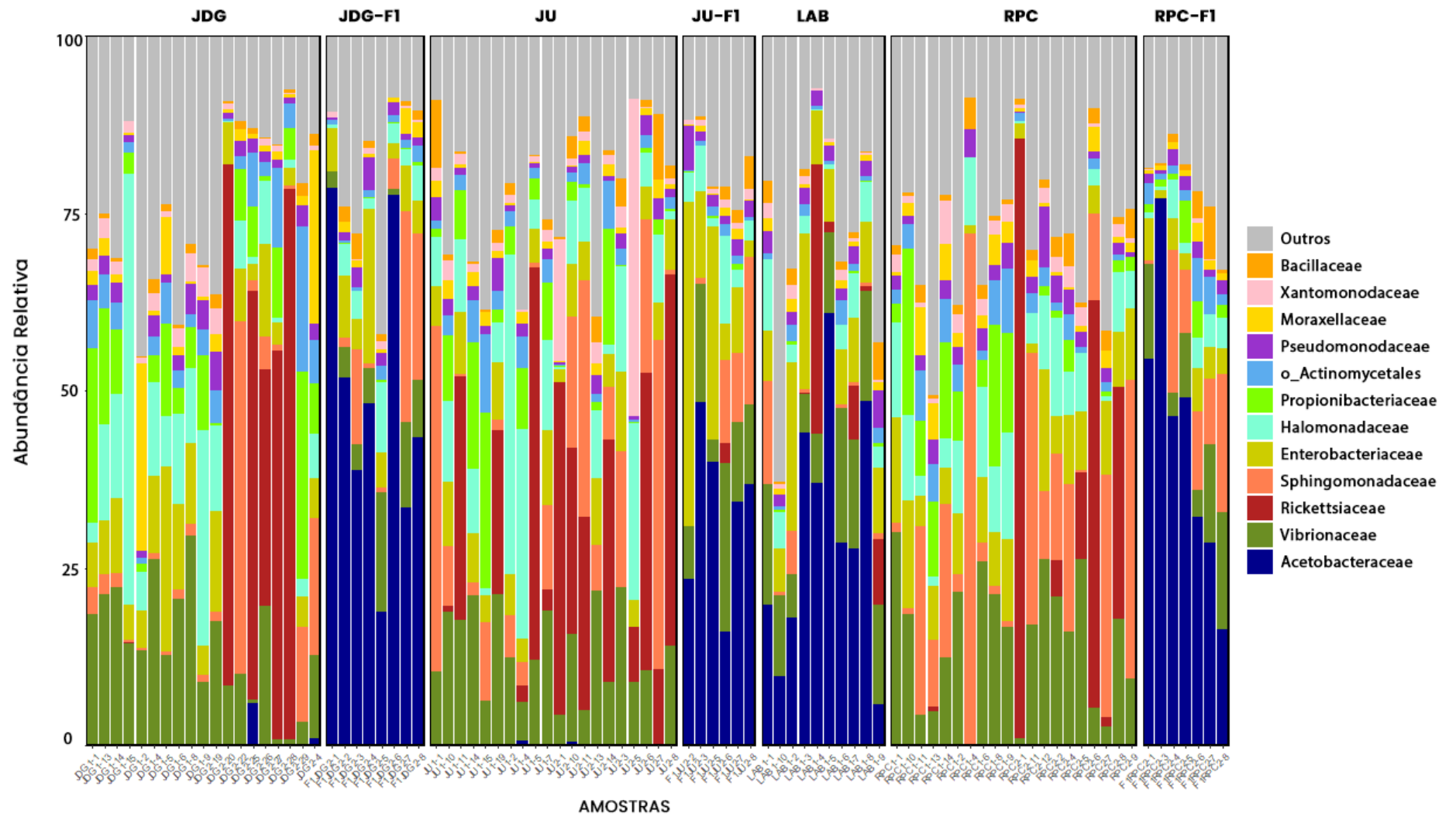
Streptococcaceae e Vibrionaceae. Enquanto o *core* de mosquitos criados em laboratório teve apenas a família Acetobacteraceae além dos táxons que compuseram a microbiota *core* “geral” (Quadro 4), uma vez que esta família foi prevalente apenas em F1 e LAB (Figura 15B).

Em relação às populações de mosquitos, ou seja, independentemente se os mosquitos foram criados em campo ou laboratório, destacamos que Vibrionaceae compôs a microbiota *core* de JDG e de JU (além dos táxons do *core* “geral”), ao passo que foi excluída da microbiota *core* de RPC por não estar presente em ao menos 90% das amostras de RPC-F1. Já a família Bacillaceae, compôs a microbiota *core* de RPC e Xanthomonadaceae integrou exclusivamente a microbiota *core* de JU, além dos táxons do *core* “geral” (Quadro 4).

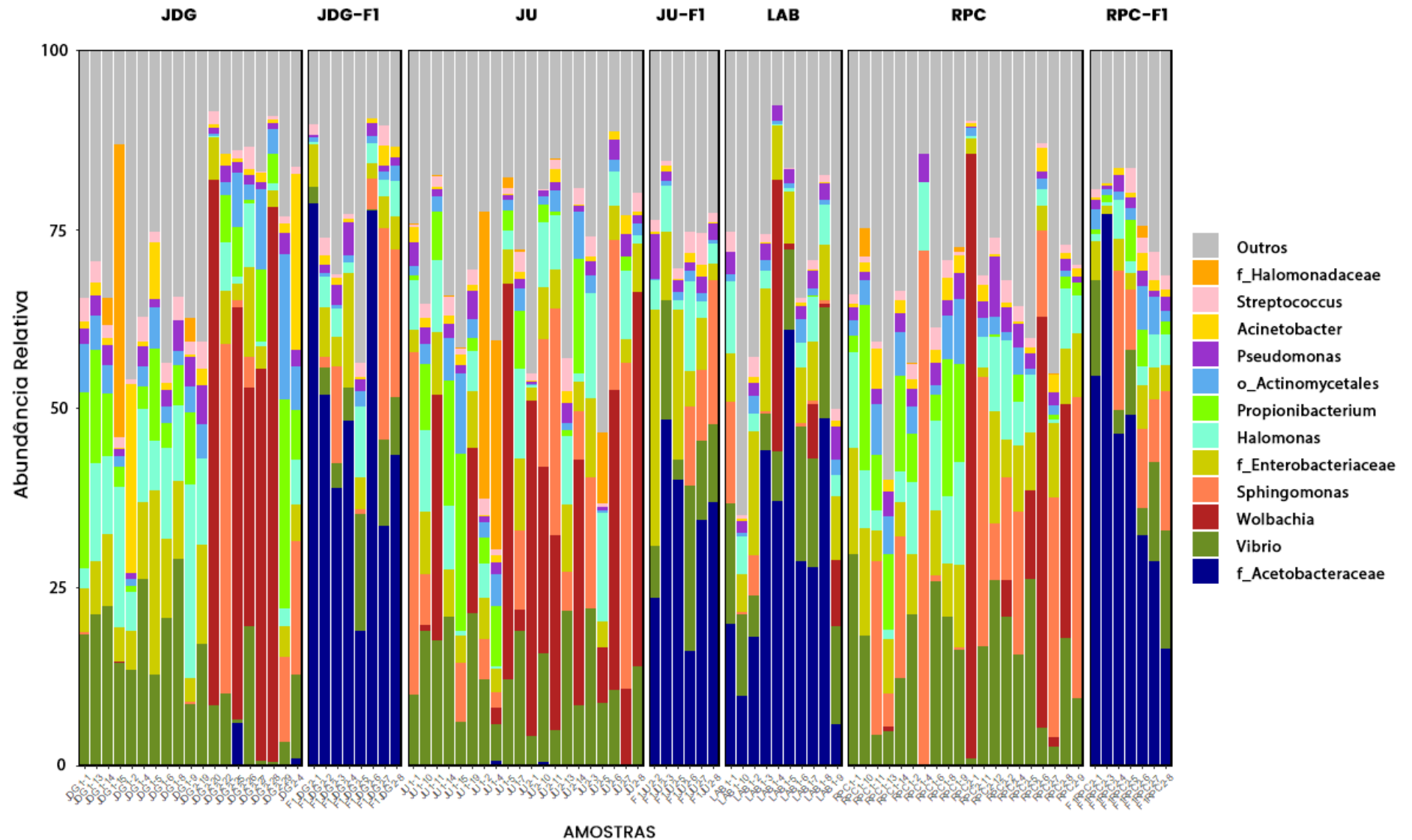
A - Abundância relativa das comunidades bacterianas por amostra para filo



B - Abundância relativa das comunidades bacterianas por amostra para família



C - Abundância relativa das comunidades bacterianas por amostra para gênero



**Figura 15:** Abundância relativa das comunidades bacterianas por amostra para (A) filo, (B) família e (C) gênero referente às localidades de campo, colonizadas por uma geração em laboratório (F1) e já adaptadas ao ambiente laboratorial. A frequência das bactérias ilustradas nas barras é de top 10 (A) e top 12 (B, C) táxons mais dominantes. f\_: família; o\_: ordem (C).

Quadro 4: Microbiota core de diferentes grupos de *Aedes albopictus*.

| TAXA                  | CORE CAMPO |    |     | CORE LABORATÓRIO |       |        |     | CORE JDG |       |        | CORE JU |      |       | CORE RPC |       |        |
|-----------------------|------------|----|-----|------------------|-------|--------|-----|----------|-------|--------|---------|------|-------|----------|-------|--------|
|                       | JDG        | JU | RPC | JDG-F1           | JU-F1 | RPC-F1 | LAB | JDG-1    | JDG-2 | JDG-F1 | JU-1    | JU-2 | JU-F1 | RPC-1    | RPC-2 | RPC-F1 |
| Acetobacteraceae      |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Aeromonadaceae        |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Bacillaceae           |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Bradyrhizobiaceae     |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| c_Bacilli             |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| c_Gammaproteobacteria |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Caulobacteraceae      |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Comamonadaceae        |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Corynebacteriaceae    |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Enterobacteriaceae    |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Enterococcaceae       |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Erysipelotrichaceae   |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Halomonadaceae        |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Methylobacteriaceae   |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Microbacteriaceae     |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Moraxellaceae         |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| o_Actinomycetales     |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| o_Bacteroidales       |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| o_Rhizobiales         |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Oxalobacteraceae      |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Peptostreptococcaceae |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Propionibacteriaceae  |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Pseudomonadaceae      |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Rhodobacteraceae      |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Rhodospirillaceae     |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Sphingobacteriaceae   |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Sphingomonadaceae     |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Staphylococcaceae     |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Streptococcaceae      |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Vibrionaceae          |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Weeksellaceae         |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |
| Xanthomonadaceae      |            |    |     |                  |       |        |     |          |       |        |         |      |       |          |       |        |

Em verde: Taxa com uma prevalência >90% na microbiota das amostras do grupo. CORE CAMPO-: Grupos de amostras coletadas nas localidades de campo; CORE LABORATÓRIO: Grupos de amostras colonizadas por uma (F1) ou diversas gerações em laboratório; CORE JDG: Grupos de amostras referentes aos dois momentos de coleta e à colonização em laboratório de JDG; CORE JU: Grupos de amostras referentes aos dois momentos de coleta e à colonização em laboratório de JU; CORE RPC: Grupos de amostras referentes aos dois momentos de coleta e à colonização em laboratório de RPC.

#### **4.3.5 A microbiota intestinal de *Ae. albopictus* possui bactérias diferencialmente abundantes de acordo com a localidade e período de coleta**

O resultado de ANCOM indicou que 13 e 21 táxons apresentaram abundância diferencial na microbiota intestinal de *Ae. albopictus* de acordo com a localidade e período de coleta, respectivamente (Figura 16). A abundância diferencial de certos táxons, quando considerada significativa, pode ser interpretada como uma “assinatura” da microbiota de *Ae. albopictus* oriundos de determinada localidade ou período de coleta.

Em relação à localidade, a família Acetobacteraceae apresentou uma abundância diferencial significativa e mais elevada em mosquitos criados em laboratório, sendo uma assinatura bacteriana da microbiota intestinal dos grupos JDG-F1, JU-F1, RPC-F1 e LAB. Por outro lado, apresentou abundância moderada no grupo JDG e abundância baixa/indetectável nas outras localidades de campo (Figura 16A; Tabela Suplementar 6). Por outro lado, a família Peptostreptococcaceae e o gênero *Propionibacterium* tiveram uma abundância diferencial significativa e mais elevada nos espécimes originários de campo (JDG, JU e RPC). Peptostreptococcaceae apresentou abundância diferencial moderada em LAB, estando ausente ou indetectável nos grupos F1, enquanto *Propionibacterium* obteve uma abundância diferencial significativa e elevada no grupo RPC-F1, estando ausente ou indetectável nos grupos LAB, JDG-F1 e JU-F1 (Figura 16A; Tabela Suplementar 6).

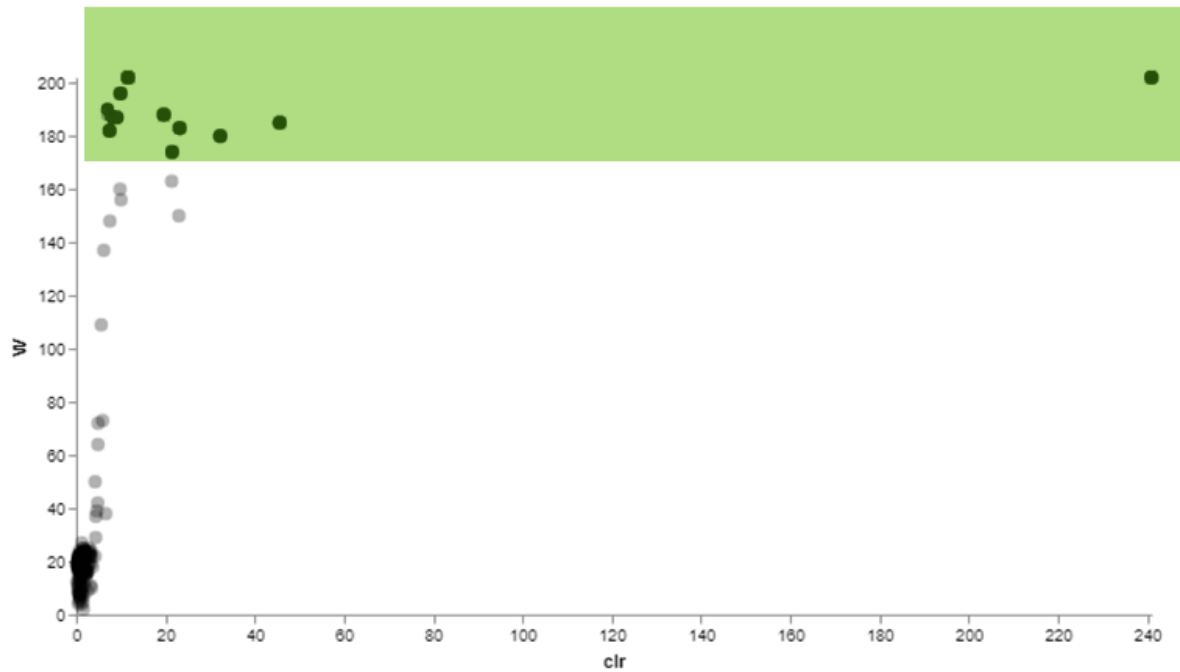
O gênero *Wolbachia* foi diferencialmente abundante nos períodos de coletas de campo (2019-1 e 2019-2) e LAB em relação a F1, no qual esteve ausente ou indetectável (Figura 16B; Tabela Suplementar 7). *Wolbachia* foi o único táxon a ser considerado uma assinatura da microbiota dos mosquitos de campo e de LAB.

Os gêneros *Ralstonia* e *Methylobacterium* foram classificados como assinaturas bacterianas da microbiota de *Ae. albopictus* coletados durante a estação chuvosa (2019-1), uma vez que foram ausentes/indetectáveis no período de 2019-2 (Figura 16B; Tabela Suplementar 7). Já os gêneros *Pedobacter*, *Cupriavidus*, *Reyranella*, *Bdellovibrio*, *Hydrocarboniphaga* e as



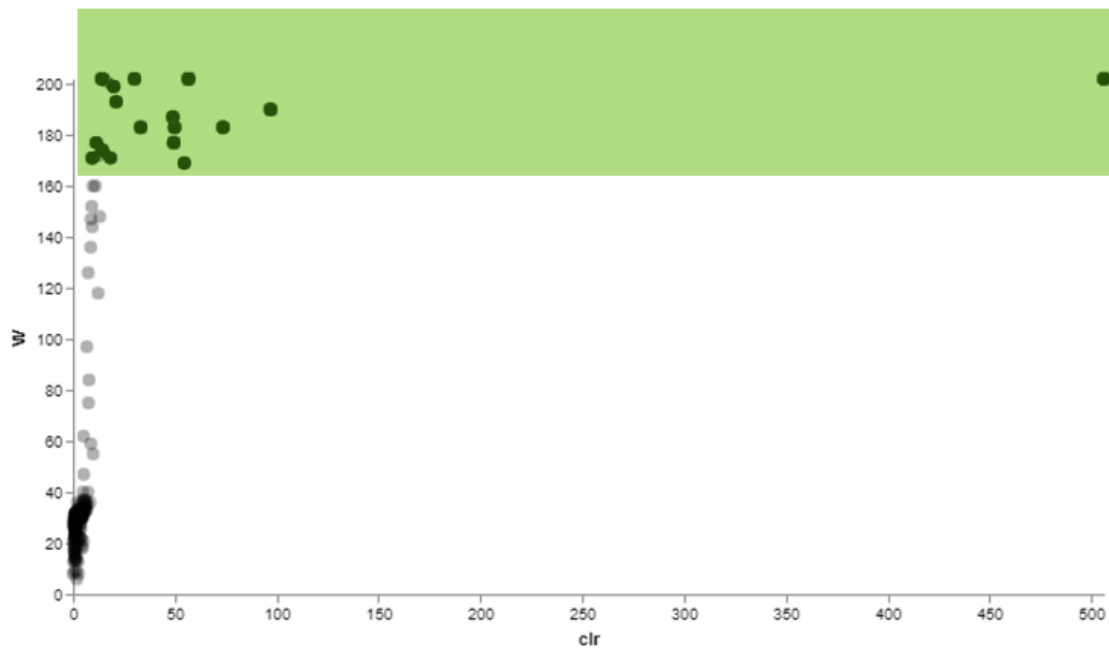
famílias Moraxellaceae e Chitinophagaceae foram considerados assinaturas bacterianas exclusivas de LAB, com uma abundância diferencial moderada (Figura 16A e B; Tabelas Suplementares 6 e 7). Estes táxons contribuíram para as diferenças na diversidade e composição da microbiota entre mosquitos de LAB e aqueles oriundos das localidades de campo e períodos de coleta.

**A**



| Taxa significativamente diferentes | W   | JDG | JDGF1 | JU | JUF1 | LAB | RPC | RPCF1 |
|------------------------------------|-----|-----|-------|----|------|-----|-----|-------|
| f_Acetobacteraceae                 | 202 |     |       |    |      |     |     |       |
| g_Propionibacterium                | 202 |     |       |    |      |     |     |       |
| c_Alphaproteobacteria              | 196 |     |       |    |      |     |     |       |
| g_Ralstonia                        | 190 |     |       |    |      |     |     |       |
| g_Erysipelothrix                   | 188 |     |       |    |      |     |     |       |
| g_Pedobacter                       | 188 |     |       |    |      |     |     |       |
| g_Rahnella                         | 187 |     |       |    |      |     |     |       |
| f_Peptostreptococcaceae            | 187 |     |       |    |      |     |     |       |
| g_Cupriavidus                      | 185 |     |       |    |      |     |     |       |
| f_Moraxellaceae;_                  | 183 |     |       |    |      |     |     |       |
| g_Stenotrophomonas                 | 182 |     |       |    |      |     |     |       |
| o_MLE1-12                          | 180 |     |       |    |      |     |     |       |
| g_Reyranelia                       | 174 |     |       |    |      |     |     |       |

**B**



| Taxa significativamente diferentes | W   | 2019-1 | 2019-2 | F1    | LAB   |
|------------------------------------|-----|--------|--------|-------|-------|
| g_Propionibacterium                | 202 | Green  | Green  | Green | Green |
| f_Acetobacteraceae                 | 202 | Green  | Grey   | Green | Green |
| g_Wolbachia                        | 202 | Green  | Green  | Green | Green |
| g_Methylobacterium                 | 202 | Green  | Green  | Green | Green |
| f_Peptostreptococcaceae            | 201 | Green  | Green  | Green | Green |
| c_Alphaproteobacteria              | 199 | Green  | Green  | Green | Green |
| f_Methylobacteriaceae              | 193 | Green  | Green  | Green | Green |
| g_Cupriavidus                      | 190 | Green  | Green  | Green | Green |
| f_Moraxellaceae                    | 187 | Green  | Green  | Green | Green |
| g_Pedobacter                       | 183 | Green  | Green  | Green | Green |
| g_Reyranelia                       | 183 | Green  | Green  | Green | Green |
| o_MLE1-12                          | 183 | Green  | Green  | Green | Green |
| g_Rahnella                         | 177 | Green  | Green  | Green | Green |
| o_Rhizobiales                      | 177 | Green  | Green  | Green | Green |
| g_Hydrocarboniphaga                | 177 | Green  | Green  | Green | Green |
| f_Rhodospirillaceae                | 174 | Green  | Green  | Green | Green |
| f_Sphingomonadaceae                | 172 | Green  | Green  | Green | Green |
| o_Sphingobacteriales               | 171 | Green  | Green  | Green | Green |
| g_Bdellovibrio                     | 171 | Green  | Green  | Green | Green |
| g_Ralstonia                        | 171 | Green  | Green  | Green | Green |
| f_Chitinophagaceae                 | 169 | Green  | Green  | Green | Green |

**Figura 16:** Os gráficos de Volcano ilustram os resultados de ANCOM referente às localidades (A) e períodos (B) analisados. Taxa considerados significantes estão marcados em verde. Quanto mais ao topo e à direita considera-se o táxon verdadeiramente diferente, de acordo com o teste W (eixo Y) e a estatística F de clr (eixo X). Os nomes de taxa significativamente diferentes estão expostos nas tabelas, assim como as localidades associadas (A) e períodos de coleta/processamento das amostras (B). Em verde: abundância diferencial elevada; Em cinza: Abundância diferencial moderada; Não preenchido: Abundância diferencial baixa ou indetectável. \**Cupriavidus* e *Reyranelia* tanto em local e período e *Chitinophagaceae* relacionado à período, tiveram uma abundância percentual abaixo de 100, mas foram considerados com uma abundância diferencial moderada por conta da abundância percentual nos outros grupos ser indetectável por sua grande maioria ser igual a 1 (Tabela Suplementar 6).

## 5. DISCUSSÃO

Sabe-se que a diversidade da microbiota de mosquitos pode ser influenciada por uma série de fatores, como vêm sendo mostrado para diferentes espécies de mosquitos vetores (Minard et al. 2013a; Romoli e Gendrin 2018; Scolari et al. 2019; Dada et al. 2021). Neste contexto, o efeito do ambiente é frequentemente estudado, pois este é uma fonte de microrganismos que colonizam os diferentes órgãos dos mosquitos (Buck et al. 2016; Thongsripong et al. 2017; Bennett et al. 2019a; Duguma et al. 2019). A influência do ambiente ocorre a partir de elementos que compõem a sua paisagem, tais como o criadouro larvar, fontes de alimentação açucarada e hospedeiros para o repasto sanguíneo de fêmeas, além da ação antrópica, temperatura e umidade (Zouache et al. 2011; Dickson et al. 2017; Novakova et al. 2017; Guégan et al. 2018a; Sarma et al. 2022).

Assim, o presente trabalho investigou a influência da paisagem na estrutura da microbiota intestinal de três populações de *Ae. albopictus* do estado do Rio de Janeiro (Brasil). A diversidade bacteriana também foi determinada em mosquitos da geração F1 de laboratório, estabelecida a partir da coleta de ovos nas respectivas localidades de campo, e de uma colônia mantida há mais de dez anos no insetário. Os níveis de diversidade e a composição da microbiota de fêmeas adultas não variaram de acordo com a localidade e população dos mosquitos, porém diferiu em relação ao período de coleta e à origem dos insetos, ou seja, se foram criados em campo ou laboratório. Neste cenário, discutimos a abundância diferencial de táxons bacterianos entre os grupos de mosquitos e detectamos uma possível relação de co-exclusão entre o endossimbionte *Wolbachia* e bactérias intestinais da família Acetobacteraceae.

Dada a importância do ambiente para a determinação da microbiota dos mosquitos, estudos com populações naturais de *Ae. albopictus* retratam a microbiota do hospedeiro em seu habitat natural (Romoli e Gendrin 2018) e permitem comparar populações de diferentes locais. Embora estudos que investigam a diversidade da microbiota de *Ae. albopictus* vêm sendo executados mundialmente (Minard et al. 2014; Kang et al. 2020; Lee et al. 2020; Medeiros et

al. 2021; Tuanudom et al. 2021), sobretudo na Ásia, Europa e Estados Unidos, poucos foram feitos na América Latina.

No presente estudo, a diversidade bacteriana da microbiota intestinal não apresentou diferenças significativas quanto à localidade de coleta das fêmeas de *Ae. albopictus*. Esse achado contrariou nossas expectativas, uma vez que selecionamos locais com distintos graus de urbanização e separados por uma distância de 16,5 a 20km. Publicações anteriores indicaram que a microbiota de mosquitos coletados em diferentes áreas geográficas pode variar espacialmente (Bascuñán et al. 2018; Muturi et al. 2018; Duguma et al. 2019; Bogale et al. 2020), com maior diversidade em localidades urbanas do que rurais (Akorli et al. 2016; Thongsripong et al. 2017). Variações geográficas na composição da microbiota foram descritas também para populações de *Ae. albopictus* do Haváí e da China (Kang et al. 2020; Seabourn et al. 2020). Por outro lado, outros trabalhos apontaram para uma fraca ou nenhuma contribuição da localidade de coleta para os níveis de diversidade e estruturação da microbiota desses insetos (Novakova et al. 2017; Bennett et al. 2019a; Arévalo-Cortés et al. 2020), com ausência de correlação, por exemplo, entre a diversidade da microbiota de populações de *Ae. albopictus* da ilha de O’ahu (Haváí) e o nível de urbanização (Medeiros et al. 2021).

Tais achados, aparentemente contrastantes, podem ser explicados tanto por diferenças metodológicas, quanto por variações ecológicas entre populações de *Ae. albopictus* de locais distintos. Seabourn e colaboradores (2020) descreveram uma diferença significativa na riqueza, mas não na equitabilidade da microbiota de fêmeas de *Ae. albopictus* entre as localidades amostradas. Já Lee e colaboradores (2020) não observaram diferenças significativas para as métricas de diversidade alfa calculadas para a microbiota de *Ae. albopictus* coletados em locais com diferentes paisagens na Malásia. Porém, ao comparar a diversidade beta entre as amostras, notou uma discriminação por localidade considerando ou não *Wolbachia* nas análises (Lee et al. 2020).

Vale ressaltar que estes estudos utilizaram mosquitos inteiros, o que pode influenciar a diversidade bacteriana encontrada. Por exemplo, órgãos como intestino e glândulas salivares, apresentam microbiota distinta (Sharma et al. 2014; Tchioffo et al. 2016; Mancini et al. 2018). A carga de *Wolbachia* também varia entre os tecidos, com maior concentração nos órgãos reprodutivos

(Zouache et al. 2009). Aqui escolhemos determinar a microbiota bacteriana do intestino médio por este órgão ser a porta de entrada de patógenos provindos da alimentação sanguínea. Deste modo, o contato inicial de arbovírus e parasitas com a microbiota do mosquito hospedeiro pode definir, ao menos parcialmente, a infectividade destes vetores (Jupatanakul et al. 2014).

Em Hainan (China), a diversidade da microbiota intestinal de diferentes espécies de mosquitos, incluindo *Ae. albopictus*, variou de acordo com a localidade, com distinção entre *Ae. albopictus* de uma localidade urbana e de uma rural (Kang et al. 2020). Por utilizar uma metodologia similar à nossa, acreditamos que as diferenças em nossos resultados podem ser explicadas pela ecologia de populações chinesas e brasileiras de *Ae. albopictus*. Sabe-se que *Ae. albopictus* é um mosquito frequentemente encontrado em ambientes urbanos na China, onde utiliza majoritariamente criadouros artificiais (Li et al. 2014). Inclusive, é considerado vetor primário de dengue em diversas regiões (Wu et al. 2010; Li et al. 2014; Metelmann et al. 2021).

Já no Brasil, *Ae. albopictus* é associado fortemente com a presença de vegetação, sendo considerado um mosquito da borda de mata (Pereira dos Santos et al. 2018). Apesar de nossas coletas terem ocorrido em uma floresta, uma comunidade carente e um bairro residencial, todos locais possuem áreas de vegetação. Ou seja, *Ae. albopictus* possivelmente faz uso de criadouros naturais ali presentes. Sabendo que o tipo de criadouro influencia a composição da microbiota de mosquitos adultos (Dickson et al. 2017), isso poderia explicar a similaridade que observamos entre os insetos dos diferentes bairros.

Outra possível explicação para as diferenças entre Kang e colaboradores (2020) e o nosso estudo provavelmente é a distância entre as localidades amostradas, uma vez que o grupo chinês coletou mosquitos em pontos mais distantes, separados por pelo menos 47 km. Grandes escalas geográficas podem tornar a região de coleta um importante modulador da diversidade da microbiota de mosquitos (Novakova et al. 2017; Schrieke et al. 2022), pois favorecem diferenças climáticas. Umidade e temperatura, por exemplo, podem influenciar a presença e abundância de táxons bacterianos no intestino destes insetos (Novakova et al. 2017; Medeiros et al. 2021).

Apesar da proximidade geográfica, temperatura e umidade provavelmente serem similares entre os bairros aqui amostrados, estes variaram entre os

períodos de coleta. Em 2019, nas localidades amostradas, a temperatura e precipitação foram em média 27,3°C e 0,3 mm durante a estação chuvosa (2019-1) e 20,3°C e 0,1 mm durante a estação seca (2019-2). Esta hipótese climática poderia explicar o efeito significativo do período na diversidade da microbiota intestinal de *Ae. albopictus*: maior diversidade e riqueza de ASVs em 2019-1 do que em 2019-2 e maior heterogeneidade intragrupo para 2019-2. Este achado corrobora variações ao longo do tempo já descritas para a microbiota de mosquitos do gênero *Anopheles* (Akorli et al. 2016; Krajacich et al. 2018; Sandeu et al. 2022) e *Ae. albopictus* (Wang et al. 2018).

Entretanto, para os anofelinos, observou-se maior diversidade da microbiota durante a estação seca (Akorli et al. 2016; Sandeu et al. 2022). Isso poderia ser explicado por diferenças ecogeográficas, já que *An. gambiae* e *An. coluzzi* foram coletados em Gana e Camarões, em localidades urbanas, rurais e florestais (Akorli et al. 2016; Sandeu et al. 2022). Portanto, trata-se de diferentes espécies de culicídeos, com ecologia e criadouros distintos (anofelinos depositam ovos em corpos d'água no solo), oriundas de continentes variados, com vegetação e clima diferentes do Brasil. Para *Ae. albopictus* coletados na China, a microbiota bacteriana dos adultos e criadouros também foi instável ao longo do tempo, com uma ausência de estabilidade temporal entre os anos de 2013 e 2014, principalmente em criadouros e mosquitos oriundos de habitats de pneus descartados (Wang et al. 2018). Assim, de forma geral, mudanças sazonais podem alterar a paisagem, o hábitat de mosquitos vetores e a diversidade bacteriana local, conferindo um caráter dinâmico à microbiota dos insetos de campo (Novakova et al. 2017).

Em termos de composição da microbiota, os gêneros bacterianos *Ralstonia* e *Methylobacterium* foram diferencialmente abundantes entre os períodos de coleta, aumentando sua presença em *Ae. albopictus* durante a estação chuvosa (2019-1), assim como observado para *Ralstonia* na microbiota de *An. coluzzi* do Mali (Krajacich et al. 2018). Compreender quais fatores ambientais e sazonais influenciam a presença ou ausência de bactérias específicas na microbiota intestinal de mosquitos é relevante, por exemplo, para abordagens que visam utilizar bactérias para reduzir a transmissão de patógenos por mosquitos em campo, tal como a paratransgênese (Wilke e Marrelli 2015).

Contudo, *Ralstonia* foi encontrada raramente nas amostras de laboratório de *An. coluzzi* (Krajacich et al. 2018), o que se diferencia de nossos resultados, uma vez que este um táxon apresentou uma abundância diferencial moderada nas amostras F1 e LAB. De forma similar, *Methylobacterium* foi uma bactéria dominante no intestino de *Ae. albopictus* criados em laboratório na China (Lin et al. 2021), enquanto que em nosso estudo esteve ausente ou indetectável em mosquitos de F1 e LAB. Esta diferença pode ser explicada por se tratarem de populações distintas de hospedeiros, métodos diferentes de criação em laboratório, por exemplo, quanto à alimentação das larvas, cuja dieta pode impactar a composição da microbiota dos adultos (MacLeod et al. 2021). No estudo de Lin e colaboradores (2021) as larvas foram alimentadas com mistura de hidrolisado de lactalbumina, ração de rato e levedura de cerveja, enquanto utilizamos ração de peixe comercial.

Além do período de coleta, notamos diferenças significativas na riqueza e diversidade da microbiota intestinal segundo a origem dos mosquitos: se coletados em campo já adultos ou se foram criados em laboratório. A maior diversidade e riqueza do primeiro grupo em relação ao segundo vai de encontro a estudos anteriores com *Ae. albopictus* (Hegde et al. 2018; Ranasinghe et al. 2021; Tuanudom et al. 2021), outras espécies de mosquitos vetores (Rani et al. 2009; Boissière et al. 2012; Hegde et al. 2018; Birnberg et al. 2021; Steven et al. 2021) e insetos de outras ordens, como *Periplanata americana*, *Periplanata fuliginosa* (Tinker e Ottesen 2021) e *Drosophila* spp. (Brown et al. 2021).

A queda na diversidade e riqueza em mosquitos de laboratório pode ser em função da dieta, que é padronizada tanto para larvas e adultos. A ingestão de açúcares ou sangue afeta a microbiota de *Ae. albopictus* criados em laboratório (Chen et al. 2020). Em nosso experimento, os mosquitos de laboratório foram alimentados estritamente com glicose 10%, enquanto os de campo foram processados sem qualquer tipo de alimentação. Além disso, apesar de termos selecionado apenas fêmeas não ingurgitadas com sangue no momento da coleta, não tínhamos nenhum controle a respeito da sua dieta prévia no campo. A alimentação de fêmeas de mosquitos em diferentes fontes sanguíneas pode afetar a diversidade da microbiota intestinal (Muturi et al. 2021). Por exemplo, *Ae. aegypti* de campo alimentados de sangue humano apresentaram uma maior diversidade e riqueza na microbiota em relação

àqueles que se alimentaram em fontes sanguíneas não-humanas ou não foram alimentados com sangue (Sarma et al. 2022).

Sabendo que *Ae. albopictus* é um mosquito oportunista e com certa antropofagia (Kamgang et al. 2012; Faraji et al. 2014; Pereira dos Santos et al. 2018), a maior diversidade e riqueza de mosquitos de campo poderia ser em parte explicada pela realização de repastos sanguíneos em humanos. Outra limitação é que não sabemos a idade dos mosquitos coletados em campo, enquanto mosquitos criados em laboratório foram processados com 6-7 dias de vida. A idade é um fator que impacta na diversidade da microbiota de *Ae. albopictus*, favorecendo táxons específicos de acordo com o estado fisiológico do mosquito (recém-emergido, jovem, mais velho) (Chen et al. 2020).

A queda na diversidade da microbiota de *Ae. albopictus* com apenas uma geração em laboratório se assemelha ao visto para *An. albimanus* da Guatemala: homogeneização da microbiota intestinal de fêmeas adultas após uma geração em laboratório (Dada et al. 2021a) Curiosamente, isso não foi observada em *An. atroparvus* da Espanha, onde mosquitos em F2 apresentaram uma diversidade e riqueza superior a mosquitos coletados em campo (F0), com esta decaindo apenas na geração F10, se equiparando com F0 (Birnberg et al. 2021).

Algumas ressalvas devem ser feitas a respeito dos dois trabalhos citados acima. Dada e colaboradores (2021a) processaram intestinos de mosquitos adultos em *pools* de três órgãos por amostra, além de compararem mosquitos coletados de campo de quatro localidades com seus respectivos F1. Já Birnberg e colaboradores (2021) utilizaram *pools* de vinte espécimes de mosquitos inteiros para a análise da microbiota e, como representação de colonização recente em laboratório, fez-se o uso da segunda geração (F2) em vez da primeira (F1). Com a ressalva da utilização de *pools*, a metodologia de Dada e colaboradores (2021a) é mais comparável à nossa, pois o uso de mosquitos inteiros pode influenciar a diversidade bacteriana captada, como discutido anteriormente (Mancini et al. 2018). Também não sabemos como o uso de F2 e não F1 poderia influenciar os resultados.

No presente estudo, optamos por utilizar intestinos individualizados, visto que existe marcada variação individual na composição da microbiota destes insetos (Osei-Poku et al. 2012; Bennett et al. 2019a). Em contraste, alguns estudos utilizam *pools*, unindo mais de um inseto em uma mesma amostra



(Duguma et al. 2019; Birnberg et al. 2021; Lin et al. 2021; Medeiros et al. 2021). Embora esta prática aumente a quantidade de espécimes analisados, reduzindo o custo do sequenciamento por indivíduo (Dada et al. 2021b), pode afetar os níveis de diversidade alfa e beta em comparação ao uso de amostras individualizadas, por estar processando indivíduos com diferentes níveis de abundância para táxons específicos. Além disso, pode superestimar o *core* microbiano, incluindo táxons que estão presentes em poucos mosquitos, mas que por serem detectados a partir de um *pool* são incluídos no *core* (Rodríguez-Ruano et al. 2020).

Por outro lado, amostras de intestinos individualizados apresentam baixa biomassa e são mais suscetíveis aos efeitos da contaminação (Eisenhofer et al. 2019) por microrganismos provindos do ambiente laboratorial, manipulação humana, contaminação cruzada e no processo de extração através de kits e reagentes (usualmente chamado de “kitoma”) (Salter et al. 2014; Eisenhofer et al. 2019; Paniagua Voirol et al. 2021). Mesmo adotando boas práticas de laboratório e protocolos específicos para microbiota (Eisenhofer et al. 2019; Dada et al. 2021b), nossos controles negativos da extração de DNA apresentaram sequências. Assim, aplicamos um método estatístico de descontaminação *in silico* para remover possíveis contaminantes (McKnight et al. 2019), como feito anteriormente em outros estudos de microbiota de mosquitos (Minard et al. 2015; Díaz et al. 2021b; Schrieke et al. 2022). A partir disso, ressaltamos a necessidade de padronização de métodos de descontaminação durante a análise de dados provindos de amostras de baixa biomassa.

É importante ressaltar que a queda na riqueza e diversidade de laboratório em comparação com os insetos de campo foi observada apenas no grupo F1. Por outro lado, as métricas de diversidade alfa indicaram que os níveis de diversidade e riqueza foram similares entre os mosquitos de campo e de LAB, oriundos de uma colônia de laboratório estabelecida há mais de 10 anos (>F20).

Assim, a mudança brusca de ambiente do campo para o laboratório pode ter ocasionado um remodelamento na estrutura da microbiota intestinal de *Ae. albopictus*, com perda de bactérias provindas do campo e manutenção dos táxons dominantes ou resistentes a esta mudança. Além disso, simbiontes que não favorecem a adaptação do hospedeiro a um novo ambiente tendem a

desaparecer e novos podem emergir de acordo com as condições de criação (Chen et al. 2020). O que vai de encontro com a teoria do holobionte, em que podemos considerar mosquitos e seus microrganismos simbiotes como entidades biológicas únicas (Zilber-Rosenberg e Rosenberg 2008).

Adicionalmente, com o passar das gerações, o intestino provavelmente é colonizado por táxons bacterianos adaptados à alimentação, água de criação e condições de temperatura e umidade de um insetário, que são minuciosamente controladas. Até que com o passar das gerações, em determinado momento, táxons mais dominantes são deslocados desta posição, possibilitando a presença de outros que se adaptam gradativamente ao microambiente intestinal de um mosquito de laboratório, restaurando assim a diversidade inicialmente perdida. Estudos que comparam mosquitos de campo com suas respectivas colônias de laboratório por vários anos são necessários para testar essa hipótese e determinar quando e se a diversidade da microbiota é restaurada nas diferentes espécies de mosquitos.

Um estudo comparando *Ae. aegypti* criados com a água do criadouro natural (G0) com até cinco gerações em laboratório detectaram uma queda na diversidade de acordo com o passar das gerações. Na terceira geração (G3) houve a queda mais acentuada, em função do amplo domínio do táxon *Burkholderiales*, com as duas gerações seguintes restabelecendo os níveis de diversidade anteriores, mas não ao de G0 (Jarusevicius 2018). Estes dados sugerem uma variação na diversidade, de acordo com o passar das gerações em laboratório, similar a hipótese que descrevemos anteriormente.

Não obstante, apesar das diferenças nos níveis de diversidade, as amostras de laboratório e F1 de campo se agrupam na PCoA em um único grupo que se diferencia das amostras de campo (Figura 14). Isso indica que as fêmeas de F1 de campo possuem uma composição de microbiota mais similar às de laboratório do que aos insetos coletados no campo.

Diferenças na composição da microbiota de *Ae. albopictus* de campo em relação aos colonizados em laboratório pode criar um viés nos resultados de experimentos de competência vetorial. Isso devido a: inviabilidade em realizar ensaios de infecção com mosquitos coletados no campo; a microbiota influenciar na competência vetorial para arbovírus (Jupatanakul et al. 2014; Hegde et al. 2015). Principalmente em mosquitos em geração F1 que pela queda na

diversidade da microbiota e mudança em sua composição pode influenciar nas taxas de infecção, disseminação e transmissão viral. Uma alternativa para tentar contornar este viés pode ser a coleta de formas imaturas em campo e criação em laboratório com a água do criadouro natural. Esta metodologia permitiu a conservação da diversidade e riqueza da microbiota de *An. gambiae* (F10), com a manutenção de 50% de famílias bacterianas encontradas em mosquitos de campo (Akorli et al. 2019).

Uma limitação de nosso estudo é a ausência no grupo F1 de mosquitos oriundos da coleta da estação chuvosa (2019-1), o que pode levantar a hipótese de que a queda nos níveis de diversidade pode não ter sido em função da mudança de campo para laboratório, uma vez que as métricas de diversidade da microbiota das amostras da estação seca de campo (2019-2) não foram significativamente diferentes do grupo F1. Porém, houve diferenças significativas entre os períodos e F1 para a diversidade beta (inclusive entre 2019-2 e F1), indicando uma mudança na composição da microbiota dos mosquitos de F1 (com microbiota mais similar ao grupo LAB) em relação aos dois períodos de coleta de campo.

Diferentes coortes (grupos da mesma colônia obtidos em momentos diferentes) de laboratório de *Ae. albopictus* apresentaram diferenças em sua microbiota intestinal. Este resultado indica que o momento em que as colônias são criadas no insetário pode influenciar a diversidade da microbiota dos mosquitos, pois esta está sujeita a mudanças no microambiente do laboratório (Saab et al. 2020). Para testar esta hipótese, é preciso analisar a microbiota de mosquitos coletados em um determinado período no campo e de outros da mesma geração (coletados na fase de ovo) criados em diferentes momentos no insetário.

Comparamos também a microbiota de fêmeas de *Ae. albopictus* quanto à população, ou seja, todas as amostras de insetos oriundos do mesmo local, independentemente do período de coleta ou da colonização em laboratório. Assim, esperávamos observar indiretamente um possível efeito da genética nos níveis de diversidade e composição da microbiota intestinal de *Ae. albopictus*. Porém, não encontramos diferenças na microbiota entre as populações, somente destas em relação ao grupo da colônia de laboratório. Isso pode ser explicado possivelmente por uma perda de variabilidade genética destes

mosquitos após a criação por mais de 20 gerações em laboratório, como visto para uma colônia de *An. darlingi* (F21) em comparação a mosquitos da mesma espécie coletados em campo (Conn et al. 2015).

Contudo, não podemos afirmar que as diferenças foram causadas pela genética dos mosquitos, uma vez que não foram realizadas análises de diversidade e estruturação genética das populações estudadas. Para *Ae. albopictus* da cidade de São Paulo foram identificados dois grupos geneticamente distintos com pouco fluxo gênico entre si a partir da análise de mosquitos de dez parques urbanos com distâncias variando de 5 a 39,5 km (Multini et al. 2019). A aplicação de uma abordagem similar com as populações de *Ae. albopictus* do Rio de Janeiro e de LAB permitiria correlacionar melhor a diversidade genética destes mosquitos com a diversidade da microbiota intestinal.

Uma correlação positiva entre a diversidade genética e a diversidade da microbiota dos hospedeiros foi observada para populações francesas e vietnamitas de *Ae. albopictus* utilizando mosquitos de campo (Minard et al. 2015). Porém, essa correlação não se manteve em condições controladas de laboratório, sendo o tamanho corporal, sexo e o ambiente de criação determinantes da diversidade da microbiota das populações analisadas (Minard et al. 2018). Para testar a influência da genética na composição da microbiota, cepas de *Ae. aegypti* originadas de diferentes países e gerações em laboratório foram criadas no mesmo insetário e apresentaram uma microbiota similar. Assim, o efeito do ambiente foi mais significativo, em relação a genética, na definição do perfil da microbiota desses mosquitos (Dickson et al. 2018). Resultados similares foram encontrados para três cepas distintas de *Glossina palpalis gambiensis* criadas nas mesmas condições de laboratório (Doudoumis et al. 2018).

Até mesmo para espécies distintas, composição e diversidade da microbiota podem ser definidas primordialmente pelo ambiente e não por fatores genéticos, visto que *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* demonstraram similaridades na microbiota do intestino médio quando criados nas mesmas condições em laboratório (Lin et al. 2021). O intestino humano também segue um padrão similar, com a influência de fatores ambientais dominando o efeito da genética do hospedeiro na formação da microbiota intestinal (Rothschild et al. 2018).

Entretanto, não é excluído completamente o papel do genótipo do hospedeiro na formação da microbiota. A variação genética em genes da imunidade de *An. gambiae* foi correlacionada com a composição da microbiota intestinal destes mosquitos (Stathopoulos et al. 2014). Deste modo, interações entre o sistema imune dos mosquitos e sua microbiota ocorreriam de forma recíproca, em que os táxons bacterianos ativariam vias específicas da imunidade, enquanto o sistema imune modularia a presença destas e outras bactérias, modificando a composição e níveis de diversidade microbiana intestinal (Rodgers et al. 2017a). De forma similar, a genética de camundongos demonstrou influência na microbiota intestinal, visto que o *core* microbiano demonstrou-se regulado por uma complexa rede de ativação poligênica (Benson et al. 2010). Para *D. melanogaster*, um efeito gargalo induzido em laboratório afetou a diversidade e riqueza bacteriana da microbiota intestinal (Ørsted et al. 2022).

Quanto à composição taxonômica bacteriana, a microbiota de fêmeas de *Ae. albopictus* foram dominadas por quatro filos: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes (Figura 15A). Estes são filos frequentemente dominantes na microbiota de diferentes espécies de mosquitos (Wang et al. 2011; Minard et al. 2013a; Coon et al. 2014, 2016b; Buck et al. 2016; Strand 2018; Scolari et al. 2019), inclusive em adultos e larvas de *Ae. albopictus* (Coon et al. 2016b; Yadav et al. 2016; Bennett et al. 2019a; Lin et al. 2021). Proteobacteria foi o filo mais abundante, independentemente de os mosquitos serem de campo ou laboratório, o que está de acordo com o descrito para populações chinesas de *Ae. albopictus* (Kang et al. 2020; Lin et al. 2021). Porém, este resultado diverge do observado para *Ae. albopictus* da Tailândia, onde a microbiota de espécimes de laboratório foi predominantemente dominada por Actinobacteria (Tuanudom et al. 2021).

As bactérias do filo Proteobacteria são em grande parte Gram-negativas e possuem a capacidade de colonizar diferentes tecidos dos insetos (Jones et al. 2013), incluindo mosquitos do gênero *Aedes* (Scolari et al. 2019). Este filo também é dominante na microbiota intestinal de mamíferos (Ley et al. 2008), o que mostra sua ubiquidade na microbiota de diferentes animais.

Diversos estudos a respeito da microbiota de mosquitos utilizando, por exemplo, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. koreicus*, *An. gambiae*, *Cx.*

*quinquefasciatus* e *Mansoni uniformis* descreveram uma alta variabilidade inter-individual (Wang et al. 2011; Boissière et al. 2012; Osei-Poku et al. 2012; Rosso et al. 2018; Arévalo-Cortés et al. 2020). Assim, certos táxons bacterianos podem estar em alta abundância em um indivíduo, enquanto são ausentes ou raros em outros de uma mesma espécie/população/grupo. Esta variação pode ser melhor notada em níveis taxonômicos inferiores (Boissière et al. 2012; Osei-Poku et al. 2012; Arévalo-Cortés et al. 2020). Neste estudo, é notável nos níveis de família e gênero, mesmo considerando mosquitos do mesmo grupo. Essa variabilidade é difícil de ser explicada, podendo ser associada a variáveis ambientais ligadas ao criadouro larvar e/ou ao habitat do mosquito (Bennett et al. 2019a).

Ainda não estão totalmente claros os efeitos da variação na composição da microbiota intestinal na biologia dos mosquitos. Possivelmente, esta heterogeneidade pode influenciar a resistência a inseticidas (Arévalo-Cortés et al. 2020), competência vetorial (Dennison et al. 2014) e assimilação de nutrientes (Guégan et al. 2020b). Por exemplo, essa variação poderia explicar por que alguns mosquitos expostos a um repasto sanguíneo infeccioso para um arbovírus não se infectam. Assim, estes insetos poderiam ter em sua microbiota bactérias que impactam negativamente ou positivamente o desenvolvimento de arbovírus no intestino médio. Neste contexto, foi visto que três cepas de *Ae. aegypti* com diferentes susceptibilidades ao DENV exibiam diferenças na abundância de táxons específicos de bactérias da microbiota, levantando a hipótese de que a variação na abundância relativa destes microrganismos poderia estar associada com o fenótipo de susceptibilidade ao vírus (Charan e Pawar 2013).

*Wolbachia* foi uma bactéria que apresentou marcada variação entre indivíduos de campo. Por vezes, apresentou-se como o táxon dominante, em outras com uma abundância intermediária à baixa ou indetectável. Por outro lado, esteve ausente ou indetectável na maioria dos mosquitos de F1. Essa variação da abundância de *Wolbachia* já foi observada no intestino de fêmeas adultas de *Ae. albopictus* oriundas de diferentes países como Itália, Vietnã e França (Rosso et al. 2018).

A ausência ou abundância baixa pode ser explicado pelo fato de que as cepas nativas de *Wolbachia* de *Ae. albopictus* (wAlbA e wAlbB) possuem uma baixa densidade no intestino médio em comparação a outros tecidos (Zouache

et al. 2009; Minard et al. 2015; Mancini et al. 2020; Lin et al. 2021). Em contrapartida, ambas as cepas possuem uma densidade maior nos ovários (Zouache et al. 2009), o que acredita-se que seja por conta de *Wolbachia* e *Ae. albopictus* terem estabelecido uma relação de coevolução. A maior concentração da bactéria nos órgãos reprodutivos do mosquito hospedeiro confere uma vantagem para a disseminação do endossimbionte por incompatibilidade citoplasmática e transmissão materna (Dobson et al. 2002, 2004), além de reduzir os estímulos ao sistema imune basal, favorecendo a manutenção do *fitness* de *Ae. albopictus* (Molloy e Sinkins 2015).

Essa variação interindividual na carga de *Wolbachia* também poderia ser explicada pela idade dos mosquitos de campo. *Ae. albopictus* mais velhos possuem menor densidade de ambas as cepas da bactéria (Tortosa et al. 2010; Calvitti et al. 2015), portanto uma baixa abundância de *Wolbachia* poderia ocorrer em indivíduos mais longevos. Além disso, fatores ambientais também podem afetar a abundância deste endossimbionte. Porém, não acreditamos que a temperatura ambiental seja um desses fatores, pois as cepas *walbA* e *walbB* são resistentes a altas temperaturas (Mancini et al. 2020). Ademais, não houve abundância diferencial de *Wolbachia* entre os dois períodos de coleta.

Uma outra hipótese seria a exposição de *Ae. albopictus* a antibióticos em campo. *Ae. aegypti* infectados artificialmente com a cepa *wAlbB* exibiram uma redução da densidade do endossimbionte após a exposição por clortetraciclina em concentrações em nível ambiental (Endersby-Harshman et al. 2019). Sabe-se que quando mosquitos realizam repastos sanguíneos em sangue humano, contendo antibióticos, sofrem uma disbiose em sua microbiota intestinal, que consiste em uma perturbação que leva a uma mudança drástica na composição das comunidades bacterianas (Gendrin et al. 2015). Assim, *Ae. albopictus* podem ter sido expostos a antibióticos via repasto em humanos ou devido à presença de antimicrobianos de origem antrópica na água de criadouro.

A resistência a antibióticos de *Wolbachia* de mosquitos ainda não foi completamente investigada, mas dados recentes apontam para possíveis fenótipos de resistência em linhagens da bactéria que infectam *Nasonia vitripennis* e *Brugia pahangi* (Liu et al. 2014; Gunderson et al. 2020). Não obstante, a resistência a diferentes antibióticos, incluindo tetraciclina, foi descrita para diversos táxons bacterianos e fúngicos da microbiota de *Ae. aegypti* de uma

colônia de laboratório e *Coquillettidia perturbans* e *Ochlerotatus canadensis* coletados em campo (Hyde et al. 2019). Dentre os táxons bacterianos resistentes, estão alguns encontrados em nosso estudo entre os doze mais abundantes, como as famílias Bacillaceae, Enterobacteriaceae, e Xanthomonadaceae e o gênero *Pseudomonas*.

A interação ecológica entre microrganismos também vem sendo apontada como capaz de alterar a composição da microbiota de mosquitos. Dessa forma, hipotetizamos que a abundância elevada da família Acetobacteraceae poderia explicar a ausência/redução de *Wolbachia* nos grupos F1 de campo. Esta família bacteriana mostrou abundância diferencial significativa, sendo predominante nos grupos F1 de campo e laboratório, de abundância moderada em mosquitos do Jardim Guanabara (JDG) e ausente ou indetectável nos demais grupos de campo.

Acetobacteraceae compreende as bactérias do ácido acético (BAA), Gram-negativas aeróbias que realizam a oxidação de etanol em ácido acético, sendo representadas pelos gêneros: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Kozakia* (Kerstens et al. 2006). As BAA são frequentemente encontradas em insetos com dietas ricas em açúcar, colonizando diferentes órgãos e tecidos, dentre eles o intestino. A presença de açúcares a serem digeridos, pH ácido e a capacidade destas bactérias produzirem uma matriz extracelular de polissacarídeos, possibilitando o contato com as células epiteliais intestinais sem que o sistema imune basal seja ativado, favorecem a colonização deste órgão por esta bactéria (Crotti et al. 2010).

Dentre estas bactérias, *Asaia* e *Gluconobacter* já foram encontradas em campo e laboratório no intestino de *Ae. albopictus* de diferentes populações (Minard et al. 2013b; Rossi et al. 2015; Muturi et al. 2017b; Chen et al. 2020; Díaz et al. 2021a; Pereira et al. 2021), além de outras espécies, como *An. coluzzi* (Krajacich et al. 2018), *An. stephensi* (Favia et al. 2007) e *Ae. aegypti* (Lin et al. 2021). Considerando que colônias de laboratório são regularmente alimentadas com soluções açucaradas, estas podem ser uma fonte de aquisição e transmissão destas BAA entre os mosquitos (Saab et al. 2020).

A presença de *Asaia* já foi correlacionada negativamente com *Wolbachia*, numa relação de exclusão mútua nos tecidos reprodutivos de *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *An. gambiae* e *Cx. quinquefasciatus* (Hughes et al. 2014b; Rossi et al.



2015). Essa ausência ou redução de *Wolbachia* na presença de *Asaia* pode ser influenciada pela dieta, estágio de desenvolvimento e inseminação ou não das fêmeas analisadas (Chen et al. 2020; Díaz et al. 2021a). Em nosso trabalho utilizamos fêmeas criadas em laboratório e alimentadas apenas com solução 10% de glicose e, como foram mantidas junto com machos em gaiolas por 6-7 dias, é muito provável que tenham acasalado. Outros estudos suportam esta co-exclusão entre *Wolbachia* e *Asaia* em *Ae. albopictus*, além de outras envolvendo *Wolbachia* e gêneros encontrados em nosso trabalho como *Acinetobacter* e *Pseudomonas* (Hegde et al. 2018; Lee et al. 2020; Lin et al. 2021). Para *D. melanogaster* também há indícios de uma correlação negativa entre a cepa wMel de *Wolbachia* e *Acetobacter*, uma bactéria da família Acetobacteraceae (Simhadri et al. 2017; Rudman et al. 2019).

Apesar da suspeita da co-exclusão entre *Asaia* e *Wolbachia*, alguns espécimes do grupo de laboratório (LAB) apresentam abundância considerável de ambas as bactérias. Acreditamos que isso seja em função do longo período que esta colônia está sendo mantida em laboratório, o que facilitaria o estabelecimento de novos táxons bacterianos na microbiota intestinal a partir deste ambiente e mudanças nas interações entre microrganismos, favorecendo o retorno de *Wolbachia* e outras bactérias, mesmo na presença de Acetobacteraceae. Esta hipótese é suportada pelos maiores níveis de diversidade e riqueza no intestino dos mosquitos de laboratório com sucessivas gerações em relação aos de uma geração F1, onde a queda na diversidade e a dominância Acetobacteraceae podem ter favorecido a exclusão de *Wolbachia*. Neste cenário, os mecanismos moleculares bacterianos que favorecem a presença ou a ausência de determinados táxons microbianos ainda necessitam ser investigados.

Entretanto, frisamos que não é possível assumir que as sequências que detectamos referentes à família Acetobacteraceae são de *Asaia*, uma vez que o fragmento amplificado do gene 16S rRNA de 240bp não discrimina os gêneros *Asaia*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*. Ademais, Chouaia e colaboradores (2010) demonstraram que diferentes cepas de *Asaia* podem colonizar uma mesma espécie de mosquito, incluindo *Ae. albopictus* (Chouaia et al. 2010). Deste modo, a correta identificação e a caracterização genética das BAAs são

necessárias para se investigar melhor a interação destes microrganismos com diferentes cepas de *Wolbachia*.

Apesar da heterogeneidade individual, as fêmeas de *Ae. albopictus* analisadas, apresentam uma microbiota *core* composta pelas famílias Enterobacteriaceae, Halomonadaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae e a ordem Actinomycetales. Enterobacteriaceae é um grupo também presente na microbiota de *An. gambiae*, *An. coluzzi*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. pippiens*, *Ae. aegypti*, *Ae. koreicus*, *Ae. triseriatus*, *Ae. vexans* (Boissière et al. 2012; Gimonneau et al. 2014; Dickson et al. 2017; Muturi et al. 2017b; Alfano et al. 2019; Duguma et al. 2019), além de outros insetos (Chandler et al. 2011; Gupta et al. 2012; Minard et al. 2019; Moro et al. 2021). Esta família reúne gêneros bacterianos frequentemente associados à *Ae. albopictus*, tais como: *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea*. (Valiente Moro et al. 2013; Wang et al. 2018; Chen et al. 2020; Seabourn et al. 2020).

Outra família integrante da microbiota *core* foi Halomonadaceae, que já foi detectada também na microbiota de *Cx. tarsalis*, *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* (Duguma et al. 2015; Ramos-Nino et al. 2020). Em nosso trabalho, teve como gênero representativo *Halomonas*, encontrada anteriormente em elevada abundância relativa na microbiota intestinal de *Ae. albopictus* coletados em campo nos Estados Unidos (Hegde et al. 2018). Este gênero de bactérias é considerado halotolerante, ou seja, sobrevive em ambientes com alta concentração salina (Chen et al. 2017). Isto pode ser considerado uma vantagem em detrimento de outras bactérias na água do criadouro larvar quando esta apresenta uma salinidade elevada. Ademais, seria interessante investigar melhor os aspectos bioquímicos do intestino de mosquitos, como a concentração salina neste tecido e associação com a proliferação de bactérias específicas, tais como *Halomonas* spp.

As famílias Pseudomonadaceae e Moraxellaceae tiveram como gêneros mais representativos em nosso trabalho *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, respectivamente. Apesar de não terem apresentado uma abundância dominante, foram constantes em quase todas as amostras intestinais analisadas. Estas bactérias são comumente encontradas no *core* de diferentes espécies de mosquitos vetores, como *Ae. aegypti*, *Anopheles* spp. e *Ae. albopictus* (Rani et al. 2009; Wang et al. 2011; David et al. 2016; Tchioffo et al. 2016; Yadav et al.

2016; Rosso et al. 2018). Sua ampla distribuição, que vai além do intestino médio, indica que *Pseudomonas* e *Acinetobacter* podem ser bactérias que fazem parte da pan microbiota, que consiste na microbiota compartilhada por diferentes espécies de mosquito, independentemente da origem geográfica (Guégan et al. 2018b).

*Pseudomonas* pode ser adquirida horizontalmente através do ambiente, via alimentação de mosquitos no néctar de plantas, onde já foi encontrada (Álvarez-Pérez et al. 2012). Uma vez adquirida, *Pseudomonas* coloniza o intestino dos mosquitos, aumentando sua abundância em resposta à alimentação sanguínea (Chen et al. 2020; Muturi et al. 2021), pois resiste ao estresse oxidativo ocasionado pela ingestão de heme das hemácias (Wang et al. 2011). Assim, se sobressai sobre outros táxons sensíveis a essa mudança bioquímica drástica do ambiente intestinal durante a digestão do sangue.

Em nosso trabalho, *Pseudomonas* não foi uma bactéria dominante, apesar de muito disseminada, o que vai de acordo com a variabilidade na abundância desta bactéria vista na microbiota intestinal de outras populações de *Ae. albopictus*. Por exemplo, foi um táxon dominante em uma população deste mosquito da Itália (Rosso et al. 2018). Além disso, por interagir com outros microrganismos no intestino, *Pseudomonas* é considerada uma *hub-bacteria*, que se define por uma bactéria que está fortemente interconectada com as outras, tendo um papel importante para a comunidade bacteriana local (Hegde et al. 2018; Brinker et al. 2019), possivelmente estabelecendo correlações positivas com outros táxons como a produção metabólitos necessários para a sobrevivência de bactérias específicas.

*Pseudomonas* foi descrita na água de criadouro e em todas as fases de desenvolvimento de *Ae. koreicus* (Alfano et al. 2019), levantando a hipótese de transmissão transtadial, pois esta bactéria foi encontrada nos túbulos de Malpighi. Deste modo, resistiria ao remodelamento do tecido intestinal que ocorre durante a metamorfose da fase de pupa para o adulto, como foi descrito em *An. stephensi* (Chavshin et al. 2015). A transmissão transtadial, somada à facilidade de cultivo e de manipulação genética, fazem de *Pseudomonas* uma candidata para abordagens de paratransgênese (Raharimalala et al. 2016). Em nosso estudo apenas analisamos a microbiota intestinal de fêmeas adultas, porém seria interessante investigar a sua presença em estágios imaturos,

machos e na água de criadouro dos locais amostrados, reforçando a sua associação com *Ae. albopictus*.

O gênero *Acinetobacter* não é encontrado apenas no intestino de mosquitos, mas também em criadouros e fontes alimentares, tais como hospedeiros vertebrados e plantas (Minard et al. 2013a). A alimentação açucarada é uma via de transmissão horizontal desta bactéria para mosquitos, uma vez que já foi encontrada em néctar floral (Fridman et al. 2012). Sua abundância em diferentes espécies de plantas variou entre 40-90%, o que possibilita que *Acinetobacter* seja adquirido mais comumente por machos do que por fêmeas (Fridman et al. 2012). Diferentes espécies deste gênero foram detectadas em *Ae. albopictus* coletados em campo, em Madagascar. Os dados deste estudo indicam que *Acinetobacter* pode estar envolvido com funções importantes para a fisiologia de *Ae. albopictus*, como a digestão sanguínea e a assimilação de açúcares provenientes do néctar adquirido, além disso ocorre um sinergismo com *Asaia*. Alguns isolados de *Acinetobacter*, como *A. Iwoffii* apresentaram uma maior presença de plasmídeos em relação a cepas de referência, o que levanta a hipótese de que estes podem conter informações genéticas relacionadas à simbiose com *Ae. albopictus* (Minard et al. 2013b).

Já a ordem Actinomycetales compreende bactérias vulgarmente conhecidas com “actinomicetos”. São largamente distribuídas pelo ambiente, sendo encontradas principalmente em solos, mas também em ecossistemas aquáticos (Srinivasan et al. 1991; Colquhoun et al. 1998; George et al. 2012; Chaudhary et al. 2013). Esta foi a ordem bacteriana mais abundante na água de criadouro de duas espécies de mosquitos vetores de malária na Colômbia: *Anopheles nuneztovari* e *An. darlingi*. Apesar de também estar presente na microbiota de larva e adultos, sua abundância relativa era mais reduzida (Bascuñán et al. 2018). Actinomycetales também foi detectada em recipientes de armazenamento de água doméstica, além de compor a microbiota bacteriana de larvas de *Ae. aegypti* que lá se criavam (Dada et al. 2014).

Os actinomicetos possuem propriedades antimicrobianas, sendo muitas vezes estudados para o isolamento destas moléculas a fim de produzir antibióticos (Chaudhary et al. 2013). Além disso, podem ter atividade larvicida, resultando em altas taxas de mortalidade contra *Cx. quinquefasciatus* e *An.stephensi*, porém baixas contra *Ae. aegypti* (Pathalam et al. 2017). Uma nova

espécie, do gênero *Streptomyces*, demonstrou recentemente atividade larvicida contra *Ae. albopictus*, sendo um potencial biolarvicida para utilização em controle biológico (Dahmana et al. 2020).

Outras abordagens devem ser aplicadas para a identificação taxonômica de actinomicetos, uma vez que os fragmento sequenciados do gene 16S rRNA dificilmente chegam ao nível de espécie, principalmente em uma ordem tão diversa como Actinomycetales. Assim, isso possibilitaria a distinção entre espécies com potencial larvicida e os simbioses de mosquitos. Outra abordagem seria investigar possíveis relações de amensalismo na microbiota intestinal de mosquitos, através de interações entre actinomicetos e outras bactérias por conta de sua capacidade de secretar antimicrobianos.

Devido às diferenças na diversidade e composição da microbiota entre *Ae. albopictus* de laboratório e campo, também definimos a microbiota *core* destes grupos. No primeiro, esta foi composta apenas pela família Acetobacteraceae além dos táxons já mencionados no *core* geral de *Ae. albopictus*. Já para os mosquitos do campo, a microbiota *core* foi composta também pelas famílias Vibrionaceae, Bacillaceae, Propionibacteriaceae, Sphingomonadaceae e Streptococcaceae

Os gêneros *Propionibacterium* (Propionibacteriaceae) e *Streptococcus* (Streptococcaceae) são comumente associados à pele humana (Grice e Segre 2011) e já foram detectados na microbiota de *Ae. aegypti* coletados em campo alimentados de sangue humano (Sarma et al. 2022). Além disso, *Streptococcus* foi identificado na microbiota de *Anopheles* de campo na Tailândia (Tainchum et al. 2020), enquanto *Propionibacterium* esteve presente em diferentes espécies de mosquitos coletadas em Illinois (Estados Unidos) e em *Ae. albopictus* de Madagascar (Minard et al. 2014; Muturi et al. 2017b).

Em laboratório, a presença de *Propionibacterium* em fêmeas adultas de *Ae. albopictus* pareceu estar correlacionada ao repasto sanguíneo em linguças suínas (Chen et al. 2020). Assim, é razoável hipotetizar que este táxon, assim como *Streptococcus*, possam ter sido adquiridos via contato de *Ae. albopictus* de campo com hospedeiros vertebrados, enquanto não foram detectados em mosquitos de laboratório com uma geração F1 e com sucessivas gerações LAB devido à alimentação exclusiva de açúcar. Porém, *Propionibacterium* ocorreu em alguns indivíduos de campo RPC-F1, o que pode ser explicado pela hipótese

desses mosquitos entrarem em contato com materiais manipulados pelas mãos humanas, transferindo *Propionibacterium* para a microbiota intestinal desses insetos.

A família Vibrionaceae teve como gênero mais representativo *Vibrio*, com a maioria das sequências sendo associada à *Vibrio metschnikovii* (dados não mostrados), uma bactéria detectada na microbiota de *An. gambiae* e que é capaz de secretar compostos voláteis que atraem as fêmeas para sítios de oviposição (Lindh et al. 2008b). Não obstante, trata-se também de um patógeno oportunista capaz de causar, mesmo que raramente, doenças em humanos (Konechnyi et al. 2021). A presença desta bactéria na microbiota intestinal de *Ae. albopictus* em uma abundância dominante reforça o conceito de que mosquitos podem conter o chamado “patobioma”, que consiste no conjunto de microrganismos potencialmente patogênicos integrados ao ambiente intestinal e os demais microrganismos componentes da microbiota (Vayssier-Taussat et al. 2014).

Bacillaceae foi uma das doze famílias mais abundantes na microbiota intestinal dos diferentes grupos de *Ae. albopictus*, sobretudo do campo, e comumente é encontrada em associação com este mosquito (Valiente Moro et al. 2013; Yadav et al. 2016; Chen et al. 2020; Juma et al. 2020). Diferentes espécies do gênero *Bacillus* são cultiváveis em laboratório (Valiente Moro et al. 2013). Esta variedade de espécies de *Bacillus* é encontrada em diferentes espécies de mosquitos vetores, sendo capazes de serem utilizados como inseticidas, impactar na fertilidade e estarem presentes nos diferentes estágios de vida de um mosquito (Minard et al. 2013a).

Sphingomonadaceae também está entre as doze famílias mais abundantes na microbiota de *Ae. albopictus*, cujo gênero mais representativo é *Sphingomonas*, um táxon amplamente distribuído no ambiente (Vaz-Moreira et al. 2011), capaz de metabolizar diversas fontes de carbono e sobreviver com poucos nutrientes (White et al. 1996; Abraham e Jacobs-Lorena 2004). Estas características poderiam favorecer a colonização do intestino de diferentes populações de *Ae. albopictus* por *Sphingomonas* e outros integrantes desta família (Valiente Moro et al. 2013; Minard et al. 2014; Mancini et al. 2018; Guégan et al. 2020a; Seabourn et al. 2020; Lin et al. 2021; Scolari et al. 2021), assim como de outros mosquitos vetores (Terenius et al. 2012; Villegas e Pimenta 2014; Straub et al. 2020). Além disso, Sphingomonadaceae poderia estar

envolvida no metabolismo nutritivo destes insetos, uma vez que é capaz de degradar carboidratos oriundos de diferentes tipos de plantas (Minard et al. 2015).

*Xanthomonadaceae* também é amplamente encontrada na microbiota de diferentes populações de *Ae. albopictus* (Valiente Moro et al. 2013; Chen et al. 2020; Juma et al. 2020; Seabourn et al. 2020; Scolari et al. 2021) e de mosquitos de forma geral (Boissière et al. 2012; Akorli et al. 2019; Caragata et al. 2022). O gênero *Stenotrophomonas*, incluso nesta família, foi detectado com uma abundância diferencial elevada na microbiota de fêmeas de *Ae. albopictus* de campo JU e moderada nos outros locais de campo (JDG e RPC) (Figura 16A). Tanto *Xanthomonadaceae*, quanto *Sphingomonadaceae* mostraram influência na interação entre fêmeas de *Ae. aegypti* e a água de criadouro, podendo ser táxons considerados indicadores de oviposição (Mosquera et al. 2022). Assim, podemos esperar que ambas tenham um papel importante no ciclo de vida dos mosquitos, sendo necessários mais estudos a respeito da sua presença em diferentes criadouros e da interação com os hospedeiros.

Ao comparar nosso estudo com outros que descreveram a microbiota de populações brasileiras de *Ae. albopictus* (Minas, Santa Catarina e Rio de Janeiro), observamos a presença de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* na microbiota de todas, independentemente da colonização em laboratório ou localidade geográfica (Pereira et al. 2021), assim como foi detectado em nossa análise de abundância relativa.

A ordem mais abundante encontrada nas três populações foi *Rickettsiales*, que foi associada à *Wolbachia* (Pereira et al. 2021). Este resultado difere do nosso pela abordagem metodológica utilizada por Pereira e colaboradores (2021), em que fizeram uso de amostras contendo abdômens de *Ae. albopictus*, processando assim além do intestino, órgãos reprodutivos que possuem a maior concentração de *Wolbachia* (Zouache et al. 2009).

Também foi observado que a localidade não influenciou na riqueza da microbiota das diferentes populações (Pereira et al. 2021), contudo é importante salientar que foram utilizados mosquitos em F2, como observamos em nossos resultados há uma perda da heterogeneidade da microbiota intestinal em F1, o que pode influenciar no impacto da localidade nesta condição. Portanto, análises de diversidade com populações de campo de *Ae. albopictus* de diferentes

estados devem ser conduzidas, para verificar o efeito da localidade em uma escala geográfica maior.

Bactérias cultiváveis da microbiota intestinal de *Ae. albopictus* de uma colônia de laboratório e de campo em Pernambuco (Recife) foram identificadas através da técnica de MALDI-TOF (Gonçalves et al. 2019). Mosquitos de laboratório apresentaram cinco isolados que foram identificados como *Rahnella aquatilis*, em nosso estudo apesar de ter sido detectada com uma baixa abundância relativa, o gênero *Rahnella* apresentou uma abundância diferencial elevada e moderada nos grupos de laboratório F1 e de sucessivas gerações LAB respectivamente.

Apenas em mosquitos de campo foram identificados quatro isolados que foram atribuídos a *Bacillus cereus* (Gonçalves et al. 2019). Curiosamente, a família Bacillaceae foi associada ao *core* de campo em nosso estudo, o que pode indicar que bactérias do gênero *Bacillus* que colonizam o intestino de *Ae. albopictus* podem não se adaptar tão bem em ambientes laboratoriais.

Ademais, os gêneros *Ewingella*, *Pantoea* e *Klebsiella* foram isolados tanto de mosquitos de campo quanto da colônia de laboratório (Gonçalves et al. 2019). Estes gêneros fazem parte da família Enterobacteriaceae, que foi um dos táxons integrantes da microbiota *core* geral segundo nossos resultados.

Uma limitação geral em nosso estudo foi a de investigar apenas a microbiota bacteriana. A microbiota intestinal de mosquitos é formada também por vírus comensais, fungos e protozoários, sendo apontados como microrganismos negligenciados no estudo do microbioma destes insetos (Guégan et al. 2018b).

No que diz respeito à influência de fatores ambientais na diversidade destes microrganismos em *Ae. albopictus*, o viroma de mosquitos criados em laboratório apresentou uma menor riqueza e diversidade em relação aos coletados em campo (Shi et al. 2020). Além disso, a composição do viroma de mosquitos adultos variou entre as estações (inverno e primavera x verão e outono), com uma maior riqueza de espécies virais associada às estações de inverno e primavera (He et al. 2021).

Em relação a microbiota fúngica, um estudo verificou que as condições ambientais de um determinado local podem ser fatores importantes para a formação da microbiota fúngica e detectou uma variação inter-individual na



composição das comunidades de fungos em *Ae. albopictus* (Luis et al. 2019). Outra abordagem fazendo uso de larvas de quarto estágio de *Ae. albopictus* verificou que o criadouro tem grande importância na formação da microbiota, com grande parte dos fungos detectados na água de criadouro sendo encontrados no intestino de larvas, que possuíam uma diversidade maior em relação a carcaça das fases imaturas (Tawidian et al. 2021).

Ademais, Seabourn e colaboradores (2020) detectaram que *Ae. albopictus* infectados com Ascogregarina, um protozoário parasita que pode fazer parte de todo o ciclo de vida de um mosquito, apresentam variações na composição de sua microbiota bacteriana, o que demonstra que a protozoários podem estabelecer interações com táxons bacterianos e moldar o perfil da microbiota de mosquitos (Seabourn et al. 2020).

Estes exemplos demonstram resultados que podem ser mais bem investigados fazendo o uso da metodologia de nosso estudo, verificando o efeito de locais com diferentes paisagens, colonização em laboratório e diferentes períodos de coleta no viroma e microbioma de eucariotos (fungos e protozoários) para mosquitos de diferentes espécies, buscando assim compreender os principais fatores que modulam a microbiota de mosquitos como um todo e não apenas a bacteriana.

## 6. CONCLUSÕES

- A diversidade da microbiota intestinal de *Aedes albopictus* foi influenciada majoritariamente pela origem (campo x laboratório) e período de coleta. Localidade e população não contribuíram significativamente para as diferenças observadas.

- Houve uma queda significativa na diversidade e riqueza das comunidades bacterianas intestinais de *Aedes albopictus* com apenas uma geração de colonização em laboratório (F1) das três populações que foram coletadas.

- Mosquitos *Aedes albopictus* de laboratório F1 agruparam com mosquitos da colônia de laboratório com sucessivas gerações em relação a composição da

microbiota intestinal, demonstrando um remodelamento na estrutura da microbiota de campo após uma geração de criação em laboratório.

- Houve variação a nível individual quanto a abundância de táxons dentre os grupos utilizados no estudo. Acetobacteraceae e *Wolbachia* apresentaram uma possível relação de co-exclusão, em que o primeiro táxon foi dominante nos grupos de laboratório de uma geração F1 e de várias gerações LAB, enquanto foi ausente ou indetectável em campo, o segundo foi ausente ou indetectável em F1 e esteve presente com abundância variada em grupos de campo.

- Cinco táxons (Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Moraxellaceae, Halomonadaceae e Actinomycetales) fizeram parte da microbiota core geral de *Aedes albopictus*. Enquanto Sphingomonadaceae, Bacillaceae, Propionibacteriaceae, Streptococcaceae e Vibrionaceae foram associados ao core de mosquitos coletados em campo. Um único táxon, Acetobacteraceae, foi considerado integrante do core de mosquitos criados em laboratório, excluindo os táxons do core geral.

- A partir dos resultados de ANCOM, identificaram-se táxons considerados assinaturas de acordo com a localidade e período de coleta. Acetobacteraceae foi considerada uma assinatura bacteriana para os grupos de mosquitos de laboratório (F1 e LAB), *Propionibacterium* foi considerado uma assinatura das três localidades de campo (RPC, JU e JDG) e exclusivamente de RPC-F1. *Ralstonia* e *Methylobacterium* foram assinaturas referentes a estação chuvosa (2019-1), enquanto *Wolbachia* foi considerada uma assinatura bacteriana para ambos os períodos de coleta e também da colônia de laboratório (LAB).

## 7. PERSPECTIVAS

- Investigar a estrutura genética das três populações coletadas em campo, através do sequenciamento por ddRAD-Seq, fazendo uso de carcaças de *Ae. albopictus* armazenadas a -30°C.

- Investigar a presença de *Asaia* nas amostras de JDG, JU, RPC, LAB e F1 utilizando PCR com iniciadores específicos para este gênero. No caso de uma amplificação, os *amplicons* seriam sequenciados pelo método de Sanger

para confirmar a identificação taxonômica das sequências referentes à família Acetobacteraceae encontradas em nosso estudo.

- Verificar a partir de qual geração em laboratório *Ae. albopictus* recupera seus níveis de diversidade para se tornarem equivalentes aos de mosquitos de campo, utilizando mosquitos de laboratório LAB como grupo controle.

## 8. ANEXOS

**Tabela Suplementar 1:** Resultados da descontaminação por microDecon.

**Tabela Suplementar 2:** Comparações pareadas significativas para o Índice de Faith.

**Tabela Suplementar 3:** Comparações pareadas significativas para a Riqueza (ASVs).

**Tabela Suplementar 4:** Comparações pareadas significativas para o Índice de Shannon.

**Tabela Suplementar 5:** Comparações pareadas significativas para o Índice de Pielou.

**Tabela Suplementar 6:** Abundâncias percentuais de táxons por grupo de acordo com a variável local.

**Tabela Suplementar 7:** Abundâncias percentuais de táxons por grupo de acordo com a variável período.

O material Suplementar estará disponível para os integrantes da banca examinadora via um arquivo ZIP, enviado individualmente para cada integrante.

Para os demais leitores, o acesso será via o link abaixo via Google Drive:  
<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1T3Ah8ut1OQwZiAF4jyhJjhK4ORfIXyZP/edit?usp=sharing&ouid=104921477035119624266&rtpof=true&sd=true>  
e

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Reynolds J, Poelchau MF, Rahman Z, Armbruster PA, Denlinger DL. Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. *J Insect Physiol* [Internet]. 2012 Jul [cited 2022 Feb 1];58(7):966–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22579567/>
- Abraham EG, Jacobs-Lorena M. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. *Insect Biochem Mol Biol* [Internet]. 2004 Jul;34(7):667–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174804000700>
- Achee NL, Grieco JP, Vatandoost H, Seixas G, Pinto J, Ching-Ng L, et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(1):1–22.
- Adegoke A, Neff E, Geary A, Husser MC, Wilson K, Norris SM, et al. Laboratory colonization by *Dirofilaria immitis* alters the microbiome of female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasit Vectors* [Internet]. 2020;1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04218-8>
- Adelman ZN, Anderson MAE, Wiley MR, Murreddu MG, Samuel GH, Morazzani EM, et al. Cooler Temperatures Destabilize RNA Interference and Increase Susceptibility of Disease Vector Mosquitoes to Viral Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5).
- Aguirre-Obando OA, Martins AJ, Navarro-Silva MA. First report of the Phe1534Cyskdr mutation in natural populations of *Aedes albopictus* from Brazil. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017 Mar 27;10(1):160. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2089-5>
- Ahmad NA, Mancini M-V, Ant TH, Martinez J, Kamarul GMR, Nazni WA, et al. *Wolbachia* strain w AlbB maintains high density and dengue inhibition following introduction into a field population of *Aedes aegypti*. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2021 Feb 15;376(1818):20190809. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2019.0809>
- Akorli J, Gendrin M, Pels NAP, Yeboah-manu D. Seasonality and Locality Affect the Diversity of *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* Midgut Microbiota from Ghana. 2016;1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0157529>
- Akorli J, Namaali PA, Ametsi GW, Egyirifa RK, Pels NAP. Generational conservation of composition and diversity of field-acquired midgut microbiota in *Anopheles gambiae* (sensu lato) during colonization in the laboratory. *Parasites and Vectors*. 2019;12(1):1–9.
- Alencar J, de Mello CF, Marcondes CB, Guimarães AÉ, Toma HK, Bastos AQ, et al. Natural infection and vertical transmission of Zika virus in sylvatic mosquitoes *Aedes albopictus* and *Haemagogus leucocelaenus* from Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Med Infect Dis*. 2021;6(2).
- Alfano N, Tagliapietra V, Rosso F, Manica M, Arnoldi D, Pindo M, et al. Changes in Microbiota Across Developmental Stages of *Aedes koreicus*, an Invasive Mosquito Vector in Europe: Indications for Microbiota-Based Control Strategies. 2019;10(December):1–15.
- De Almeida LG, De Moraes LAB, Trigo JR, Omoto C, Cônsoli FL. The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLoS One*. 2017;12(3):1–19.
- Althouse BM, Vasilakis N, Sall AA, Diallo M, Weaver SC, Hanley KA. Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(12):e0005055.
- Álvarez-Pérez S, Herrera CM, Vega C. Zooming-in on floral nectar: a first exploration of nectar-associated bacteria in wild plant communities. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2012 Jun;80(3):591–602. Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2012.01329.x>
- Amraoui F, Ayed W Ben, Madec Y, Faraj C, Himmi O, Btissam A, et al. Potential of *Aedes albopictus* to cause the emergence of arboviruses in Morocco. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2019;13(2):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006997>
- Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* [Internet]. 2001 Feb;26(1):32–46. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
- Angleró-Rodríguez YI, Talyuli OAC, Blumberg BJ, Kang S, Demby C, Shields A, et al. An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. *Elife*. 2017;6:1–20.
- Ant TH, Herd C, Louis F, Failloux AB, Sinkins SP. *Wolbachia* transinfections in *Culex quinquefasciatus* generate cytoplasmic incompatibility. *Insect Mol Biol*. 2020;29(1):1–8.

- Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, Deobagkar DN. *Serratia odorifera* a Midgut Inhabitant of *Aedes aegypti* Mosquito Enhances Its Susceptibility to Dengue-2 Virus. Vasilakis N, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Jul 27;7(7):e40401. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0040401>
- Apte-Deshpande AD, Paingankar MS, Gokhale MD, Deobagkar DN. *Serratia odorifera* mediated enhancement in susceptibility of *Aedes aegypti* for chikungunya virus. Indian J Med Res. 2014;139(5):762–8.
- Arévalo-Cortés A, Mejía-Jaramillo AM, Granada Y, Coatsworth H, Lowenberger C, Triana-Chavez O. The midgut microbiota of colombian *aedes aegypti* populations with different levels of resistance to the insecticide lambda-cyhalothrin. Insects. 2020;11(9):1–19.
- Audsley MD, Seleznev A, Joubert DA, Woolfit M, O'Neill SL, McGraw EA. *Wolbachia* infection alters the relative abundance of resident bacteria in adult *Aedes aegypti* mosquitoes, but not larvae. Mol Ecol. 2018;27(1):297–309.
- Audsley MD, Ye YH, McGraw EA. The microbiome composition of *Aedes aegypti* is not critical for *Wolbachia*-mediated inhibition of dengue virus. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2017;11(3):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005426>
- Auteri M, La Russa F, Blanda V, Torina A. Insecticide Resistance Associated with *kdr* Mutations in *Aedes albopictus* : An Update on Worldwide Evidences. Biomed Res Int [Internet]. 2018 Aug 5;2018:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3098575/>
- Avila-Magaña V, Kamel B, DeSalvo M, Gómez-Campo K, Enríquez S, Kitano H, et al. Elucidating gene expression adaptation of phylogenetically divergent coral holobionts under heat stress. Nat Commun [Internet]. 2021 Dec 30;12(1):5731. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-25950-4>
- Ayllón T, Câmara DCP, Morone FC, da Silva Gonçalves L, de Barros FSM, Brasil P, et al. Dispersion and oviposition of *Aedes albopictus* in a Brazilian slum: Initial evidence of Asian tiger mosquito domiciliation in urban environments. PLoS One. 2018;13(4):1–11.
- Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. Trends Parasitol [Internet]. 2005 Dec;21(12):568–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492205002850>
- Bahia AC, Dong Y, Blumberg BJ, Mlambo G, Tripathi A, Benmarzouk-Hidalgo OJ, et al. Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. Environ Microbiol [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2022 Mar 3];16(9):2980–94. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1462-2920.12381>
- Bai L, Wang L, Vega-Rodríguez J, Wang G, Wang S. A Gut Symbiotic Bacterium *Serratia marcescens* Renders Mosquito Resistance to *Plasmodium* Infection Through Activation of Mosquito Immune Responses. Front Microbiol [Internet]. 2019 Jul 18 [cited 2022 Mar 5];10(JULY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31379768/>
- Bargielowski IE, Lounibos LP. Satyrization and satyrization-resistance in competitive displacements of invasive mosquito species. Insect Sci [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Feb 1];23(2):162–74. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1744-7917.12291>
- Bargielowski IE, Lounibos LP, Shin D, Smartt CT, Carrasquilla MC, Henry A, et al. Widespread evidence for interspecific mating between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in nature. Infect Genet Evol [Internet]. 2015 May 18 [cited 2022 Feb 1];36:456. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25812367/>
- Barletta ABF, Nascimento-Silva MCL, Talyuli OAC, Oliveira JHM, Pereira LOR, Oliveira PL, et al. Microbiota activates IMD pathway and limits *Sindbis* infection in *Aedes aegypti*. Parasites and Vectors. 2017;10(1):1–9.
- Basarab M, Bowman C, Aarons EJ, Cropley I. Zika virus. BMJ [Internet]. 2016 Feb 26;i1049. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.i1049>
- Bascuñán P, Niño-García JP, Galeano-Castañeda Y, Serre D, Correa MM. Factors shaping the gut bacterial community assembly in two main Colombian malaria vectors. Microbiome. 2018;6(1):1–12.
- Bassene H, Hadji E, Niang A, Fenollar F, Doucoure S, Faye O, et al. Role of plants in the transmission of *Asaia* sp., which potentially inhibit the *Plasmodium* sporogonic cycle in *Anopheles* mosquitoes. 2020;1–10.
- Baumann P, Clark MA, Baumann, And L, Broadwell AH. *Bacillus sphaericus* as a Mosquito Pathogen: Properties of the Organism and Its Toxin. Microbiol Rev. 1991;425–36.
- Beebe NW, Pagendam D, Trewin BJ, Boomer A, Bradford M, Ford A, et al. Releasing incompatible males drives strong suppression across populations of wild and *Wolbachia*-

- carrying *Aedes aegypti* in Australia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Oct 12;118(41).
- Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP. Spread of The Tiger: Global Risk of Invasion by The Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2007 Mar;7(1):76–85. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2006.0562>
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B* [Internet]. 1995 Jan 1 [cited 2022 Feb 13];57(1):289–300. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bennett KL, Gómez-Martínez C, Chin Y, Saltonstall K, McMillan WO, Rovira JR, et al. Dynamics and diversity of bacteria associated with the disease vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Sci Rep*. 2019a;9(1):1–12.
- Bennett KL, Gómez Martínez C, Almanza A, Rovira JR, Mcmillan WO, Enriquez V, et al. High infestation of invasive *Aedes* mosquitoes in used tires along the local transport network of Panama. 2019b [cited 2021 Aug 15]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3522-8>
- Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(44):18933–8.
- Bezerra JMT, Araújo RGP, Melo FF, Gonçalves CM, Chaves BA, Silva BM, et al. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus*' dynamics influenced by spatiotemporal characteristics in a Brazilian dengue-endemic risk city. *Acta Trop*. 2016;164:431–7.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nat* 2013 4967446 [Internet]. 2013 Apr 7 [cited 2022 Jan 29];496(7446):504–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature12060>
- Birnberg L, Climent-sanz E, Codoñer FM, Busquets N, Moro CV, Claude U, et al. Microbiota Variation Across Life Stages of European Field-Caught *Anopheles atroparvus* and During Laboratory Colonization : New Insights for Malaria Research. 2021;12(November):1–15.
- Blagrove MSC, Arias-Goeta C, Failloux A-B, Sinkins SP. *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2012 Jan 3;109(1):255–60. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1112021108>
- Blagrove MSC, Arias-Goeta C, Di Genua C, Failloux A-B, Sinkins SP. A *Wolbachia* wMel Transinfection in *Aedes albopictus* Is Not Detrimental to Host Fitness and Inhibits Chikungunya Virus. O'Neill SL, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013 Mar 28;7(3):e2152. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002152>
- Bogale HN, Cannon M V., Keita K, Camara D, Barry Y, Keita M, et al. Relative contributions of various endogenous and exogenous factors to the mosquito microbiota. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2020;13(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04491-7>
- Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, et al. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):1–12.
- Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, et al. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*. 2018;6(1):1–17.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):852–7.
- Bongio NJ, Lampe DJ. Inhibition of *Plasmodium berghei* Development in Mosquitoes by Effector Proteins Secreted from *Asaia* sp. Bacteria Using a Novel Native Secretion Signal. *PLoS One* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2022 Mar 5];10(12):e0143541. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0143541>
- Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol* [Internet]. 2013 Sep;29(9):460–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492213001086>
- Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jan 29];6(8):e1760. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001760>

- Brady OJ, Johansson MA, Guerra CA, Bhatt S, Golding N, Pigott DM, et al. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasites and Vectors*. 2013;6(1):1–12.
- Brinker P, Fontaine MC, Beukeboom LW, Falcao Salles J. Host, Symbionts, and the Microbiome: The Missing Tripartite Interaction. *Trends Microbiol*. 2019;27(6):480–8.
- Brown JJ, Jandová A, Jeffs CT, Higgle M, Nováková E, Lewis OT, et al. Microbiome structure of a wild *Drosophila* community along tropical elevational gradients and comparison to laboratory lines. *bioRxiv* [Internet]. 2021;2021.07.28.454263. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.28.454263v1>
- Buck M, Nilsson LKJ, Brunius C, Dabiré RK, Hopkins R, Terenius O. Bacterial associations reveal spatial population dynamics in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(March):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep22806>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Mar 21];11(12):2639–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28731476/>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* [Internet]. 2016;13(7):581–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Calvitti M, Marini F, Desiderio A, Puggioli A, Moretti R. *Wolbachia* density and cytoplasmic incompatibility in *Aedes albopictus*: Concerns with using artificial *Wolbachia* infection as a vector suppression tool. *PLoS One*. 2015;10(3):1–19.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:1–9.
- Cansado-utrilla C, Zhao SY, McCall PJ, Coon KL, Hughes GL. The microbiome and mosquito vectorial capacity : rich potential for discovery and translation. 2021;1–11.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010 May;7(5):335–6.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(SUPPL. 1):4516–22.
- Caragata EP, Otero LM, Carlson JS, Borhani Dizaji N, Dimopoulos G. A nonlive preparation of *Chromobacterium* sp. Panama (Csp\_P) is a highly effective larval mosquito biopesticide. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(11):1–15.
- Caragata EP, Otero LM, Tikhe C V., Barrera R, Dimopoulos G. Microbial Diversity of Adult *Aedes aegypti* and Water Collected from Different Mosquito Aquatic Habitats in Puerto Rico. *Microb Ecol* [Internet]. 2022 Jan 16;83(1):182–201. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00248-021-01743-6>
- Caragata EP, Tikhe C V., Dimopoulos G. Curious entanglements: interactions between mosquitoes, their microbiota, and arboviruses. *Curr Opin Virol*. 2019;37:26–36.
- Carissimo G, Pondeville E, McFarlane M, Dietrich I, Mitri C, Bischoff E, et al. Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015 Jan 13;112(2). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1412984112>
- Carvalho KDS, Crespo MM, Araújo AP, Da Silva RS, De Melo-Santos MAV, De Oliveira CMF, et al. Long-term exposure of *Aedes aegypti* to *Bacillus thuringiensis* svar. *Israelensis* did not involve altered susceptibility to this microbial larvicide or to other control agents. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2018 Dec 29 [cited 2022 Mar 3];11(1):1–11. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3246-1>
- Cecílio AB, Campanelli ES, Souza KPR, Figueiredo LB, Resende MC. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. *Brazilian J Biol* [Internet]. 2009 [cited 2022 Feb 6];69(1):123–7. Available from: <http://www.scielo.br/j/bjb/a/z6R6Hh5wz7YwMqHrY4HYXCG/?lang=en>
- Chabanol E, Behrends V, Prévot G, Christophides GK, Gendrin M. Antibiotic treatment in *Anopheles coluzzii* affects carbon and nitrogen metabolism. *Pathogens*. 2020;9(9):1–13.
- Chandler JA, Lang J, Bhatnagar S, Eisen JA, Kopp A. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: Ecological context of a host-microbe model system. *PLoS Genet*. 2011;7(9).
- Charan SS, Pawar KD. Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. *Parasitol Res*.



- 2013;112(7):2627–37.
- Chaudhary HS, Soni B, Shrivastava AR, Shrivastava S. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *J Appl Pharm Sci*. 2013;3(8 SUPPL).
- Chavshin AR, Oshaghi MA, Vatandoost H, Yakhchali B, Zarenejad F. Malpighian tubules are important determinants of *Pseudomonas* transstadial transmission and longtime persistence in *Anopheles stephensi*. 2015;1–7.
- Chen S, Zhang D, Augustinos A, Doudoumis V, Bel Mokhtar N, Maiga H, et al. Multiple Factors Determine the Structure of Bacterial Communities Associated With *Aedes albopictus* Under Artificial Rearing Conditions. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Apr 15;11(April). Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00605/full>
- Chen S, Zhao J, Joshi D, Xi Z, Norman B, Walker ED. Persistent infection by *Wolbachia* wAlbB has no effect on composition of the gut microbiota in adult female *Anopheles stephensi*. *Front Microbiol*. 2016;7(SEP):1–10.
- Chen Y-H, Lu C-W, Shyu Y-T, Lin S-S. Revealing the Saline Adaptation Strategies of the Halophilic Bacterium *Halomonas beimenensis* through High-throughput Omics and Transposon Mutagenesis Approaches. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 12;7(1):13037. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-13450-9>
- Chouaia B, Rossi P, Epis S, Mosca M, Ricci I, Damiani C, et al. Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts. *BMC Microbiol*. 2012;12(SUPPL. 1):1–8.
- Chouaia B, Rossi P, Montagna M, Ricci I, Crotti E, Damiani C, et al. Molecular Evidence for Multiple Infections as Revealed by Typing of *Asaia* Bacterial Symbionts of Four Mosquito Species. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2010 Nov 15;76(22):7444–50. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01747-10>
- Chouin-Carneiro T, Ant TH, Herd C, Louis F, Failloux AB, Sinkins SP. *Wolbachia* strain wAlbA blocks Zika virus transmission in *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol*. 2020a;34(1):116–9.
- Chouin-Carneiro T, David MR, de Bruycker Nogueira F, dos Santos FB, Lourenço-de-Oliveira R. Zika virus transmission by Brazilian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is virus dose and temperature-dependent. Lacerda MVG, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020b Sep 8;14(9):e0008527. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0008527>
- Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. Turell MJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Mar 3;10(3):e0004543. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004543>
- Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, et al. Natural Microbe-Mediated Refractoriness to Plasmodium Infection in *Anopheles gambiae*. *Science* (80- ) [Internet]. 2011a May 13;332(6031):855–8. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1201618>
- Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G. Native Microbiota Shape Insect Vector Competence for Human Pathogens. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2011b Oct;10(4):307–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312811002915>
- Colquhoun JA, Heald SC, Li L, Tamaoka J, Kato C, Horikoshi K, et al. Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes. *Extremophiles* [Internet]. 1998 Aug 20;2(3):269–77. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s007920050069>
- Conn JE, Lainhart W, Rios CT, Vinetz JM, Bickersmith SA, Moreno M. Changes in Genetic Diversity from Field to Laboratory During Colonization of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2015 Nov 4;93(5):998–1001. Available from: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.15-0336>
- Consoli RAGB, Oliveira RL de. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil [Internet]. Editora FIOCRUZ; 1994. Available from: <http://books.scielo.org/id/th>
- Coon KL, Brown MR, Strand MR. Gut bacteria differentially affect egg production in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors* [Internet]. 2016a Dec 30;9(1):375. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1660-9>
- Coon KL, Brown MR, Strand MR. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Mol Ecol* [Internet]. 2016b Nov;25(22):5806–26. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mec.13877>
- Coon KL, Valzania L, McKinney DA, Vogel KJ, Brown MR, Strand MR. Bacteria-mediated hypoxia functions as a signal for mosquito development. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2017 Jul

- 3;114(27). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1702983114>
- Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, Strand MR. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol Ecol* [Internet]. 2014 Jun;23(11):2727–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mec.12771>
- Cornel AJ, Hunt RH. *Aedes albopictus* in Africa? First records of live specimens in imported tires in Cape Town. *J Am Mosq Control Assoc* [Internet]. 1991 Mar 1 [cited 2022 Feb 2];7(1):107–8. Available from: <https://europepmc.org/article/med/2045799>
- Correa MA, Matusovsky B, Brackney DE, Steven B. Generation of axenic *Aedes aegypti* demonstrate live bacteria are not required for mosquito development. *Nat Commun*. 2018;
- Couto-Lima Di, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, Motta MDA, Santos FB dos, et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 7;7(1):4848. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05186-3>
- Crawford JE, Clarke DW, Criswell V, Desnoyer M, Cornel D, Deegan B, et al. Efficient production of male Wolbachia-infected *Aedes aegypti* mosquitoes enables large-scale suppression of wild populations. *Nat Biotechnol* 2020 384 [Internet]. 2020 Apr 6 [cited 2022 Mar 8];38(4):482–92. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0471-x>
- Crotti E, Rizzi A, Chouaia B, Ricci I, Favia G, Alma A, et al. Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(21):6963–70.
- Dada N, Benedict AC, López F, Lol JC, Sheth M, Dzuris N, et al. Comprehensive characterization of internal and cuticle surface microbiota of laboratory-reared F1 *Anopheles albimanus* originating from different sites. *Malar J* [Internet]. 2021a Dec 23;20(1):414. Available from: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-021-03934-5>
- Dada N, Jumas-Bilak E, Manguin S, Seidu R, Stenström TA, Overgaard HJ. Comparative assessment of the bacterial communities associated with *Aedes aegypti* larvae and water from domestic water storage containers. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1).
- Dada N, Jupatanakul N, Minard G, Short SM, Akorli J, Villegas LM. Considerations for mosquito microbiome research from the Mosquito Microbiome Consortium. *Microbiome* 2021 91 [Internet]. 2021b Feb 1 [cited 2022 May 10];9(1):1–16. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-020-00987-7>
- Dada N, Lol JC, Benedict AC, López F, Sheth M, Dzuris N, et al. Pyrethroid exposure alters internal and cuticle surface bacterial communities in *Anopheles albimanus*. *ISME J* 2019 1310 [Internet]. 2019 Jun 6 [cited 2022 Mar 15];13(10):2447–64. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41396-019-0445-5>
- Dada N, Sheth M, Liebman K, Pinto J, Lenhart A. Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-20367-4>
- Dahmana H, Sambou M, Raoult D, Fenollar F, Mediannikov O. Biological Control of *Aedes albopictus*: Obtained from the New Bacterial Candidates with Insecticidal Activity. *Insects* [Internet]. 2020 Jun 29;11(7):403. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4450/11/7/403>
- Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, et al. Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Curr Biol* [Internet]. 2008 Dec 9 [cited 2022 May 2];18(23):R1087–8. Available from: <http://www.cell.com/article/S0960982208014097/fulltext>
- Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, et al. Mosquito-Bacteria Symbiosis: The Case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microb Ecol*. 2010;60(3):644–54.
- David MR, Maria L, Carolina A, Vicente P, Maciel-de-freitas R. Effects of environment , dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota : evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. 2016;111(September):577–87.
- Deborah Gnana Selvam A, Thatheyus AJ, Vidhya R. Biodegradation of the Synthetic Pyrethroid, Fenvalerate by *Pseudomonas viridiflava*. *Am J Microbiol Res* [Internet]. 2013 Apr 20;1(2):32–8. Available from: <http://pubs.sciepub.com/ajmr/1/2/4/index.html>
- Delatte H, Desvars A, Bouétard A, Bord S, Gimonneau G, Vourc'h G, et al. Blood-Feeding Behavior of *Aedes albopictus* , a Vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2010 Apr;10(3):249–58. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2009.0026>
- Delatte H, Gimonneau G, Triboire A, Fontenille D. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the indian ocean. *J Med Entomol*. 2009;46(1):33–41.

- Dennison NJ, Jupatanakul N, Dimopoulos G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci* [Internet]. 2014 Sep;3:6–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221457451400039X>
- Díaz-Nieto LM, D'Alessio C, Perotti MA, Berón CM. *Culex pipiens* development is greatly influenced by native bacteria and exogenous yeast. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(4):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0153133>
- Díaz S, Camargo C, Avila FW. Characterization of the reproductive tract bacterial microbiota of virgin, mated, and blood-fed *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* females. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2021a;14(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05093-7>
- Díaz S, Escobar JS, Avila FW. Identification and Removal of Potential Contaminants in 16S rRNA Gene Sequence Data Sets from Low-Microbial-Biomass Samples: an Example from Mosquito Tissues. *mSphere*. 2021b;6(3).
- Dickson LB, Ghoulane A, Volant S, Bouchier C, Ma L, Vega-Rúa A, et al. Diverse laboratory colonies of *Aedes aegypti* harbor the same adult midgut bacterial microbiome. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–8.
- Dickson LB, Jiolle D, Minard G, Moltini-Conclois I, Volant S, Ghoulane A, et al. Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in a mosquito vector. *Sci Adv*. 2017;3(8).
- Dillon RJ, Dillon VM. The Gut Bacteria of Insects: Nonpathogenic Interactions. *Annu Rev Entomol*. 2004;49(98):71–92.
- Diop F, Alout H, Diagne CT, Bengue M, Baronti C, Hamel R, et al. Differential Susceptibility and Innate Immune Response of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to the Haitian Strain of the Mayaro Virus. *Viruses* [Internet]. 2019 Oct 9 [cited 2022 Feb 8];11(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31601017/>
- Dixon D, Van Ekeris L, Linser P. Characterization of Carbonic Anhydrase 9 in the Alimentary Canal of *Aedes aegypti* and Its Relationship to Homologous Mosquito Carbonic Anhydrases. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2017 Feb 21;14(2):213. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-4601/14/2/213>
- Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W. Mutualistic *Wolbachia* Infection in *Aedes albopictus*: Accelerating Cytoplasmic Drive. *Genetics* [Internet]. 2002 Mar 1;160(3):1087–94. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/160/3/1087/6052517>
- Dobson SL, Rattanadechakul W, Marsland EJ. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity (Edinb)* [Internet]. 2004 Aug 5;93(2):135–42. Available from: <http://www.nature.com/articles/6800458>
- Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2016 Jan 26;14(1):20–32. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro3552>
- Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog*. 2009;5(5).
- Dong Y, Morton JC, Ramirez JL, Souza-Neto JA, Dimopoulos G. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2012 Feb 1;42(2):126–32.
- Doudoumis V, Augustinos A, Saridaki A, Parker A, Abd-Alla AMM, Bourtzis K, et al. Different laboratory populations similar bacterial profile? the case of *Glossina palpalis gambiensis* O6 Biological Sciences 0604 Genetics. *BMC Microbiol*. 2018;18(Suppl 1).
- Duguma D, Hall MW, Rugman-jones P, Stouthamer R, Terenius O, Neufeld JD, et al. Developmental succession of the microbiome of *Culex* mosquitoes. *BMC Microbiol* [Internet]. 2015;1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0475-8>
- Duguma D, Hall MW, Smartt CT, Debboun M, Neufeld JD. Microbiota variations in *Culex nigripalpus* disease vector mosquito of west Nile virus and Saint Louis encephalitis from different geographic origins. *PeerJ*. 2019;2019(1):1–17.
- Effler P V., Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, et al. Dengue fever, Hawaii, 2001–2002. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2005 [cited 2022 Feb 2];11(5):742–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15890132/>
- Eisenhofer R, Minich JJ, Marotz C, Cooper A, Knight R, Weyrich LS. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. *Trends Microbiol* [Internet]. 2019;27(2):105–17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.11.003>
- Endersby-Harshman NM, Axford JK, Hoffmann AA. Environmental Concentrations of Antibiotics May Diminish *Wolbachia* Infections in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*

- [Internet]. 2019 Jun 27;56(4):1078–86. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article/56/4/1078/5393597>
- Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37(5):699–735.
- Esposito DLA, Fonseca BAL da. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2017 Sep;21(5):540–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867017301630>
- Ezemuoka LC, Akorli EA, Aboagye-Antwi F, Akorli J. Mosquito midgut *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* affect the fitness of adult female *Anopheles gambiae* s.l. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(9 September):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0238931>
- Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conserv*. 1992 Jan 1;61(1):1–10.
- Faraji A, Egizi A, Fonseca DM, Unlu I, Crepeau T, Healy SP, et al. Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Aug 7 [cited 2022 Jun 21];8(8):e3037. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003037>
- Farenhorst M, Mouatcho JC, Kikankie CK, Brooke BD, Hunt RH, Thomas MB, et al. Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Oct 13 [cited 2022 Mar 3];106(41):17443. Available from: </pmc/articles/PMC2762667/>
- Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, et al. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(21):9047–51.
- Favoretto S, Araújo D, Oliveira D, Duarte N, Mesquita F, Zanotto P, et al. First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir. *bioRxiv*. 2016;(April):049395.
- Fay RW, Eliason D a. A Preferred Oviposition Site as a Surveillance Method for *Aedes aegypti*. *Mosq News*. 1966;26(4):531–5.
- Ferreira-de-Lima VH, Andrade P dos S, Thomazelli LM, Marrelli MT, Urbinatti PR, Almeida RMM de S, et al. Silent circulation of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) resulting from natural vertical transmission. *Sci Reports* 2020 101 [Internet]. 2020a Mar 2 [cited 2022 Feb 5];10(1):1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-60870-1>
- Ferreira-de-Lima VH, Câmara DCP, Honório NA, Lima-Camara TN. The Asian tiger mosquito in Brazil: Observations on biology and ecological interactions since its first detection in 1986. *Acta Trop*. 2020b;205(January).
- Ferreira-De-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasit Vectors* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Feb 5];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29391071/>
- DE FILIPPIS AMB, VAZEILLE M, DE OLIVEIRA RL, FAILLOUX A-B. LARGE GENETIC DIFFERENTIATION AND LOW VARIATION IN VECTOR COMPETENCE FOR DENGUE AND YELLOW FEVER VIRUSES OF *AEDES ALBOPICTUS* FROM BRAZIL, THE UNITED STATES, AND THE CAYMAN ISLANDS. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2003 Jul 1;69(1):105–14. Available from: <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.2003.69.105>
- Flores HA, Taneja de Bruyne J, O'Donnell TB, Tuyet Nhu V, Thi Giang N, Thi Xuan Trang H, et al. Multiple *Wolbachia* strains provide comparative levels of protection against dengue virus infection in *Aedes aegypti*. Jiggins FM, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2020 Apr 13;16(4):e1008433. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1008433>
- Forattini OP. Identificação de *Aedes* (*Stegomyia*) *Albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saude Publica* [Internet]. 1986 Jun;20(3):244–5. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101986000300009&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101986000300009&lng=pt&tlng=pt)
- Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*. 2014;6(10):3991–4004.
- Foster WA. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu Rev Entomol* [Internet]. 1995 [cited 2022 May 10];40:443–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7810991/>
- Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue barriers to arbovirus infection in

- mosquitoes. *Viruses*. 2015;7(7):3741–67.
- Fridman S, Izhaki I, Gerchman Y, Halpern M. Bacterial communities in floral nectar. *Environ Microbiol Rep* [Internet]. 2012 Feb;4(1):97–104. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1758-2229.2011.00309.x>
- Gabrieli P, Caccia S, Varotto-Bocazzi I, Arnoldi I, Barbieri G, Comandatore F, et al. Mosquito Trilogy: Microbiota, Immunity and Pathogens, and Their Implications for the Control of Disease Transmission. *Front Microbiol*. 2021;12(April):1–17.
- Gage DJ. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2004 Jun;68(2):280–300. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Gaio ADO, Gusmão DS, Santos A V., Berbert-Molina MA, Pimenta PFP, Lemos FJA. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasit Vectors* [Internet]. 2011 Dec 14;4(1):105. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-105>
- Ganjian N, Riviere-Cinamond A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jan 29];44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32051685/>
- Gao H, Cui C, Wang L, Jacobs-Lorena M, Wang S. Mosquito Microbiota and Implications for Disease Control. *Trends Parasitol* [Internet]. 2020 Feb;36(2):98–111. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492219302995>
- Garcia-Rejon JE, Navarro JC, Cigarroa-Toledo N, Baak-Baak CM. An updated review of the invasive *Aedes albopictus* in the Americas; geographical distribution, host feeding patterns, arbovirus infection, and the potential for vertical transmission of dengue virus. *Insects*. 2021;12(11).
- Garrett-Jones C. The prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity. *Nature*. 1964;204:1173–1175.
- Gazzoni Araújo Gonçalves G, Feitosa APS, Portela-Júnior NC, de Oliveira CMF, de Lima Filho JL, Brayner FA, et al. Use of MALDI-TOF MS to identify the culturable midgut microbiota of laboratory and wild mosquitoes. *Acta Trop* [Internet]. 2019 Dec;200(December 2018):105174. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X18315638>
- Gendrin M, Rodgers FH, Yerbanga RS, Ouédraogo JB, Basáñez MG, Cohuet A, et al. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nat Commun*. 2015;6:1–7.
- George M, Anjumol A, George G, Mohamed Hata AA. Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *African J Microbiol Res* [Internet]. 2012 Mar 16;6(10). Available from: [http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract\\_2012/16Mar/George et al.htm](http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract_2012/16Mar/George_et_al.htm)
- Georghiou GP, Wirth MC. Influence of Exposure to Single versus Multiple Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on Development of Resistance in the Mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1997 [cited 2022 Mar 3];63(3):1095–101. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16535542/>
- Gimonneau G, Tchioffo MT, Abate L, Boissière A, Awono-ambéné PH, Nsango SE, et al. Infection, Genetics and Evolution Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* microbiota from larval to adult stages. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;28:715–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.029>
- Girard M, Nelson CB, Picot V, Gubler DJ. Arboviruses: A global public health threat. In: *Vaccine*. 2020. p. 3989–94.
- GISD. Global Invasive Species Database (2022) [Internet]. 2022 [cited 2022 Jan 31]. Available from: <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=109>
- Gnambani EJ, Bilgo E, Sanou A, Dabiré RK, Diabaté A. Infection of highly insecticide-resistant malaria vector *Anopheles coluzzii* with entomopathogenic bacteria *Chromobacterium violaceum* reduces its survival, blood feeding propensity and fecundity. *Malar J* [Internet]. 2020;19(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03420-4>
- Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):1–6.
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011 Apr 16;9(4):244–53. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2537>

- Gubler DJ. Human Arbovirus Infections Worldwide. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006 Jan 25;951(1):13–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x>
- Gubler DJ. The continuing spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2022 Jan 29];45(8):1039–46. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/45/8/1039/344802>
- Guégan M, Martin E, Moro CV. Comparative analysis of the bacterial and fungal communities in the gut and the crop of *Aedes albopictus* mosquitoes: A preliminary study. *Pathogens*. 2020a;9(8):1–10.
- Guégan M, Minard G, Tran F-H, Tran Van V, Dubost A, Valiente Moro C. Short-term impacts of anthropogenic stressors on *Aedes albopictus* mosquito vector microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2018a Dec 1;94(12). Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article/doi/10.1093/femsec/fiy188/5101426>
- Guégan M, Tran Van V, Martin E, Minard G, Tran FH, Fel B, et al. Who is eating fructose within the *Aedes albopictus* gut microbiota? *Environ Microbiol*. 2020b;22(4):1193–206.
- Guégan M, Zouache K, Démichel C, Minard G, Tran Van V, Potier P, et al. The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome* [Internet]. 2018b Dec 20;6(1):49. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0435-2>
- Gunderson EL, Vogel I, Chappell L, Bulman CA, Lim KC, Luo M, et al. The endosymbiont *Wolbachia* rebounds following antibiotic treatment. *PLOS Pathog* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Jul 4];16(7):e1008623. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008623>
- Gupta AK, Nayduch D, Verma P, Shah B, Ghate H V., Patole MS, et al. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2012 Mar;79(3):581–93. Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2011.01248.x>
- Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Russo ÉDS, Peixoto AMD, Bacci M, et al. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): New perspectives for an insect-bacteria association. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(8):919–24.
- Hanson SM, Craig Jnr GB. Cold acclimation, diapause, and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* [Internet]. 1994 [cited 2022 Feb 1];31(2):192–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8189409/>
- Hasty JM, Felix GE, Amador M, Barrera R, Santiago GS, Nakasone L, et al. Entomological Investigation Detects Dengue Virus Type 1 in *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) during the 2015–16 Outbreak in Hawaii. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2020 [cited 2022 Feb 2];102(4):869. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/331124917/>
- Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc Suppl* [Internet]. 1988 Dec 1 [cited 2022 Feb 1];1:1–39. Available from: <https://europepmc.org/article/med/3068349>
- He W, Chen Y, Zhang X, Peng M, Xu D, He H, et al. Virome in adult *Aedes albopictus* captured during different seasons in Guangzhou City, China. *Parasites and Vectors*. 2021;14(1):1–13.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN. *Wolbachia* and Virus Protection in Insects. *Science* (80- ) [Internet]. 2008 Oct 31;322(5902):702–702. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1162418>
- Hegde S, Khanipov K, Albayrak L, Golovko G, Pimenova M, Saldaña MA, et al. Microbiome Interaction Networks and Community Structure From Laboratory-Reared and Field-Collected *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquito Vectors. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Sep 10;9(2160):1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02160/full>
- Hegde S, Rasgon JL, Hughes GL. The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Curr Opin Virol*. 2015;15:97–102.
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.54.1108.07090559> [Internet]. 2008 Dec 9 [cited 2022 Feb 28];54:285–302. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.54.1108.07090559>
- Heinisch MRS, Diaz-Quijano FA, Chiaravalloti-Neto F, Menezes Pancetti FG, Rocha Coelho R,

- dos Santos Andrade P, et al. Seasonal and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a municipal urban park in São Paulo, SP, Brazil. *Acta Trop*. 2019 Jan 1;189:104–13.
- Holder P, George S, Disbury M, Singe M, Kean JM, Mcfadden A. A Biosecurity Response to *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Auckland, New Zealand. *J Med Entomol* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2022 Feb 7];47(4):600. Available from: /pmc/articles/PMC7027260/
- Honório NA, Carrasquilla MC, Bargielowski IE, Nishimura N, Swan T, Lounibos LP. Male origin determines satyriation potential of *Aedes aegypti* by invasive *Aedes albopictus*. *Biol Invasions*. 2018a Mar 1;20(3):653–64.
- Honório NA, Castro MG, de Barros FSM, Magalhães M de AFM, Sabroza PC. Padrões da distribuição espacial do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em uma zona de transição no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2009;25(6):1203–14.
- Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R. Frequência de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2001 [cited 2021 Aug 18];35(4):385–91. Available from: <http://www.scielo.br/j/rsp/a/tXz93BKyFDgwx8CfKJpfd3w/abstract/?lang=pt>
- Honório NA, Silva WDC, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Mar;98(2):191–8.
- Honório NA, Wiggins K, Câmara DCP, Eastmond B, Alto BW. Chikungunya virus vector competency of Brazilian and Florida mosquito vectors. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018b Jun 1 [cited 2021 Aug 18];12(6):e0006521. Available from: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006521>
- Honório NA, Wiggins K, Eastmond B, Câmara DCP, Alto BW. Experimental vertical transmission of chikungunya virus by brazilian and florida *Aedes albopictus* populations. *Viruses*. 2019;11(4).
- Hornby JA, Moore DE, Miller TW. *Aedes albopictus* distribution, abundance, and colonization in Lee County, Florida, and its effect on *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc* [Internet]. 1994 Sep 1 [cited 2022 Feb 1];10(3):397–402. Available from: <https://europepmc.org/article/med/7807083>
- Huang W, Wang S, Jacobs-Lorena M. Use of Microbiota to Fight Mosquito-Borne Disease. *Front Genet*. 2020;11(March):1–6.
- Hughes GL, Dodson BL, Johnson RM, Murdock CC, Tsujimoto H, Suzuki Y, et al. Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014a;111(34):12498–503.
- Hughes GL, Dodson BL, Johnson RM, Murdock CC, Tsujimoto H, Suzuki Y, et al. Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014b Aug 26;111(34):12498–503. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1408888111>
- Hyde J, Correa MA, Hughes GL, Steven B, Brackney DE. Limited influence of the microbiome on the transcriptional profile of female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67811-y>
- Hyde J, Gorham C, Brackney DE, Steven B. Antibiotic resistant bacteria and commensal fungi are common and conserved in the mosquito microbiome. *PLoS One*. 2019;14(8):1–16.
- IEC. Instituto Evandro Chagas detecta vírus da Febre Amarela em mosquito *Aedes albopictus* no Brasil [Internet]. 2018 [cited 2022 Feb 5]. Available from: <https://www.iec.gov.br/descoberta/>
- Illumina. 16S Metagenomic Sequencing Library. Illumina.com [Internet]. 2013;(B):1–28. Available from: [http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)
- Illumina. BaseSpace Sequence Hub. 2017;1–6. Available from: <http://www.illumina.com/informatics/research/sequencing-data-analysis-management/basespace.html>
- INMET. INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. Tabela de Dados das Estações [Internet]. 2022. Available from: <https://tempo.inmet.gov.br/CondicoesRegistradas>
- Itoh H, Hori T, Sato Y, Nagayama A, Tago K, Hayatsu M, et al. Infection dynamics of insecticide-degrading symbionts from soil to insects in response to insecticide spraying. *ISME J* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 Mar 1];12(3):909–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29343832/>

- Jarusevicius J. Avaliação da Diversidade Microbiana Intestinal de Populações Naturais do Mosquito *Aedes aegypti* [Internet]. UNESP (Universidade Estadual Paulista); 2018. Available from: <http://hdl.handle.net/11449/154834>
- Jones RT, Sanchez LG, Fierer N. A Cross-Taxon Analysis of Insect-Associated Bacterial Diversity. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 16 [cited 2022 Jul 3];8(4):e61218. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0061218>
- Joyce JD, Nogueira JR, Bales AA, Pittman KE, Anderson JR. Interactions between La Crosse virus and bacteria isolated from the digestive tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2011;48(2):389–94.
- Juliano SA. Species Introduction and Replacement among Mosquitoes: Interspecific Resource Competition or Apparent Competition? *Ecology.* 1998 Jan;79(1):255.
- Juliano SA. Coexistence, exclusion, or neutrality? A meta-analysis of competition between *Aedes albopictus* and resident mosquitoes. *Isr J Ecol Evol.* 2010;56(3–4):325–51.
- Juma EO, Allan BF, Kim CH, Stone C, Dunlap C, Muturi EJ. Effect of life stage and pesticide exposure on the gut microbiota of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* L. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–12.
- Jupatanakul N, Pengon J, Selisana SMG, Choksawangkar W, Jaito N, Saeung A, et al. *Serratia marcescens* secretes proteases and chitinases with larvicidal activity against *Anopheles dirus*. *Acta Trop* [Internet]. 2020;212(August):105686. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105686>
- Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G. The Insect Microbiome Modulates Vector Competence for Arboviruses. *Viruses* [Internet]. 2014 Nov 11;6(11):4294–313. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/6/11/4294>
- Kamgang B, Nchoutpouen E, Simard F, Paupy C. Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2012;5(1):57. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/57>
- Kang X, Wang Y, Li S, Sun X, Lu X, Rajaofera MJN, et al. Comparative Analysis of the Gut Microbiota of Adult Mosquitoes From Eight Locations in Hainan, China. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10(December):1–12.
- Kerstens K, Lisdiyanti P, Komagata K, Swings J. The Family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: *The Prokaryotes* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2006. p. 163–200. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/0-387-30745-1\\_9](http://link.springer.com/10.1007/0-387-30745-1_9)
- Kittayapong P, Baisley KJ, Sharpe RG, Baimai V, Neill SLO. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. 2002;66(1):103–7.
- Klindworth A, Priesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):1–11.
- Konechnyi Y, Khorkavii Y, Ivanchuk K, Kobza I, Sękowska A, Korniychuk O. *Vibrio metschnikovii*: Current state of knowledge and discussion of recently identified clinical case. *Clin Case Reports* [Internet]. 2021 Apr 4;9(4):2236–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ccr3.3999>
- Kozlova E V., Hegde S, Roundy CM, Golovko G, Saldaña MA, Hart CE, et al. Microbial interactions in the mosquito gut determine *Serratia* colonization and blood-feeding propensity. *ISME J* [Internet]. 2021;15(1):93–108. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-020-00763-3>
- Krajacich BJ, Huestis DL, Dao A, Yaro AS, Diallo M, Krishna A, et al. Investigation of the seasonal microbiome of *Anopheles coluzzii* mosquitoes in Mali. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(3):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0194899>
- Kramer LD, Ebel GD. Dynamics of Flavivirus Infection in Mosquitoes. *Adv Virus Res.* 2003;60:187–232.
- Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc.* 1952;47(260):583–621.
- Kumar S, Molina-Cruz A, Gupta L, Rodrigues J, Barillas-Mury C. A Peroxidase/Dual Oxidase System Modulates Midgut Epithelial Immunity in *Anopheles gambiae*. *Science* (80- ) [Internet]. 2010 Mar 26 [cited 2022 Feb 28];327(5973):1644–8. Available from: [www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.\\_\\_\\_\\_\\_](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/science._____)
- De Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Tsetsarkin K, Higgs S, Gould EA. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: A sign of things to come? *Virol J* [Internet]. 2008 Feb 27 [cited 2022 Feb 2];5(1):1–4. Available from:



- <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-5-33>
- Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, et al. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol.* 2009;
- Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(5).
- Landmann F. The *Wolbachia* Endosymbionts. Cossart P, Roy CR, Sansonetti P, editors. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2019 Apr 12 [cited 2022 Mar 8];7(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/microbiolspec.BAI-0018-2019>
- Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio C-W, Santacruz N, et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* [Internet]. 2011 Oct 21;478(7368):250–4. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10434>
- Laurence D, Christophe L, Roger F. Using the Bio-Insecticide *Bacillus Thuringiensis* *Israelensis* in Mosquito Control. In: *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment* [Internet]. InTech; 2011 [cited 2022 Mar 3]. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01996705>
- Lazzarini L, Barzon L, Foglia F, Manfrin V, Pacenti M, Pavan G, et al. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020 Sep 10 [cited 2022 Feb 2];25(36):2001606. Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.36.2001606>
- Lee JM, Yek SH, Wilson RF, Rahman S. Characterization of the *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) holobiome: bacterial composition across land use type and mosquito sex in Malaysia. *Acta Trop.* 2020;212(August).
- Lee S, La T-M, Lee H-J, Choi I-S, Song C-S, Park S-Y, et al. Characterization of microbial communities in the chicken oviduct and the origin of chicken embryo gut microbiota. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 2;9(1):6838. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-43280-w>
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* [Internet]. 2008 Jun 20 [cited 2022 Jul 3];320(5883):1647–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18497261/>
- Li Y, Kamara F, Zhou G, Puthiyakunnon S, Li C, Liu Y, et al. Urbanization Increases *Aedes albopictus* Larval Habitats and Accelerates Mosquito Development and Survivorship. Kittayapong P, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Nov 13;8(11):e3301. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003301>
- Lin D, Zheng X, Sanogo B, Ding T, Sun X, Wu Z. Bacterial composition of midgut and entire body of laboratory colonies of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Southern China. *Parasit Vectors* [Internet]. 2021;1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05050-4>
- Lindh JM, Borg-Karlson A-K, Faye I. Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. *Acta Trop* [Internet]. 2008a Sep;107(3):242–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X08001836>
- Lindh JM, Kännaste A, Knols BGJ, Faye I, Borg-Karlson AK. Oviposition responses of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) and identification of volatiles from bacteria-containing solutions. *J Med Entomol.* 2008b;45(6):1039–49.
- Liu HY, Wang YK, Zhi CC, Xiao JH, Huang DW. A novel approach to eliminate *Wolbachia* infections in *Nasonia vitripennis* revealed different antibiotic resistance between two bacterial strains. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 4];355(2):163–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24831608/>
- Liu K, Zhang Y, Yu Z, Xu Q, Zheng N, Zhao S, et al. Ruminal microbiota–host interaction and its effect on nutrient metabolism. *Anim Nutr* [Internet]. 2021 Mar;7(1):49–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405654520301220>
- Liu Z, Zhang Z, Lai Z, Zhou T, Jia Z, Gu J, et al. Temperature increase enhances *Aedes albopictus* competence to transmit dengue virus. *Front Microbiol.* 2017;8(DEC):1–7.
- Lounibos LP, Escher RL, Lourenço-De-Oliveira R. Asymmetric evolution of photoperiodic diapause in temperate and tropical invasive populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am.* 2003;96(4):512–8.
- Lounibos LP, Kramer LD. Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and vectorial capacity for chikungunya virus. *J Infect Dis.* 2016;214(Suppl 5):S453–8.
- Luis P, Vallon L, Tran FH, Hugoni M, Tran-Van V, Mavingui P, et al. *Aedes albopictus* mosquitoes host a locally structured mycobiota with evidence of reduced fungal diversity in invasive

- populations. *Fungal Ecol.* 2019;39:257–66.
- Maciel-De-Freitas R, Neto RB, Gonçalves JM, Codeço CT, Lourenço-De-Oliveira R. Movement of dengue vectors between the human modified environment and an urban forest in Rio de Janeiro. *J Med Entomol.* 2006;43(6):1112–20.
- MacLeod HJ, Dimopoulos G, Short SM. Larval Diet Abundance Influences Size and Composition of the Midgut Microbiota of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 Jun 18;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.645362/full>
- Madewell ZJ. Arboviruses and Their Vectors. *South Med J* [Internet]. 2020 Oct;113(10):520–3. Available from: <http://sma.org/southern-medical-journal/article/arboviruses-and-their-vectors>
- Maia LMS, Bezerra MCF, Costa MCS, Souza EM, Oliveira MEB, Ribeiro ALM, et al. Natural vertical infection by dengue virus serotype 4, Zika virus and Mayaro virus in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus*. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2022 Feb 6];33(3):437–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mve.12369>
- Mains JW, Brelsfoard CL, Rose RI, Dobson SL. Female Adult *Aedes albopictus* Suppression by Wolbachia-Infected Male Mosquitoes. *Sci Reports* 2016 61 [Internet]. 2016 Sep 23 [cited 2022 Mar 8];6(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep33846>
- Mancini M V, Damiani C, Accoti A, Tallarita M, Nunzi E, Cappelli A, et al. Estimating bacteria diversity in different organs of nine species of mosquito by next generation sequencing. 2018;1–10.
- Mancini MV, Herd CS, Ant TH, Murdochy SM, Sinkins SP. Wolbachia strain wAu efficiently blocks arbovirus transmission in *Aedes albopictus*. *Samy AM, editor. PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020 Mar 10;14(3):e0007926. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007926>
- Mancini MV, Spaccapelo R, Damiani C, Accoti A, Tallarita M, Petraglia E, et al. Paratransgenesis to control malaria vectors: A semi-field pilot study. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1427-3>
- Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbø M, Knight R, Peddada SD. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Heal Dis* [Internet]. 2015 May 29;26. Available from: <http://www.microbecolhealthdis.net/index.php/mehd/article/view/27663>
- Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* [Internet]. 2015;3(1):1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* [Internet]. 2011 May 2;17(1):10. Available from: <http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>
- Mayer S V., Tesh RB, Vasilakis N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop.* 2017 Feb 1;166:155–63.
- McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, Desantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2012;6(3):610–8.
- McKnight DT, Huerlimann R, Bower DS, Schwarzkopf L, Alford RA, Zenger KR. microDecon: A highly accurate read-subtraction tool for the post-sequencing removal of contamination in metabarcoding studies. *Environ DNA* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Sep 11];1(1):14–25. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/edn3.11>
- Medeiros AS, Costa DMP, Branco MSD, Sousa DMC, Monteiro JD, Galvão SPM, et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: Importance of virological and entomological surveillance. *Ariën KK, editor. PLoS One* [Internet]. 2018 Mar 13;13(3):e0194108. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0194108>
- Medeiros MCI, Seabourn PS, Rollins RL, Yoneishi NM. Mosquito Microbiome Diversity Varies Along a Landscape - Scale Moisture Gradient. *Microb Ecol* [Internet]. 2021;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01865-x>
- Medley KA, Westby KM, Jenkins DG. Rapid local adaptation to northern winters in the invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: A moving target. *J Appl Ecol* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2022 Feb 14];56(11):2518–27. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-2664.13480>
- Metelmann S, Liu X, Lu L, Caminade C, Liu K, Cao L, et al. Assessing the suitability for *Aedes albopictus* and dengue transmission risk in China with a delay differential equation model.

- Zinszer K, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2021 Mar 26;15(3):e0009153. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0009153>
- Metzger JP. O que é ecologia de paisagens? Biota Neotrop. 2001;1(1–2):1–9.
- Minard G, Mavingui P, Moro CV. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. Parasites and Vectors. 2013a;6(146).
- Minard G, Tikhonov G, Ovaskainen O, Saastamoinen M. The microbiome of the *Melitaea cinxia* butterfly shows marked variation but is only little explained by the traits of the butterfly or its host plant. Environ Microbiol [Internet]. 2019 Nov 9;21(11):4253–69. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.14786>
- Minard G, Tran FH, Dubost A, Tran-Van V, Mavingui P, Valiente Moro C. Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: A pilot study. Front Cell Infect Microbiol. 2014;4(MAY):1–9.
- Minard G, Tran FH, Raharimalala FN, Hellard E, Ravelonandro P, Mavingui P, et al. Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. FEMS Microbiol Ecol. 2013b;83(1):63–73.
- Minard G, Tran FH, Van VT, Fournier C, Potier P, Roiz D, et al. Shared larval rearing environment, sex, female size and genetic diversity shape *Ae. albopictus* bacterial microbiota. PLoS One. 2018;13(4):1–16.
- Minard G, Tran FH, Van VT, Goubert C, Bellet C, Lambert G, et al. French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. Front Microbiol. 2015;6(SEP):1–15.
- Mitraka E, Stathopoulos S, Siden-Kiamos I, Christophides GK, Louis C. *Asaia* accelerates larval development of *Anopheles gambiae*. Pathog Glob Health. 2013;107(6):305–11.
- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. N Engl J Med [Internet]. 2016 Mar 10;374(10):951–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1600651>
- Moll RM, Romoser WS, Modrakowski MC, Moncayo AC, Lerdthusnee K. Meconial Peritrophic Membranes and the Fate of Midgut Bacteria During Mosquito (Diptera: Culicidae) Metamorphosis. J Med Entomol [Internet]. 2001 Jan 1;38(1):29–32. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1603/0022-2585-38.1.29>
- Molloy JC, Sinkins SP. *Wolbachia* Do Not Induce Reactive Oxygen Species-Dependent Immune Pathway Activation in *Aedes albopictus*. Viruses [Internet]. 2015 Aug 13 [cited 2022 Jul 25];7(8):4624. Available from: <https://pmc/articles/PMC4576197/>
- Monge S, García-Ortúzar V, López Hernández B, Lopaz Pérez MÁ, Delacour-Estrella S, Sánchez-Seco MPP, et al. Characterization of the first autochthonous dengue outbreak in Spain (August–September 2018). Acta Trop. 2020 May 1;205:105402.
- Moro MS, Wu X, Wei W, Mendes LW, Allen KC, Pinheiro JB, et al. Characterization and Comparison of Intestinal Bacterial Microbiomes of *Euschistus heros* and *Piezodorus guildinii* Collected in Brazil and the United States. Front Microbiol [Internet]. 2021 Oct 27;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.769965/full>
- Mosquera KD, Fernandes GR, David MR, Maciel-de-freitas R, Moreira LA, Marcelo G, et al. Egg-laying by female *Aedes aegypti* shapes the bacterial communities of breeding sites. bioRxiv. 2022;2022.02.22.481482.
- Mousson L, Zouache K, Arias-Goeta C, Raquin V, Mavingui P, Failloux AB. The Native *Wolbachia* Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus*. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(12).
- Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. Sinnis P, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2017 Jul 20;11(7):e0005625. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005625>
- Multini LC, de Souza AL da S, Marrelli MT, Wilke ABB. Population structuring of the invasive mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on a microgeographic scale. Samy AM, editor. PLoS One [Internet]. 2019 Aug 2;14(8):e0220773. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0220773>
- Muturi EJ, Donthu RK, Fields CJ, Moise IK, Kim CH. Effect of pesticides on microbial communities in container aquatic habitats. Sci Rep [Internet]. 2017a;7(March):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44565>
- Muturi EJ, Kim CH, Bara J, Bach EM, Siddappaji MH. *Culex pipiens* and *Culex restuans* mosquitoes harbor distinct microbiota dominated by few bacterial taxa. Parasites and Vectors [Internet]. 2016a;9(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016->

- Muturi EJ, Lagos-Kutz D, Dunlap C, Ramirez JL, Rooney AP, Hartman GL, et al. Mosquito microbiota cluster by host sampling location. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–12.
- Muturi EJ, Njoroge TM, Dunlap C, Cáceres CE. Blood meal source and mixed blood-feeding influence gut bacterial community composition in *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2021;14(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04579-8>
- Muturi EJ, Ramirez JL, Rooney AP, Dunlap C. Association between fertilizer-mediated changes in microbial communities and *Aedes albopictus* growth and survival. *Acta Trop*. 2016b;164:54–63.
- Muturi EJ, Ramirez JL, Rooney AP, Kim C-H. Comparative analysis of gut microbiota of mosquito communities in central Illinois. Kittayapong P, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017b Feb 28;11(2):e0005377. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005377>
- do Nascimento RM, Campolina TB, Chaves BA, Delgado JLF, Godoy RSM, Pimenta PFP, et al. The influence of culture-dependent native microbiota in Zika virus infection in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors* [Internet]. 2022 Dec 17;15(1):57. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-022-05160-7>
- Ngoagouni C, Kamgang B, Nakouné E, Paupy C, Kazanji M. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: what consequences for emerging diseases? *Parasit Vectors* [Internet]. 2015 Mar 31 [cited 2022 Feb 2];8(1). Available from: </pmc/articles/PMC4381565/>
- Novakova E, Woodhams DC, Rodríguez-Ruano SM, Brucker RM, Leff JW, Maharaj A, et al. Mosquito Microbiome Dynamics, a Background for Prevalence and Seasonality of West Nile Virus. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Apr 4;8:526. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00526/full>
- O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res* [Internet]. 2015 Jan;277:32–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432814004768>
- O'Meara GF, Evans LF, Gettman AD, Cuda JP. Spread of *Aedes albopictus* and Decline of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Florida. *J Med Entomol* [Internet]. 1995 Jul 1 [cited 2022 Feb 1];32(4):554–62. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article/32/4/554/879649>
- Ogunlade ST, Meehan MT, Adekunle AI, Rojas DP, Adegboye OA, McBryde ES. A Review: Aedes-Borne Arboviral Infections, Controls and Wolbachia-Based Strategies. *Vaccines* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Jan 29];9(1):1–23. Available from: </pmc/articles/PMC7827552/>
- de Oliveira S, Villela DAM, Dias FBS, Moreira LA, Maciel de Freitas R. How does competition among wild type mosquitoes influence the performance of *Aedes aegypti* and dissemination of *Wolbachia pipiensis*? *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(10):1–20.
- Oliveira TMP, Sanabani SS, Sallum MAM. Bacterial diversity associated with the abdomens of naturally *Plasmodium*-infected and non-infected *Nyssorhynchus darlingi*. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):180.
- Oliveira VC de, Almeida Neto LC de. Ocorrência de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em bromélias cultivadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2017 Jan 23 [cited 2021 Aug 18];33(1):e00071016. Available from: <https://www.google.com.br/intl/pt-br/earth/>
- Onyango GM, Bialosuknia MS, Payne FA, Mathias N, Ciota TA, Kramer DL. Increase in temperature enriches heat tolerant taxa in *Aedes aegypti* midguts. *Sci Rep* [Internet]. 2020;(0123456789):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76188-x>
- Onyango MG, Lange R, Bialosuknia S, Payne A, Mathias N, Kuo L, et al. Zika virus and temperature modulate *Elizabethkingia anophelis* in *Aedes albopictus*. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Mar 15];14(1):1–15. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-021-05069-7>
- Ørsted M, Yashiro E, Hoffmann AA, Kristensen TN. Population bottlenecks constrain host microbiome diversity and genetic variation impeding fitness. *PLOS Genet*. 2022;18(5):e1010206.
- Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol Ecol*. 2012;21(20):5138–50.
- Pagès F, Peyrefitte CN, Mve MT, Jarjaval F, Brisse S, Iteman I, et al. *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. *PLoS One* [Internet]. 2009 Mar 4 [cited 2022 Feb 2];4(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19259263/>
- Pancetti FGM, Honório NA, Urbinatti PR, Lima-Camara TN. Twenty-eight years of *Aedes*

- albopictus in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2015 Feb;48(1):87–9. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822015000100087&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822015000100087&lng=en&tlng=en)
- Pang X, Xiao X, Liu Y, Zhang R, Liu J, Liu Q, et al. Mosquito C-type lectins maintain gut microbiome homeostasis. *Nat Microbiol* 2016 15 [Internet]. 2016 Mar 14 [cited 2022 Feb 28];1(5):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201623>
- Paniagua Voirol LR, Valsamakis G, Yu M, Johnston PR, Hilker M. How the “kitome” influences the characterization of bacterial communities in lepidopteran samples with low bacterial biomass. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Jun 16];130(6):1780–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33128818/>
- Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David J-P. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest Manag Sci* [Internet]. 2011 Jan [cited 2022 Mar 3];67(1):122–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21162152/>
- Pathalam G, Rajendran HAD, Appadurai DR, Gandhi MR, Michael GP, Savarimuthu I, et al. Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito larvicidal properties. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* [Internet]. 2017 Jun;6(2):209–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2314853516301494>
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes Infect*. 2009 Dec 1;11(14–15):1177–85.
- Pereira-dos-Santos T, Roiz D, Lourenço-de-Oliveira R, Paupy C. A Systematic Review: Is *Aedes albopictus* an Efficient Bridge Vector for Zoonotic Arboviruses? *Pathogens* [Internet]. 2020 Apr 7;9(4):266. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/4/266>
- Pereira dos Santos T, Roiz D, Santos de Abreu FV, Luz SLB, Santalucia M, Jiolle D, et al. Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018 Dec 1;7(1):1–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/s41426-018-0194-y>
- Pereira TN, Carvalho FD, De Mendonça SF, Rocha MN, Moreira LA. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. Kittayapong P, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020 Apr 14;14(4):e0007518. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007518>
- Pereira TN, Carvalho FD, Rugani JN, de Carvalho VR, Jarusevicius J, Souza-Neto JA, et al. Mayaro virus: The potential role of microbiota and wolbachia. *Pathogens*. 2021;10(5):1–16.
- Pessanha JEM, Caiiffa WT, Cecilio AB, Iani FC de M, Araujo SC, Nascimento JC, et al. Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2011 Feb;44(1):103–5. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822011000100023&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000100023&lng=en&tlng=en)
- Pike A, Dong Y, Dizaji NB, Gacita A, Mongodin EF, Dimopoulos G. Changes in the microbiota cause genetically modified *Anopheles* to spread in a population. *Science* [Internet]. 2017;357(6358):1396–9. Available from: [http://science.sciencemag.org/content/357/6358/1396.full?utm\\_source=sciencemagazine&utm\\_medium=twitter&utm\\_campaign=6358issue-15492](http://science.sciencemag.org/content/357/6358/1396.full?utm_source=sciencemagazine&utm_medium=twitter&utm_campaign=6358issue-15492)
- Ponnusamy L, Böröczky K, Wesson DM, Schal C, Apperson CS. Bacteria stimulate hatching of yellow fever mosquito eggs. *PLoS One*. 2011;6(9):1–10.
- Prophiro JS, Silva OS, Luna JED, Piccoli CF, Kanis LA, da Silva MAN. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2011 May [cited 2022 Feb 7];44(3):300–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21537795/>
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2022 Mar 22];41(D1):D590–6. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/41/D1/D590/1069277>
- Raharimalala FN, Boukraa S, Bawin T, Boyer S, Francis F. Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes: first step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. *Parasitol Res* [Internet]. 2016 Apr 16;115(4):1391–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4873-5>

- Ramirez JL, Short SM, Bahia AC, Saraiva RG, Dong Y, Kang S, et al. *Chromobacterium Csp\_P* Reduces Malaria and Dengue Infection in Vector Mosquitoes and Has Entomopathogenic and In Vitro Anti-pathogen Activities. Levashina E, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2014 Oct 23;10(10):e1004398. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004398>
- Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, et al. Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. O'Neill SL, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012 Mar 6;6(3):e1561. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001561>
- Ramos-Nino ME, Fitzpatrick DM, Eckstrom KM, Tighe S, Hattaway LM, Hsueh AN, et al. Metagenomic analysis of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes from Grenada, West Indies. Leisnham PT, editor. *PLoS One* [Internet]. 2020 Apr 13;15(4):e0231047. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0231047>
- Ranasinghe K, Gunathilaka N, Amarasinghe D, Rodrigo W, Udayanga L. Diversity of midgut bacteria in larvae and females of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Gampaha District, Sri Lanka. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2021;14(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04900-5>
- Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol* [Internet]. 2009 May 19 [cited 2022 Mar 15];9(1):1–22. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-96>
- Raquin V, Moro CV, Saucereau Y, Tran FH, Potier P, Mavingui P. Native *Wolbachia* from *Aedes albopictus* blocks chikungunya virus infection in cellulo. *PLoS One*. 2015;10(4):1–19.
- Reiter P. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: The shape of things to come? *J Am Mosq Control Assoc*. 1998;14(1):83–94.
- Ricas Rezende H, Malta Romano C, Morales Claro I, Santos Caleiro G, Cerdeira Sabino E, Felix AC, et al. First report of *Aedes albopictus* infected by Dengue and Zika virus in a rural outbreak in Brazil. Moreira LA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2020 Mar 12;15(3):e0229847. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0229847>
- Rodgers FH, Gendrin M, Christophides GK. The Mosquito Immune System and Its Interactions With the Microbiota. In: *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 1* [Internet]. Elsevier; 2017a. p. 101–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805350-8.00006-4>
- Rodgers FH, Gendrin M, Wyer CAS, Christophides GK. Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathog* [Internet]. 2017b;13(5):1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006391>
- Rodríguez-Ruano SM, Juhaňáková E, Vávra J, Nováková E. Methodological Insight Into Mosquito Microbiome Studies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Mar 17;10:86.
- Romoli O, Gendrin M. The tripartite interactions between the mosquito, its microbiota and *Plasmodium*. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–8.
- Romoli O, Schönbeck JC, Hapfelmeier S, Gendrin M. Production of germ-free mosquitoes via transient colonisation allows stage-specific investigation of host–microbiota interactions. *Nat Commun* 2021 121 [Internet]. 2021 Feb 11 [cited 2022 Mar 1];12(1):1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21195-3>
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* [Internet]. 2018 Dec 25;6(1):78. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0457-9>
- Rossi P, Ricci I, Cappelli A, Damiani C, Ulissi U, Mancini MV, et al. Mutual exclusion of *Asaia* and *Wolbachia* in the reproductive organs of mosquito vectors. *Parasit Vectors* [Internet]. 2015 Dec 17;8(1):278. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-0888-0>
- Rosso F, Tagliapietra V, Albanese D, Pindo M, Baldacchino F, Arnoldi D, et al. Reduced diversity of gut microbiota in two *Aedes* mosquitoes species in areas of recent invasion. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11.
- Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nat* 2018 5557695 [Internet]. 2018 Feb 28 [cited 2022 Jun 25];555(7695):210–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature25973>

- La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, september 2010. *Eurosurveillance* [Internet]. 2010 Sep 30 [cited 2022 Feb 2];15(39):1–5. Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.39.19676-en>
- Rudman SM, Greenblum S, Hughes RC, Rajpurohit S, Kiratli O, Lowder DB, et al. Microbiome composition shapes rapid genomic adaptation of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(40):20025–32.
- Saab SA, Dohna H zu, Nilsson LKJ, Onorati P, Nakhleh J, Terenius O, et al. The environment and species affect gut bacteria composition in laboratory co-cultured *Anopheles gambiae* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 25;10(1):3352. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-60075-6>
- Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol*. 2014;12(1):1–12.
- Sandeu MM, Maffo CGT, Dada N, Njiokou F, Hughes GL, Wondji CS. Seasonal variation of microbiota composition in *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* in two different eco-geographical localities in Cameroon. *Med Vet Entomol*. 2022;(May):1–14.
- Saraiva RG, Dimopoulos G. Bacterial natural products in the fight against mosquito-transmitted tropical diseases. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2020;37(3):338–54. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9NP00042A>
- Saraiva RG, Fang J, Kang S, Angleró-Rodríguez YI, Dong Y, Dimopoulos G. Aminopeptidase secreted by *Chromobacterium* sp. Panama inhibits dengue virus infection by degrading the E protein. Rasgon JL, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018a Apr 25;12(4):e0006443. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006443>
- Saraiva RG, Huitt-Roehl CR, Tripathi A, Cheng YQ, Bosch J, Townsend CA, et al. *Chromobacterium* spp. mediate their anti-*Plasmodium* activity through secretion of the histone deacetylase inhibitor romidepsin. *Sci Rep*. 2018b;8(1):1–14.
- Saraiva RG, Kang S, Simões ML, Angleró-Rodríguez YI, Dimopoulos G. Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2016;64:53–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.015>
- Sarma DK, Kumar M, Dhurve J, Pal N, Sharma P, James MM, et al. Influence of Host Blood Meal Source on Gut Microbiota of Wild Caught *Aedes aegypti*, a Dominant Arboviral Disease Vector. *Microorganisms*. 2022;10(2):332.
- Scates SS, O’Neal ST, Anderson TD. Bacteria-mediated modification of insecticide toxicity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2019;161(June):77–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.07.016>
- Schaffner F, Medlock JM, Bortel W Van. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2013 Aug;19(8):685–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14614130>
- Schirbel A, Kessler S, Rieder F, West G, Rebert N, Asosingh K, et al. Pro-Angiogenic Activity of TLRs and NLRs: A Novel Link Between Gut Microbiota and Intestinal Angiogenesis. *Gastroenterology* [Internet]. 2013 Mar;144(3):613–623.e9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508512016174>
- Scholte EJ, Takken W, Knols BGJ. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop*. 2007 Jun 1;102(3):151–8.
- Schrieke H, Maignien L, Constancias F, Trigodet F, Chakloute S, Rakotoarivony I, et al. The mosquito microbiome includes habitat-specific but rare symbionts. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2022;20:410–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.12.019>
- Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni M. *Aedes* spp. and Their Microbiota: A Review. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 Sep 4;10:2036. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02036/full>
- Scolari F, Sandionigi A, Carlassara M, Bruno A, Casiraghi M, Bonizzoni M. Exploring Changes in the Microbiota of *Aedes albopictus*: Comparison Among Breeding Site Water, Larvae, and Adults. *Front Microbiol*. 2021;12(January):1–18.
- Seabourn P, Spafford H, Yoneishi N, Medeirosid M. The *aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) microbiome varies spatially and with ascogregarine infection. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(8):1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008615>
- Segata N, Baldini F, Pompon J, Garrett WS, Truong DT, Dabiré RK, et al. The reproductive tracts

- of two malaria vectors are populated by a core microbiome and by gender-and swarm-enriched microbial biomarkers. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(April):1–10. Available from: <https://dx.doi.org/10.1038/srep24207>
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol* [Internet]. 2016 Aug 19;14(8):e1002533. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W. The Genetics and Cell Biology of Wolbachia-Host Interactions. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130354> [Internet]. 2008 Nov 4 [cited 2022 Mar 8];42:683–707. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.41.110306.130354>
- Serufo JC, Oca HM de, Tavares VA, Souza AM, Rosa R V., Jamal MC, et al. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1993 Sep;88(3):503–4. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761993000300025&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761993000300025&lng=en&tlng=en)
- Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2001;47(2):119–25.
- Sharma P, Rani J, Chauhan C, Kumari S, Tevatiya S, De T Das, et al. Altered Gut Microbiota and Immunity Defines *Plasmodium vivax* Survival in *Anopheles stephensi*. *Front Immunol* [Internet]. 2020 May 14 [cited 2021 Sep 11];11. Available from: [/pmc/articles/PMC7240202/](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimm.2020.00202/full)
- Sharma P, Sharma S, Maurya RK, De T Das, Thomas T, Lata S, et al. Salivary glands harbor more diverse microbial communities than gut in *Anopheles culicifacies*. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014 May 20 [cited 2022 Jul 24];7(1):235. Available from: [/pmc/articles/PMC4062515/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4062515/)
- Sharon G, Segal D, Ringo JM, Hefetz A, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(46):20051–6.
- Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2013;34(1):39–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.001>
- Shi C, Zhao L, Atoni E, Zeng W, Hu X, Matthijssens J, et al. Stability of the Virome in Lab- and Field-Collected *Aedes albopictus* Mosquitoes across Different Developmental Stages and Possible Core Viruses in the Publicly Available Virome Data of *Aedes* Mosquitoes. *mSystems*. 2020;5(5).
- Short SM, Mongodin EF, MacLeod HJ, Talyuli OAC, Dimopoulos G. Amino acid metabolic signaling influences *Aedes aegypti* midgut microbiome variability. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017;11(7):1–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005677>
- Short SM, Van Tol S, Smith B, Dong Y, Dimopoulos G. The mosquito adicidal *Chromobacterium* sp. Panama causes transgenerational impacts on fitness parameters and elicits xenobiotic gene responses. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–15.
- Sim S, Jupatanakul N, Dimopoulos G. Mosquito immunity against arboviruses. *Viruses*. 2014;6(11):4479–504.
- Simhadri RK, Fast EM, Guo R, Schultz MJ, Vaisman N, Ortiz L, et al. The Gut Commensal Microbiome of *Drosophila melanogaster* Is Modified by the Endosymbiont *Wolbachia*. *mSphere*. 2017;2(5):1–16.
- Simões ML, Dimopoulos G. A mosquito mediator of parasite-induced immune priming. *Trends Parasitol* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Feb 28];31(9):402–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26254960/>
- Singh A, Allam M, Kwenda S, Khumalo ZTH, Ismail A, Oliver S V. The dynamic gut microbiota of zoophilic members of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae). *Sci Rep* [Internet]. 2022;1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05437-y>
- Sinkins SP, Braig HR, Oneill SL. *Wolbachia pipientis*: Bacterial Density and Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility between Infected Populations of *Aedes albopictus*. *Exp Parasitol* [Internet]. 1995 Nov;81(3):284–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489485711198>
- Smartt CT, Stenn TMS, Chen T-Y, Teixeira MG, Queiroz EP, Souza Dos Santos L, et al. Evidence of Zika Virus RNA Fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Field-Collected Eggs From Camaçari, Bahia, Brazil. *J Med Entomol* [Internet]. 2017 Jul;54(4):1085–7. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jme/tjx058>
- Song X, Wang M, Dong L, Zhu H, Wang J. PGRP-LD mediates *A. stephensi* vector competency by regulating homeostasis of microbiota-induced peritrophic matrix synthesis. *PLOS Pathog*



- [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Feb 28];14(2):e1006899. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006899>
- Srinivasan MC, Laxman RS, Deshpande M V. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 1991 Mar;7(2):171–84. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00328987>
- Stalinski R, Tetreau G, Gaude T, Després L. Pre-selecting resistance against individual Bti Cry toxins facilitates the development of resistance to the Bti toxins cocktail. *J Invertebr Pathol*. 2014 Jun 1;119:50–3.
- Stathopoulos S, Neafsey DE, Lawniczak MKN, Muskavitch MAT, Christophides GK. Genetic Dissection of *Anopheles gambiae* Gut Epithelial Responses to *Serratia marcescens*. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1003897.
- Steven B, LaReau J, Hyde J, Brackney D. Introducing an Environmental Microbiome to Axenic Insectary Reared Mosquitoes Alters Host and Microbe Blood Digestion Phenotypes. 2021 [cited 2022 Mar 1]; Available from: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1181832/v1>
- Strand MR. Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. *Curr Opin Insect Sci* [Internet]. 2018;28:59–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.05.008>
- Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*. 2017;5(1):1–11.
- Straub TJ, Shaw WR, Marcenac P, Sawadogo SP, Dabiré RK, Diabaté A, et al. The *Anopheles coluzzii* microbiome and its interaction with the intracellular parasite *Wolbachia*. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70745-0>
- Tainchum K, Dupont C, Chareonviriyaphap T, Jumas-Bilak E, Bangs MJ, Manguin S. Bacterial Microbiome in Wild-Caught *Anopheles* Mosquitoes in Western Thailand. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 May 21;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00965/full>
- Tawidian P, Coon KL, Jumpponen A, Cohnstaedt LW, Michel K. Host-Environment Interplay Shapes Fungal Diversity in Mosquitoes. *mSphere* [Internet]. 2021 Oct 27 [cited 2022 Jul 26];6(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38550294/>
- Tchioffo MT, Boissière A, Abate L, Nsango SE. Dynamics of Bacterial Community Composition in the Malaria Mosquito's Epithelia. 2016;6(January):1–9.
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*. 2008;6(12):2753–63.
- Terenius O, Lindh JM, Eriksson-Gonzales K, Bussièrè L, Laugen AT, Bergquist H, et al. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;80(3):556–65.
- Tetreau G, Stalinski R, David J-P, Després L. Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013 Nov;108(7):894–900. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762013000700894&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762013000700894&lng=en&tlng=en)
- Thongsripong P, Chandler JA, Green AB, Kittayapong P, Wilcox BA, Kapan DD, et al. Mosquito vector-associated microbiota: Metabarcoding bacteria and eukaryotic symbionts across habitat types in Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. *Ecol Evol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 Mar 9];8(2):1352–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29375803/>
- Thukral AK. A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agric Res J*. 2017;54(1):1.
- Tinker KA, Ottesen EA. Differences in Gut Microbiome Composition Between Sympatric Wild and Allopatric Laboratory Populations of Omnivorous Cockroaches. *Front Microbiol*. 2021;12(July):1–12.
- Tortosa P, Charlat S, Labbé P, Dehecq JS, Barré H, Weill M. *Wolbachia* age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: A host evolutionary response to Cytoplasmic Incompatibility? *PLoS One*. 2010;5(3):4–9.
- Triplet F, Lounibos LP, Robbins D, Moran J, Nishimura N, Blosser EM. Competitive Reduction by Satyrization? Evidence for Interspecific Mating in Nature and Asymmetric Reproductive Competition between Invasive Mosquito Vectors. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2011 Aug [cited 2022 Feb 1];85(2):265. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2144823/>
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*. 2007;3(12):1895–906.
- Tuanudom R, Yurayart N, Rodkhum C, Tiawsirisup S. Diversity of midgut microbiota in laboratory-colonized and field-collected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): A preliminary study. *Heliyon*. 2021;7(10).

- Valiente Moro C, Tran FH, Nantenaina Raharimalala F, Ravelonandro P, Mavingui P. Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiol* [Internet]. 2013;13(1):1. Available from: [BMC Microbiology](https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-1)
- Vayssier-Taussat M, Albina E, Citti C, Cosson J-F, Jacques M-A, Lebrun M-H, et al. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2014 Mar 5;4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00029/abstract>
- Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM. Diversity and Antibiotic Resistance Patterns of Sphingomonadaceae Isolates from Drinking Water. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2011 Aug 15;77(16):5697–706. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00579-11>
- Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux A-B, Lourenco-de-Oliveira R. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J Virol*. 2014;88(11):6294–306.
- Villegas LEM, Campolina TB, Barnabe NR, Orfano AS, Chaves BA, Norris DE, et al. Zika virus infection modulates the bacterial diversity associated with *Aedes aegypti* as revealed by metagenomic analysis. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190352.
- Villegas LM, Pimenta PFP. Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: A portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(5):672–84.
- Vogel KJ, Coon KL. Functions and mechanisms of symbionts of insect disease vectors. *Adv Insect Phys*. 2020;58:233–75.
- Vogel KJ, Valzania L, Coon KL, Brown MR, Strand MR. Transcriptome Sequencing Reveals Large-Scale Changes in Axenic *Aedes aegypti* Larvae. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017;11(1):1–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005273>
- Wang H, Liu H, Peng H, Wang Y, Zhang C, Guo X, et al. A symbiotic gut bacterium enhances *Aedes albopictus* resistance to insecticide. Abd-Alla AMM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2022 Mar 4;16(3):e0010208. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0010208>
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2007 Aug 15;73(16):5261–7. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang S, Dos-Santos ALA, Huang W, Liu KC, Oshaghi MA, Wei G, et al. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science* (80- ) [Internet]. 2017 Sep 29;357(6358):1399–402. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aan5478>
- Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, Jacobs-Lorena M. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(31):12734–9.
- Wang S, Jacobs-Lorena M. Paratransgenesis Applications. In: *Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 1* [Internet]. Elsevier; 2017. p. 219–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128053508000131>
- Wang X, Liu T, Wu Y, Zhong D, Zhou G, Su X, et al. Bacterial microbiota assemblage in *Aedes albopictus* mosquitoes and its impacts on larval development. *Mol Ecol*. 2018;27(14):2972–85.
- Wang Y, Gilbreath TM, Kukutla P, Yan G, Xu J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One*. 2011;6(9):1–9.
- Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*. 2010 Feb 1;85(2):328–45.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2008 Oct;6(10):741–51. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro1969>
- White DC, Sutton SD, Ringelberg DB. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 1996 Jun;7(3):301–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166996800346>
- Wilder-Smith A, Gubler DJ, Weaver SC, Monath TP, Heymann DL, Scott TW. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect Dis*. 2017 Mar 1;17(3):e101–6.
- Wilder-Smith A, Leong WY. Importation of yellow fever into China: assessing travel patterns. *J Travel Med* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2022 Jan 29];24(4). Available from:

- <https://academic.oup.com/jtm/article/24/4/tax008/3095983>
- Wilke ABB, Marrelli MT. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasit Vectors* [Internet]. 2015 Dec 24;8(1):342. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/342>
- Wu J-Y, Lun Z-R, James AA, Chen X-G. Dengue Fever in Mainland China. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010 Sep [cited 2021 Aug 15];83(3):664. Available from: </pmc/articles/PMC2929067/>
- Wu P, Sun P, Nie K, Zhu Y, Shi M, Xiao C, et al. A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness to Arboviruses. *Cell Host Microbe*. 2019;25(1):101-112.e5.
- Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(7).
- Yadav KK, Datta S, Naglot A, Bora A, Hmuaka V, Bhagyawant S, et al. Diversity of cultivable midgut microbiota at different stages of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India. *PLoS One*. 2016;11(12):1–16.
- Yang CF, Hou JN, Chen TH, Chen WJ. Discriminable roles of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in establishment of dengue outbreaks in Taiwan. *Acta Trop*. 2014 Feb 1;130(1):17–23.
- Yin C, Sun P, Yu X, Wang P, Cheng G. Roles of Symbiotic Microorganisms in Arboviral Infection of Arthropod Vectors. *Trends Parasitol*. 2020;36(7):607–15.
- Zheng X, Zhang D, Li Y, Yang C, Wu Y, Liang X, et al. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Mar 8];572(7767):56–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31316207/>
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev*. 2008;32(5):723–35.
- Zouache K, Fontaine A, Vega-Rua A, Mousson L, Thiberge J, Lourenco-De-Oliveira R, et al. Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2014 Oct 7;281(1792):20141078. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2014.1078>
- Zouache K, Michelland RJ, Failloux AB, Grundmann GL, Mavingui P. Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Mol Ecol* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2022 Mar 15];21(9):2297–309. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-294X.2012.05526.x>
- Zouache K, Raharimalala FN, Raquin V, Tran-Van V, Raveloson LHR, Ravelonandro P, et al. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol*. 2011;75(3):377–89.
- Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mousson L, Failloux AB, Mavingui P. Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One*. 2009;4(7).
- Zug R, Hammerstein P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One*. 2012;7(6):7–9.