VICTÓRIA VALENTE CALIFRE DE MELLO

CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA BACTERIANO DE MOSCAS STREBLIDAE PARASITAS DE MORCEGOS CAVERNÍCOLAS DO NORDESTE BRASILEIRO

Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Campus de Jaboticabal.

Supervisor(a): Prof. Dr. Marcos Rogério André

Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe UNESP) - 5598

Jaboticabal

2025

RESUMO

Os morcegos (Ordem Chiroptera) constituem um dos grupos mais diversos de mamíferos que, além de desempenharem importantes serviços ecossistêmicos, destacam-se por atuarem como reservatórios de diversos patógenos. Entre os ectoparasitos que infestam morcegos, destacam-se moscas da família Streblidae (Diptera: Hippoboscoidea), cujo microbioma bacteriano, assim como o dos morcegos, ainda é relativamente pouco explorado. Objetivando ampliar a compreensão sobre a biodiversidade microbiana procariótica associada a moscas Streblidae, este projeto buscou caracterizar o microbioma de *Trichobius parasiticus* (n=35) e *T. johnsonae* (n=33) coletados de morcegos cavernícolas na região nordeste do Brasil. Para isso, após a identificação morfológica, moscas coletadas de morcegos de quatro cavernas na Caatinga e duas na Mata Atlântica foram submetidas à extração de DNA com kit comercial a fim de construir bibliotecas das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA, as quais foram sequenciadas na plataforma Illumina NovaSeq 6000. As sequências brutas foram processadas por meio do pipeline DADA2 para filtragem, correção de erros, deduplicação, remoção de quimeras, e agrupamento das sequências em ASVs (*Amplicon Sequence Variants*). Sequências potencialmente contaminantes foram removidas com base em controles negativos ambientais e aplicando o pacote *decontam*. Em seguida, as ASVs foram agrupadas em OTUs com 97% de similaridade utilizando o pacote *DECIPHER*. A atribuição taxonômica foi realizada com base no banco de dados SILVA (versão 138-1). Foram conduzidas análises de abundância relativa dos táxons bacterianos, bem como da relação entre a composição microbiana e variáveis biológicas de interesse, incluindo espécie hospedeira (*T. parasiticus* vs. *T. johnsonae*), sexo (macho e fêmea) e, quando aplicável, o local de coleta. As análises de diversidade alfa e beta revelaram que fatores biológicos, como sexo e espécie, influenciam significativamente a riqueza e a composição do microbioma bacteriano associado às moscas Streblidae. Em duas cavernas com representação completa das variáveis, o local de coleta também se mostrou um fator relevante na estrutura da comunidade microbiana. Os achados do presente estudo ampliam o conhecimento sobre a ecologia microbiana de ectoparasitos e suas interações com os hospedeiros.

Palavras chaves: Ectoparasitos; Chiroptera; *Trichobius johnsonae; Trichobius parasiticus*; diversidade microbiana.

ABSTRACT

Bats (Order Chiroptera) represent one of the most diverse groups of mammals which, in addition to performing important ecosystem services, stand out for acting as reservoirs of several pathogens. Among the ectoparasites that infest bats, flies of the family Streblidae (Diptera: Hippoboscoidea) are noteworthy, whose bacterial microbiome—like that of their hosts—remains relatively unexplored. Aiming to expand the understanding of the prokaryotic microbial biodiversity associated with Streblidae flies, this study sought to characterize the microbiome of *Trichobius parasiticus* (n = 35) and *T. johnsonae* (n = 33) collected from cave-dwelling bats in the northeastern region of Brazil. After morphological identification, flies collected from bats in four caves in the Caatinga and two in the Atlantic Forest were subjected to DNA extraction using a commercial kit to construct libraries of the V3–V4 regions of the 16S rRNA gene, which were sequenced on the Illumina NovaSeq 6000 platform. Raw sequences were processed through the DADA2 pipeline for filtering, error correction, dereplication, chimera removal, and clustering into Amplicon Sequence Variants (ASVs). Potentially contaminant sequences were removed based on environmental negative controls and by applying the decontam package. Subsequently, ASVs were grouped into Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% similarity using the DECIPHER package. Taxonomic assignment was performed using the SILVA database (version 138.1). Analyses of the relative abundance of bacterial taxa were conducted, as well as assessments of the relationship between microbial composition and biological variables of interest, including host species (*T. parasiticus* vs. *T. johnsonae*), sex (male and female), and, when applicable, sampling site. Alpha and beta diversity analyses revealed that biological factors such as sex and species significantly influence the richness and composition of the bacterial microbiome associated with Streblidae flies. In two caves with complete representation of all variables, sampling site also proved to be a relevant factor in shaping the microbial community structure. The findings of this study broaden the understanding of the microbial ecology of ectoparasites and their interactions with their hosts.

Keywords: Ectoparasites; Chiroptera; *Trichobius johnsonae; Trichobius parasiticus*; microbial diversity.

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos (Mammalia: Chiroptera Blumenbach, 1779) constituem a segunda maior ordem dentre os mamíferos, composta por 21 famílias, 236 gêneros e 1474 espécies, distribuídas em praticamente todos os continentes (com exceção das regiões polares, climas desérticos extremos e algumas ilhas oceânicas) (Nowak & Walker's, 1994; Upham et al., 2024). No Brasil, essa diversidade está representada por 186 espécies, pertencentes a 68 gêneros e nove famílias, das quais 13 espécies são endêmicas do país (Garbino et al., 2024). Além de amplamente difundidos em ambientes silvestres, periurbanos e urbanos, estes mamíferos apresentam grande diversidade ecológica e funcional, atuando inclusive como vetores e reservatórios naturais de diversos patógenos (Federici et al. 2022). Dentre estes, destacam-se bactérias dos gêneros *Bartonella* spp. e *Leptospira* spp. (Stuckey et al. 2017; Bevans et al. 2020; André et al. 2019; André et al. 2023). Os morcegos também podem albergar diferentes protozoários (*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Babesia* spp. e *Theileria* spp.) e vírus com potencial letal para os seres humanos (Perkins e Schaer, 2016; Sato e Mafie, 2022; Vieira et al. 2022; Wallau et al. 2023; De Mello et al., 2023).

Dada a sua grande diversidade e os importantes serviços ecossistêmicos que prestam, os morcegos figuram como excelentes modelos para o entendimento da evolução das relações entre mamíferos e microrganismos (Ingala, Simmons e Susan, 2018). Quanto ao microbioma intestinal desses animais, Muegge et al. (2011) destacam que a dieta é um dos principais impulsionadores de sua estrutura e função, uma vez que podem ser insetívoros, carnívoros, onívoros, frugívoros, nectarívoros, piscívoros ou hematófagos (Avena et al. 2016; Alcantara et al. 2023). Basicamente, em sua cavidade oral, saliva, conteúdo estomacal, intestino, cavidade anal e fezes já foram descritas bactérias dos gêneros *Staphylococcus, Bacillus, Lactobacillus, Enterococcus, Paeniclostridium, Streptococcus, Actinobacillus, Xanthomonas, Serratia, Aeromonas, Burkholderia, Helicobacter, Bartonella, Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas, Weissella, Yersinia, Undibacterium, Alkalibacterium, Campylobacter, Nesterenkonia, Plesiomonas, Anaplasma, Ureaplasma* e *Fructobacillus*, com predominância do filo Proteobacteria

seguido de Firmicutes (conforme levantamento de Federici et al. 2022). Proteobacteria grupa ainda importantes gêneros de bactérias patogênicas zoonóticas e transmitidas por vetores artrópodes, como *Ehrlichia, Neorickettsia, Coxiella* e as já mencionadas *Anaplasma* spp. e *Bartonella* spp. (Dietrich et al. 2017; Cicuttin et al. 2013; Ferreira et al. 2018; Ikeda et al. 2020; Ikeda et al. 2021). Lutz e colaboradores (2019) apontam que o microbioma da pele dos morcegos é significativamente mais abundante e diverso em filos do que o intestinal, embora relativamente menos explorado. A membrana das asas, pelo e focinho são colonizados por bactérias dos gêneros *Streptomyces, Streptococcus, Staphylococcus, Pseudomonas, Acinetobacter, Lactococcus, Peptostreptococcus, Clostridium, Rhodococcus* e *Gallicola* (também conforme levantamento de Federici et al. 2022). Neste caso, a comunidade microbiana é estruturada conforme fatores abióticos, por exemplo temperatura, habitat e proximidade espacial entre hospedeiros (Avena et al. 2016; Lemieux-Labonté et al. 2016; Winter et al. 2017; Kolodny et al. 2019). Por fim, o microbioma do sangue, fígado e baço apresentam bactérias dos gêneros *Leptospira,* Mycoplasma*, Bartonella* e *Yersinia* (Mühldorfer et al. 2010; Stuckey et al. 2017; André et al. 2019; Bevans et al. 2020; Hahn et al. 2021).

Na superfície corporal dos morcegos também se estabelecem ectoparasitos, tais como moscas (Diptera: Hippoboscoidea: Streblidae e Nycteribiidae), carrapatos (Ixodida: Ixodidae, Argasidae) e ácaros (Mesostigmata: Macronyssidae e Spinturnicidae) (Lourenço et al., 2016; 2023; Szentiványi et al. 2019). Dentre as moscas, aquelas pertencentes à família Streblidae (Kolenati, 1863) são as mais frequentemente encontradas infestando morcegos nos Neotrópicos, especialmente aqueles das famílias Phyllostomidae e Noctilionidae (Dick e Gettinger, 2005; Petersen et al. 2007; Dick e Miller, 2010). Atualmente, já foram registradas cerca de 250 espécies de Streblidae, sendo que destas 101 ocorrem no Brasil (Dick e Patterson, 2006; Soares et al. 2013; Graciolli, 2024). Sua riqueza é determinada, principalmente, por fatores como: clima, vegetação, altitude, riqueza e abundância de hospedeiros (Prevedello et al., 2005; Dick e Gettinger, 2005; Camilotti et al. 2010). Moscas Streblidae são dípteros peculiares, pois apresentam reprodução por viviparidade adenotrófica, realizam hematofagia obrigatória, podendo ou não apresentar asas e especificidade por hospedeiros

(Lourenço, Almeida e Famadas, 2016). Na maioria das espécies, os adultos medem cerca de 0,75 a 1,5 mm por 2,5 a 5,0 de comprimento e apresentam corpo achatado lateral ou dorsoventralmente, abdômen membranoso e recoberto por cerdas, pernas curtas e fortes ou longas e finas (Dick e Dittmar, 2014; Dick, 2016; Reeves e Lloyd, 2019).

O microbioma associado aos ectoparasitos de morcegos são os menos explorados dentre os diversos estudos já descritos na literatura. Em um estudo recente, André et al. (2023) demonstraram, utilizando a abordagem metagenômica, a presença de 14 classes e 59 gêneros de bactérias (com predominância das classes Mollicutes, Alfaproteobacteria e Gammaproteobacteria) em moscas Streblidae coletadas de morcegos em áreas de Cerrado do estado do Mato Grosso do Sul. O estudo também revelou alta abundância dos gêneros bacterianos *Spiroplasma, Wolbachia* e *Bartonella,* respectivamente. Speer et al. (2022), por sua vez, detectaram alta abundância de Gammaproteobacteria (principalmente *Arsenophonus*), seguida de *Bartonella*, '*Candidatus* Phlomobacter', *Mycoplasma* e *Wolbachia* em moscas Streblidae coletadas de morcegos na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro. Ao analisar o efeito da fragmentação sobre a comunidade microbiana, Speer et al. (2022) também demonstraram que a perda de habitat está relacionada ao estreitamento das redes de associação bacterianas. Outro estudo realizado com Nycteribiidae na região de Madagascar (Wilkinson et al. 2016) revelou a predominância de Alfaproteobacteria (principalmente *Wolbachia, Bartonella* e *Rickettsia*), Betaproteobacteria (algumas próximas a bactérias da família Neisseriaceae) e Gammaproteobacteria (ordem Enterobacteriales, com os gêneros *Arsenophonus* e *Aschnera*). Os dados de Alfaproteobacteria são corroborados por Morse et al. (2012).

Sabe-se que os microrganismos internos contribuem para a modulação de diversos processos evolutivos, ecológicos, aspectos nutritivos, modulação da reprodução, da defesa contra patógenos, entre outros (Frago et al., 2017). Adicionalmente, a presença de determinados agentes microbianos limita a transmissão de patógenos por artrópodes hematófagos, em particular mosquitos e carrapatos (Abraham et al., 2014; Wang et al., 2018; Binetruy et al., 2019).

Uma breve pesquisa no banco de artigos da *National Library of Medicine* (NCBI) revela um aumento notável na produção sobre microbioma nos últimos cinco anos, superando a marca de dez vezes. É interessante notar que grande parte desses estudos se concentraram nas associações microbianas com o corpo, com ênfase no microbioma intestinal. Em paralelo, o microbioma de vetores, como carrapatos, flebotomíneos, dípteros e triatomíneos, também têm recebido atenção significativa da comunidade científica. Apesar desse avanço, observa-se uma lacuna significativa de informações sobre a diversidade microbiana em mamíferos silvestres e, particularmente, aos seus ectoparasitos. Considerando a relevância ecológica dos morcegos, torna-se pertinente investigar as dinâmicas microbianas presentes em seus ectoparasitos, especialmente moscas da família Streblidae.

Até o momento, apenas dois trabalhos foram identificados abordando o microbioma de moscas Streblidae no Brasil, o que evidencia a escassez de informações nessa área. Dessa forma, este trabalho contribui com dados inéditos sobre a composição microbiana associada a esses insetos e seus hospedeiros. A investigação de populações oriundas de ambientes cavernícolas, ainda pouco explorados no cenário nacional, também amplia a possibilidade de identificação de novos genótipos e grupos microbianos. Para execução da proposta, foram escolhidas duas espécies de moscas Streblidae que comumente são encontradas infestando *Pteronotus gymnonotus* (Natterer, 1843) e *Desmodus rotundus* (E.Geoffroy, 1810), sendo elas *Trichobius johnsonae* (Wenzel, 1966) e *Trichobius parasiticus* (Gervais, 1844), respectivamente. Diante desse panorama, foram estabelecidas as seguintes hipóteses: (i) Gammaproteobacteria será o táxon com maior abundância relativa no microbioma de *T. johnsonae* e *T. parasiticus*; (ii) A composição do microbioma dessas espécies variará de acordo com o bioma e com o grau de influência externa nas cavernas, mas não sofrerá variações significativas em função da estação (seca ou chuvosa), temperatura ou umidade médias; (iii) A diversidade de táxons procarióticos no microbioma de *T. johnsonae* será maior em cavernas com maior riqueza e abundância de hospedeiros, considerando seu potencial de infestar múltiplas espécies de morcegos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o microbioma procariótico de moscas Streblidae coletadas de morcegos cavernícolas e estabelecer suas relações com parâmetros bióticos e abióticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o microbioma de *T. johnsonae* e *T. parasiticus*;
- Quantificar as diversidades alfa e beta, bem como a abundância relativa de táxons procariotos nos microbiomas de *T. johnsonae* e *T. parasiticus*;
- Analisar a relação entre a composição dos microbiomas procarióticos de *T. johnsonae* e *T. parasiticus* com o bioma, estação, umidade e temperatura médias e grau de influências externas nas cavernas amostradas;
- Verificar a relação entre o microbioma procariótico de *T. johnsonae* com a riqueza e abundância de morcegos hospedeiros nas cavernas amostradas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos ectoparasitos e padronização de protocolo de extração de DNA

Os espécimes de *Trichobius johnsonae* e *Trichobius parasiticus* foram coletadas pelo Dr. Éder Barbier (Processo FAPESP 2023/01606-1), pós-doutorando sob supervisão do Prof. Dr. Marcos R. André, que investiga a diversidade genética de *Bartonella* spp. em moscas Streblidae coletadas de morcegos cavernícolas no nordeste do Brasil. As moscas foram coletadas diretamente de seus hospedeiros durante o período de captura dos morcegos e, imediatamente após a coleta, foram armazenadas em criotubos contendo nitrogênio líquido, sendo posteriormente mantidas a -80 °C até a extração de DNA.

A identificação morfológica das espécies foi realizada com base em chaves taxonômicas específicas para Streblidae (Wenzel, 1976), considerando características como morfologia corporal, inserção e número de cerdas, venação alar e caracteres genitais. Para assegurar a eficiência da

extração e a integridade do DNA obtido, um protocolo preliminar foi testado utilizando dois espécimes de *T. parasiticus* e dois de *T. johnsonae*. A extração foi conduzida com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante, com adaptações específicas para insetos.

3.2 Descontaminação da superfície externa, extração e quantificação de DNA de ectoparasitos

Uma das etapas cruciais na investigação do microbioma associado aos ectoparasitos (neste caso, de morcegos) é a descontaminação externa, a fim de preservar apenas o microbioma interno, eliminando possíveis contaminantes ambientais externos, DNA exógeno e contaminantes da pele do hospedeiro (Speer et al., 2022). Os métodos de descontaminação incluem principalmente soluções de etanol (Díaz-Sánchez et al., 2019; Landesman et al., 2019) e hipoclorito de sódio (Gofton et al., 2015; Lalzar et al., 2012). O processo de descontaminação da superfície externa dos espécimes de *T. parasiticus* (n=35) e *T. johnsonae* (n=33) foi realizado individualmente, utilizando as duas soluções supracitadas. Os espécimes foram submetidos a seis incubações sob agitação, com auxílio do equipamento Fisherbrand Bead Mill 4 (velocidade = 1). Cada espécime foi tratado com hipoclorito de sódio a 1%, seguido por álcool etílico a 70% e depois enxaguados com água ultrapura esterilizada (Invitrogen®, Carlsbad, California, EUA), repetindo duas vezes cada etapa por 2 minutos.

Vieses potenciais, como contaminação nas etapas de extração/amplificação ou do ambiente durante o processamento das amostras são bem conhecidos por diferentes autores. Desta maneira, seguimos pipelines a fim de detectar e remover erros durante as análises das sequências (Galan et al., 2016; Lejal et al., 2020). Tal contaminação pode distorcer os resultados relativos à diversidade e à composição microbiana, principalmente em amostras de baixa biomassa, como é o caso de ectoparasitos de morcegos.

Sendo assim, após a descontaminação externa, os ectoparasitos foram submetidos à extração de DNA utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue

(Qiagen®), conforme as instruções do fabricante, com adaptações específicas para ectoparasitos, incluindo incubação prolongada com proteinase K a 56 °C por 18–24 horas. Considerando o risco potencial de contaminação ao longo das diferentes etapas do processamento, foram incluídos dois controles negativos, analisados em paralelo às amostras de ectoparasitos. O primeiro, denominado controle de homogeneização ou controle aberto (CA), consistiu em um microtubo DNAse/RNAse-free contendo apenas o tampão de lise, mantido aberto durante a maceração dos espécimes de moscas Streblidae. O segundo, o controle de extração ou controle fechado (CF), também contendo o tampão de lise, permaneceu fechado durante toda a etapa de homogeneização. Ambos os controles foram submetidos a todo o protocolo de extração e amplificação da região V3–V4 do gene 16S rRNA sob as mesmas condições dos espécimes de moscas, conforme descrito por Lejal et al. (2020).

A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Além da quantificação dos ácidos nucleicos, essa análise permitiu avaliar a pureza das amostras com base nas razões de absorbância 260/280 e 260/230, indicando a possível contaminação por proteínas, fenóis, sais ou outros reagentes utilizados no processo de extração. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C até as análises posteriores.

Para a confirmação molecular da identificação morfológica, um subconjunto de quatro espécimes (dois de cada espécie) foi selecionado para amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial *cox1* (citocromo c oxidase subunidade I), conforme protocolo de Folmer et al. (1994). As sequências obtidas foram comparadas com dados disponíveis no GenBank por meio de busca BLASTn, confirmando a identificação específica dos ectoparasitos. Os detalhes dos procedimentos de PCR e da análise molecular estão descritos no subtópico seguinte.

3.3 Amplificação do gene endógeno *cox-1* (citocromo-C oxidase) de ectoparasitos e PCR convencional para a região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA de procariotos

A fim de evitar falsos resultados negativos devido à presença de inibidores, as amostras de DNA extraídas de ectoparasitos foram submetidas a ensaios de cPCR baseados no gene *cox-1* de invertebrados (Folmer et al., 1994) (**Tabela 1**). Amostra de DNA de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* do estado do Ceará previamente testada para o gene *cox-1* (Lee et al., 2024) foi utilizada como controle positivo. As amostras de DNA de ectoparasitos positivas para o gene endógeno e dos controles foram posteriormente submetidas a ensaio de PCR baseado na região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA de procariotos (Chen et al., 2015; Yu et al., 2005) (**Tabela 1**). As amostras foram testadas utilizando 1,5 µL de DNA alvo, 1,25 U de Go Taq Hot Start Polymerase (Promega®, Wisconsin, Estados Unidos), 2 mM de tampão, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen®, Carlsbad, California, EUA), 0,5 mM de $MgCl_2$ (Promega®, Wisconsin, EUA), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura (Invitrogen®, Carlsbad, California, EUA) q.s.p. 13µL. As sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados, protocolos térmicos e tamanho dos fragmentos amplificados estão descritos na **Tabela 1**. Amostra de DNA de *Bacillus* sp. foi utilizada como controle positivo. Água ultra-pura esterilizada e livre de DNAses e RNAses (Invitrogen®, Carlsbad, California, EUA) foi utilizada como controle negativo em todas as reações.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores e protocolos térmicos empregados na amplificação dos genes endógenos de invertebrados (*cox-1*) e da região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA de procariotos, utilizados para validar a extração de DNA dos ectoparasitos e identificar microrganismos associados aos ectoparasitos e presentes nos controles negativos (CA e CF).

Gene-alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Protocolo térmico	Referência
cox-1 **(invertebrados)**	LCO1490: 5’-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’ HC02198: 5’-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’	~710	94°C pro 10 min. 35 ciclos: 94°C por 1 min. 40°C por 1 min. 72°C por 1,5 min. Extensão final: 72°C por 7 min.	Folmer et al. (1994)
Região hipervariável V3-V4 do 16S rRNA (procariotos)	341F - 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3' 806R - 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'	~461	94°C por 3 min. 35 ciclos: 94°C por 30 s 55°C por 30 s 72°C por 30 s Extensão final: 72°C por 10 min.	Yu et al. (2005)

3.4 Sequenciamento e geração das bibliotecas de DNA

O DNA total extraído de cada ectoparasito foi enviado para a empresa de biotecnologia ByMyCell, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, para construção de bibliotecas e sequenciamento. A biblioteca foi preparada usando primers que se anelam à região V3-V4 do gene 16S rRNA (~470 pb): primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') (Yu et al., 2005). O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina NovaSeq 6000 configurado para gerar leituras *paired-end* (2 × 250 pb).

3.5 Pré-processamento e análise de dados

As sequências brutas foram processadas no ambiente R (v. 4.3.1) utilizando o pacote DADA2 (v. 1.30.0). Inicialmente, a qualidade das sequências foi avaliada com o FastQC (Leggett et al., 2013) e MultiQC (Ewels et al., 2016). As sequências dos primers utilizados na amplificação dos fragmentos foram verificadas via módulo search_oligodb do programa usearch v11.0.667 (Edgar, 2010). A estimativa do tamanho e da qualidade das leituras foi realizada por meio da ferramenta fastq_eestats2, considerando limiares de erros esperados (0,5, 1, 2, 3 e 4) em função do tamanho das leituras (200 pb a 300 pb), com incremento de 10 pares de bases (pb). Ainda, foram aplicadas as ferramentas Fastx_info, para extrair estatísticas detalhadas das sequências, e Fastp (Chen et al., 2018), para filtragem e pré-processamento das leituras, incluindo remoção (poda) das sequências de baixa qualidade e correção de erros.

Em seguida, as *reads* foram fundidas por meio da ferramenta *flash* (*Fast Length Adjustment of Short reads*) (Magoč & Salzberg, 2011). As sequências de amplicons devidamente podadas e filtradas foram deduplicadas (dereplication), e em seguida foi realizada a remoção de ruídos (denoising) que leva em consideração as taxas de erros identificadas nas etapas anteriores. Resumidamente, o pipeline do DADA2 foi utilizado para filtragem, correção de erros, deduplicação, remoção de quimeras, agrupamento das sequências em ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) e atribuição taxonômica. A atribuição das ASVs foi testada com base em múltiplos bancos de dados

(RefSeq-RDP – Reference Sequence Database - Ribosomal Database Project versão 16; RDPv18 – Ribosomal Database Project, versão 18; RDPv19 – Ribosomal Database Project, versão19; SILVA v138-1 – SILVA Ribosomal RNA Database, versão 138.1; SILVA v138-2 – SILVA Ribosomal RNA Database, versão 138.2; GTDB v202 – Genome Taxonomy Database, versão 202 e GreenGenes v2 – Greengenes 2 Database, versão 2). Para a análise final, foi adotado o banco SILVA versão 138-1 como referência principal (Quast et al., 2013).

Adicionalmente, contaminantes potenciais foram identificados usando o pacote *decontam* (v. 1.22.0) no R (Davis et al., 2018), utilizando as bibliotecas controles como referência para remover sequências contaminantes de todas as bibliotecas obtidas a partir dos ectoparasitos antes a realização das análises ecológicas. As ASVs foram posteriormente clusterizadas utilizando o pacote *DECIPHER* (Wright, 2016), agrupando sequências com pelo menos 97% de similaridade, com o objetivo de reduzir a redundância e refinar a representação taxonômica. A composição microbiana associada a espécimes de *T. johnsonae* e *T. parasiticus* coletados de morcegos cavernícolas da região Nordeste do Brasil foi conduzida via RStudio, com base na classificação SILVA. A visualização dos resultados foi realizada por meio de gráficos de barras, representando a abundância das classes e gêneros por amostra.

3.5.1 Análises de diversidade

Apenas os indivíduos com sucesso no sequenciamento foram considerados nas análises de diversidade e composição microbiana. A **Tabela 2** apresenta a distribuição dessas amostras por caverna, espécie e sexo dos hospedeiros.

Tabela 2. Número de amostras de *Trichobius johnsonae* (TJ) e *Trichobius parasiticus* (TP) por caverna, espécie e sexo dos hospedeiros (macho – M; fêmea – F), utilizadas nas análises de abundância relativa dos táxons, diversidade alfa e diversidade beta. As cavernas amostradas foram: Furna do Gato (FG – PE), Caverna do Urubu (CU – SE), Furna do Morcego (FM – PE), Casa de Pedra (CP – SE), Furna do Urubu (FU – RN) e Gruta do Sobradinho (GS – CE).

CAVERNA	TJ (F)	TP (F)	TJ (M)	TP (M)
CP	0	5	0	4
CU	2	0	4	0
FG	0	6	0	5
FM	6	0	4	0
FU	5	5	5	5
GS	4	2	3	3

Para avaliar a relação entre a composição microbiana associada às espécies *T. johnsonae* e *T. parasiticus*, foram conduzidas análises de diversidade microbiana no ambiente R, utilizando os pacotes **phyloseq** (McMurdie & Holmes, 2013), **microbiome** (Lahti & Shetty, 2017) e **ARTool** (Kay et al., 2025). Na análise de diversidade alfa, foram considerados os índices: espécies observadas (*Observed*), Shannon e diversidade filogenética. Diferenças significativas nas métricas de diversidade alfa foram avaliadas em função da caverna, da espécie, do sexo e das interações entre esses fatores, por meio da ANOVA com Transformação de Ranks Alinhados (ART), conforme metodologia descrita por Wobbrock et al. (2011), com correção para múltiplas comparações pelo método FDR. Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Embora o delineamento inicial previsse a análise da influência de variáveis ambientais (bioma, estação, temperatura, umidade e grau de exposição), a distribuição desigual das amostras entre as cavernas impediu a

obtenção de dados comparáveis entre todos os grupos experimentais. Por esse motivo, essas variáveis não foram incluídas nas análises estatísticas.

Para a análise de diversidade beta, os dados foram normalizados pelo método *Total Sum Scaling* (TSS). As distâncias entre as amostras foram calculadas com base na dissimilaridade de Bray–Curtis, e as diferenças na composição microbiana entre os grupos foram testadas por meio da Análise de Variância Permutacional (PERMANOVA), com 9.999 permutações, utilizando a função adonis2 do pacote **vegan** (versão 2.6-2) (Oksanen et al., 2022).

4. RESULTADOS

4.1 Ectoparasitos coletados, hospedeiros e localização

Foram coletados 36 espécimes de *T. johnsonae* em morcegos da espécie *Pteronotus gymnonotus* e 41 espécimes de *T. parasiticus* em morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus*, totalizando 77 ectoparasitos. As coletas foram realizadas em seis cavernas nos estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Sergipe (**Figura 1**). Após a coleta, os ectoparasitos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a extração de DNA. As identificações, hospedeiros, espécies e localidades estão detalhados na **Tabela 3**.

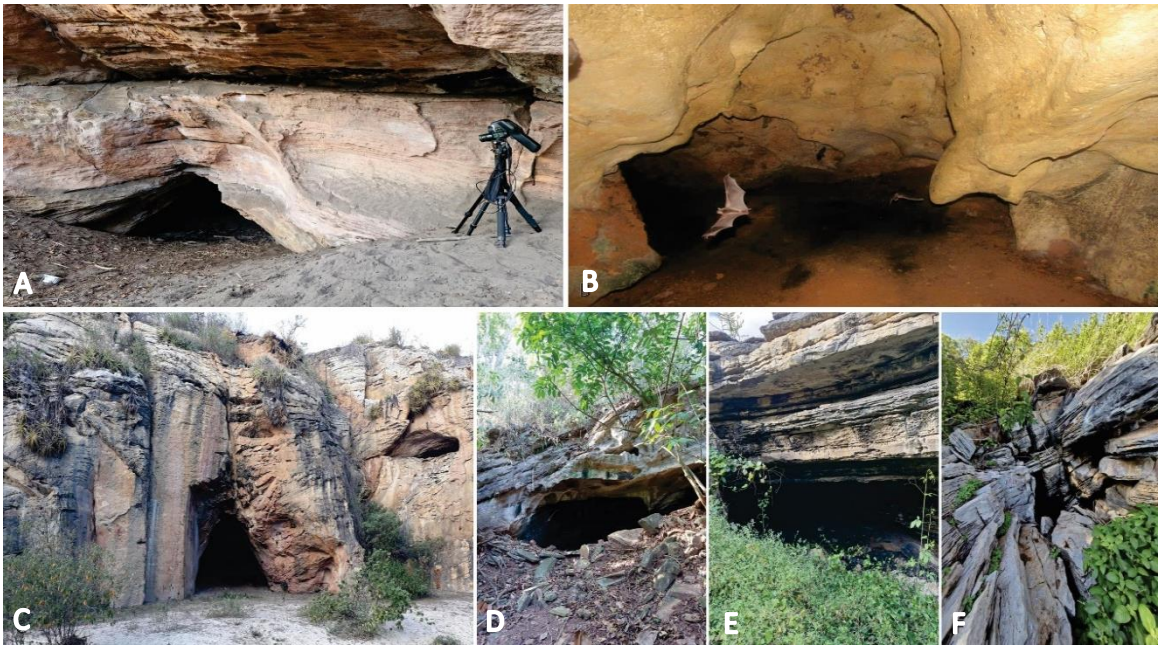


Figura 1. Fotografias das cavernas onde os ectoparasitos foram amostrados, localizadas em diferentes estados do Nordeste brasileiro. (A) Caverna Furna do Gato (FU) – PE; (B) Caverna Urubu (CU) – SE; (C) Caverna Furna do Morcego (FM) – PE; (D) Caverna Casa de Pedra (CP)– SE; (E) Caverna Furna do Urubu (FU) – RN; (F) Caverna Gruta do Sobradinho (GS)– CE.

4.2 Extração e quantificação de DNA de ectoparasitos

A quantificação do DNA de ectoparasitos e controles, bem como suas relações de absorbância foram determinadas por espectrofotometria no equipamento Nanodrop 2000. As amostras de DNA extraídas de ectoparasitos (n=77) apresentaram concentração média de 11,3 ng/μL (variando de 1,9 a 39,1 ng/μL, com desvio padrão [SD] ± 8,49). As relações de absorbância (260/280 nm e 260/230) das amostras de DNA de ectoparasitos apresentaram média de 2,39 (variando de 0,57 a 10,51 com SD ± 0,71), de 1,20 (variando de 0,28 a 6,91 com SD ± 0,98), respectivamente. Para os controles negativos (n=10), a concentração média foi de 3,9 ng/μL (variando de 1,6 a 15,32 ng/μL, com desvio padrão [SD] ± 4,1). Por sua vez, as relações de absorbância (260/280 nm e 260/230) dos controles apresentaram média de 2,78 (variando de 1,87 a 19,05 com SD ± 5,27), de 0,84 (variando de 0,13 a 1,84 com SD ± 0,55), respectivamente. Os valores de concentração de DNA e suas respectivas relações de absorbância estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Concentração de DNA, relações de absorbância e informações das amostras de ectoparasitos, incluindo hospedeiro, espécie e localidade.

ID / READ SAMPLE ID	*ESPÉCIE*	*HOSPEDEIRO*	*CAVERNA*	*ESTADO*	*CONCENTRAÇÃO E RELAÇOES DE ABSORBANCIA*		
					ng/µL	260/280	260/230
VV2 / TJGS1	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	14,9	2,54	1
VV3 / TPGS3	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	13,6	2,16	1,13
VV4 / TPGS1	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	15	2,42	0,53
VV5 / TPGS4	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	12,4	2,35	1,06
VV6 / TPGS5	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	11	2,32	0,79
VV7 / TPGS2	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	11,9	2,17	0,86
VV8 / TJGS2	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	9,2	2,33	1,1
VV9 / TJGS3	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	24,6	2,29	0,79
VV10 / TJGS5	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	10	2,38	0,43
VV11 / TJGS6	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	11,3	2,24	0,9
VV12 / TJGS7	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	48,8	1,31	0,82
VV13 / TJGS4	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Gruta do Sobradinho	Ceará	30,1	0,57	1,43
VV14 / TJFU6	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	7,8	2,92	0,48
VV15 / TJFU1	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	22,9	2,51	1,31
VV16 / TJFU7	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	8,5	2,39	1,04
VV17 / TJFU8	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	5,4	2,54	0,63
VV19 / TJFU2	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	27,5	2,46	0,9
VV20 / TJFU3	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	20,6	2,41	1,43
VV21 / TJFU4	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	34	2,31	1,83
VV22 / TJFU5	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	29,4	2,37	1,72
VV23 / TJCU3	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Urubu	Sergipe	14	2,49	0,42
VV24 / TJCU4	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Urubu	Sergipe	12	2,05	1,25
VV25 / TJCU5	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Urubu	Sergipe	10,2	2,11	2,83

VV26 / TJCU6	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Urubu	Sergipe	9,7	0,84	0,64
VV27 / TJCU1	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Urubu	Sergipe	8	2,19	1,01
VV28 / TPFG7	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	13,8	2,05	0,75
VV29 / TPFG8	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	7	2,36	0,74
VV30 / TPFG9	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	9,9	2	0,65
VV31 / TPFG1	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	9	2,79	0,37
VV32 / TPFG2	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	12,1	2,29	0,96
VV33 / TJFM1	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	17	2,39	1,23
VV34 / TJFM2	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	6,9	2,85	0,34
VV35 / TJFM3	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	1,9	6,98	0,28
VV36 / TJFM4	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	33,3	2,14	1,45
VV37 / TJFM7	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	7,2	2,65	0,97
VV38 / TJFM5	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	15,2	2,59	1,48
VV40 / TJFM8	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	7,9	2,44	0,72
VV41 / TJFM9	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	3,7	3,62	0,43
VV42 / TJFM10	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	39,1	1,2	1,97
VV43 / TJFU9	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	6,2	2,66	1,14
VV44 / TJFU10	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	6,3	3,83	0,33
VV45 / TJCU2	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Urubu	Sergipe	13,2	2,64	1,28
VV46 / TPFG10	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	11,3	2,45	1,26
VV49 / TPFG11	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	11,7	2,4	1,85
VV51 / TPFG3	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	21,6	2,17	1,87
VV52 / TPFG4	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	13,2	2,5	2,66
VV53 / TPFG5	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	16,8	2,78	1,76
VV56 / TPFG6	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Gato	Pernambuco	9,7	2,27	1,22
VV57 / TPFU6	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	16,6	2,34	2,09
VV58 / TPFU7	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	13,9	2,85	1,66
VV59 / TPFU1	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	9,6	2,79	1,67

VV60 / TPFU2	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	17,2	2,37	2,25
VV61 / TPFU8	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	13,4	2,76	2,01
VV62 / TPFU9	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	11,8	2,75	2,99
VV63 / TPFU10	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	10,2	2,48	4,13
VV64 / TPFU3	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	8,8	3,16	1,55
VV65 / TPFU4	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	11,1	2,45	2,38
VV66 / TPFU5	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Furna do Urubu	Rio Grande do Norte	10,4	2,67	1,19
VV68 / TJFM6	*Trichobius johnsonae*	*Pteronotus gymnonotus*	Caverna Furna do Morcego	Pernambuco	27,7	2,33	2,99
VV69 / TPCP6	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Casa de Pedra	Sergipe	8,5	2,63	6,91
VV70 / TPCP7	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Casa de Pedra	Sergipe	10,6	1,87	1,53
VV72 / TPCP8	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Casa de Pedra	Sergipe	13	2,05	1,69
VV73 / TPCP1	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Casa de Pedra	Sergipe	19,3	2,17	3,33
VV74 / TPCP2	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Casa de Pedra	Sergipe	16,5	2,13	1,26
VV75 / TPCP3	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Casa de Pedra	Sergipe	25,9	2,01	0,69
VV76 / TPCP9	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Casa de Pedra	Sergipe	6,8	2,37	0,52
VV77 / TPCP4	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Casa de Pedra	Sergipe	5,6	2,29	0,97
VV78 / TPCP5	*Trichobius parasiticus*	*Desmodus rotundus*	Caverna Casa de Pedra	Sergipe	14,9	2,44	1,33

4.3 cPCR para o gene endógeno *cox-1* (citocromo-C oxidase) de invertebrados) e para a região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA de procariotos

Das 77 amostras de moscas Streblidae analisadas, todas (100%; 77/77) apresentaram resultado positivo na PCR baseada no gene endógeno *cox-1* de invertebrados (**Figura 2**). Dessas, 90,9% (70/77) também foram positivas na PCR direcionada à região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA (**Figura 3**), indicando a presença de DNA bacteriano. Além disso, os cinco controles abertos negativos (CA) e os cinco controles fechados (CF) testados apresentaram amplificação para a região V3-V4, conforme esperado, devido à presença de contaminantes ambientais. A inclusão de controles negativos é essencial para a normalização e filtragem dos dados, garantindo maior confiabilidade na análise.

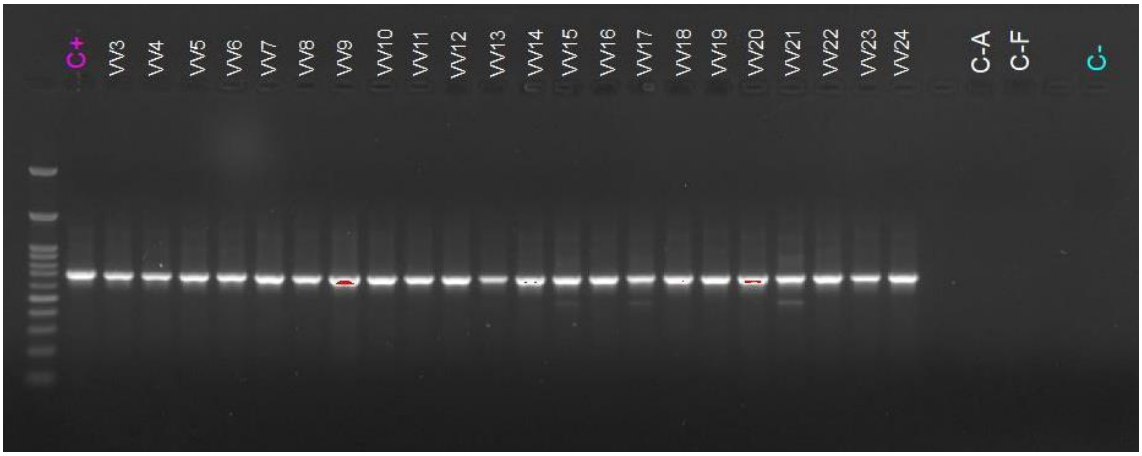


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à amplificação de um fragmento de aproximadamente 710 pb do gene *cox-1* de invertebrados. Amostras de DNA de espécimes de *T. parasiticus e T. johnsonae* (VV3 – VV24 e controles CA e CF. Canaletas C+: Controle positivo obtido de amostra de DNA de *Lutzomyia longipalpis* do estado do Ceará previamente testada para o gene *cox-1* (Lee et al., 2024); C-: Controle negativo representado por água ultra-pura.

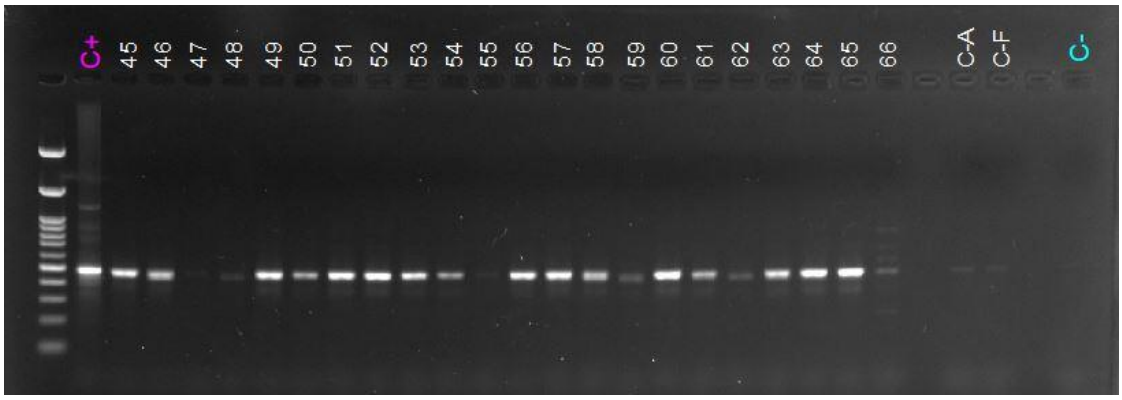


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% referente à amplificação de um fragmento de aproximadamente 461 pb da região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA de procariotos. Amostras de DNA de *T. parasiticus e T. johnsonae* (45 – 66) e controles CA e CF. Canaletas C+: Controle positivo obtido a partir de amostra de DNA isolada de *Bacillus* sp., fornecido pelo Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas da Unesp de Jaboticabal. C-: Controle negativo representado por água ultra-pura

4.4 Sequenciamento de Nova Geração e processamento dos dados

Das 70 amostras de DNA de moscas Streblidae positivas na PCR direcionada à região hipervariável V3-V4 do gene 16S rRNA, 97,14% (68/70) dos ectoparasitos e 50% (5/10) das amostras controle CA e CF foram sequenciadas com sucesso e permitiram a geração de bibliotecas de DNA. O sequenciamento de cinco controles falhou devido à falta de material suficiente e não gerou sequências. Os dados brutos foram processados conforme descrito no item 1.4.

As 73 bibliotecas processadas variaram em profundidade de sequenciamento de 16.979 a 123.096 leituras, identificadas em amarelo e azul, respectivamente (**Tabela 4**). Um total de 10.240 ASVs foram estimadas e os principais táxons detectados usando diferentes bancos de dados estão apresentados na **Tabela 5**. Os bancos de dados RefSeq-RDP e RDP (versão 19, mais recente) apresentaram anotação de *Ehrlichia* no lugar de *Wolbachia*, um endossimbionte amplamente associado a diferentes espécies de artrópodes e de grande importância por ser um componente integral no controle de agentes transmitidos por vetores, devido à sua capacidade de se espalhar entre populações de insetos e influenciar a competência vetorial ao oferecer proteção contra patógenos (Landmann, 2019). Na versão mais recente do

banco GTDB, não foram identificadas sequências de *Mycoplasma*, representando outra limitação relevante considerada na escolha do banco de dados. Devido à ausência de anotação para o gênero *Arsenophonus,* o qual representa endossimbionte previamente identificado em moscas Streblidae (Speer et al., 2022), o Greengenes2 também não foi apropriado para tal avaliação. Nesse sentido, selecionamos o banco SILVA versão 138-1 para conduzir as análises, por apresentar anotações taxonômicas mais consistentes com o perfil microbiano conhecido de moscas Streblidae.

Tabela 4. Identificação das amostras (n=68), controles CA e CF (n=5), número de *reads* brutas geradas, trimadas e validadas após processamento. As siglas estão nomeadas de acordo com a espécie do ectoparasito (TP – *Trichobius parasiticus*; TJ – *Trichobius johnsonae*), caverna amostrada (CU – Caverna Urubu (SE); FU – Caverna Furna do Urubu (RN); FM – Caverna Furna do Morcego (PE); GS – Caverna Gruta do Sobradinho (CE); CP – Caverna Casa de Pedra (SE); FG – Caverna Furna do Gato (PE)) e espécime amostrado, Ex: TJCU3 = *Trichobius johnsonae,* Caverna do Urubu, espécime 3.

ID	RAW	CLEANED	MERGED	VALID
CA1	68407	65738	53319	53316
CA2	107900	104439	76420	76407
CA3	19804	19323	17017	16979
CF1	62480	60125	49088	49080
CF2	68376	66825	58510	58462
TJCU1	47210	45983	39329	39329
TJCU2	103430	99576	68058	68055
TJCU3	78121	76077	67047	67036
TJCU4	114061	110039	92077	92074
TJCU5	104955	100953	81817	81810
TJCU6	106326	103174	80073	80060
TJFM1	105557	101148	66421	66421
TJFM10	105092	100898	78569	78569
TJFM2	102756	98615	78710	78708
TJFM3	45103	44057	37779	37741
TJFM4	105805	101751	69546	69546
TJFM5	102735	99013	71242	71242
TJFM6	102489	99993	83048	83048
TJFM7	102330	94397	71935	71934

TJFM8	105596	101722	87218	87216
TJFM9	103502	99756	84064	84063
TJFU1	106994	104133	80998	80996
TJFU10	105556	101954	84934	84930
TJFU2	104796	102142	78492	78490
TJFU3	102335	98169	62101	62101
TJFU4	115985	111891	80005	80002
TJFU5	92274	89082	68610	68610
TJFU6	59620	57706	46903	46851
TJFU7	101238	96861	76292	76291
TJFU8	35735	34718	31033	31029
TJFU9	165520	159233	117043	117031
TJGS1	108661	104571	77466	77465
TJGS2	78639	75548	52841	52838
TJGS3	155515	151269	117580	117577
TJGS4	69713	67459	50884	50855
TJGS5	68949	66141	54240	54227
TJGS6	95587	91763	74652	74594
TJGS7	161746	156603	123110	**123096**
TPCP1	102712	99919	46469	46467
TPCP2	104497	101766	70203	70201
TPCP3	102386	99759	44040	44033
TPCP4	103774	100841	88865	88863
TPCP5	103166	100739	46598	46591
TPCP6	102739	100031	81065	81063
TPCP7	68327	66536	30564	30557
TPCP8	106046	103284	91486	91486
TPCP9	145856	140598	56810	56803
TPFG1	104825	101079	55631	55626
TPFG10	108767	104441	58940	58939
TPFG11	105162	100762	41282	41280
TPFG2	107331	103338	32921	32913
TPFG3	114111	109469	42633	42628
TPFG4	114679	110037	36671	36665
TPFG5	104906	100946	27681	27678
TPFG6	111748	109112	55996	55990
TPFG7	80333	77425	63112	63034
TPFG8	102603	98804	83538	83535
TPFG9	106011	102058	32429	32428
TPFU1	156599	151764	106754	106750
TPFU10	98737	96400	54938	54931
TPFU2	83951	82118	40515	40511
TPFU3	103120	100400	43062	43060
TPFU4	72369	70428	35590	35587
TPFU5	109986	107146	90491	90488
TPFU6	105926	102983	56174	56168

TPFU7	52859	51637	33487	33486
TPFU8	85864	83683	44862	44857
TPFU9	118391	115540	103215	103212
TPGS1	103425	99498	49607	49604
TPGS2	81128	77855	32488	32486
TPGS3	61349	58862	25947	25944
TPGS4	105358	101892	33354	33348
TPGS5	74116	71964	61544	61445

Tabela 5. Táxons identificados pelos diferentes bancos de dados nos espécimes de *Trichobius parasiticus e Trichobius johnsonae* amostrados, com destaque para os gêneros *Bartonella* spp., *Wolbachia* spp. e *Mycoplasma* spp.

	RefSeqRDP	***RDPv18***	***RDPv19***	***SILVAv138-1***	***SILVAv138-2***	***GTDBv202***	***GG2***
Anaplasma	0	0	0	0	0	0	0
Bartonella	656	578	660	574	573	652	650
Borrelia	12	12	12	12	12	12	12
Coxiella	1	0	0	5	5	0	0
Ehrlichia	73	1	72	1	1	1	1
Rickettsia	13	10	13	10	10	12	12
Wolbachia	0	0	0	251	253	300	300
Spiroplasma	0	0	0	0	0	0	0
Cardinium	0	0	0	0	0	0	0
Mycoplasma	157	0	0	144	0	0	81
Orientia	0	0	0	0	0	0	0
Buchnera	2	0	0	0	0	0	52
Arsenophonus	0	39	0	57	57	54	0
Francisella	0	0	0	0	0	0	0

A descontaminação foi realizada com o pacote Decontam, utilizando o método de prevalência e um limiar de 50%, no qual ASVs com maior frequência em controles negativos foram classificadas como contaminantes. Ao final do processo, 85 ASVs foram identificadas como contaminantes e removidas das amostras experimentais. Além disso, todas as ASVs presentes nos controles negativos foram excluídas, totalizando 2.536 ASVs removidas. Dessa forma, das 10.240 ASVs inicialmente detectadas, 7.704 foram validadas e mantidas para as análises subsequentes. Os principais gêneros bacterianos identificados como contaminantes estão apresentados na **Figura 4.**

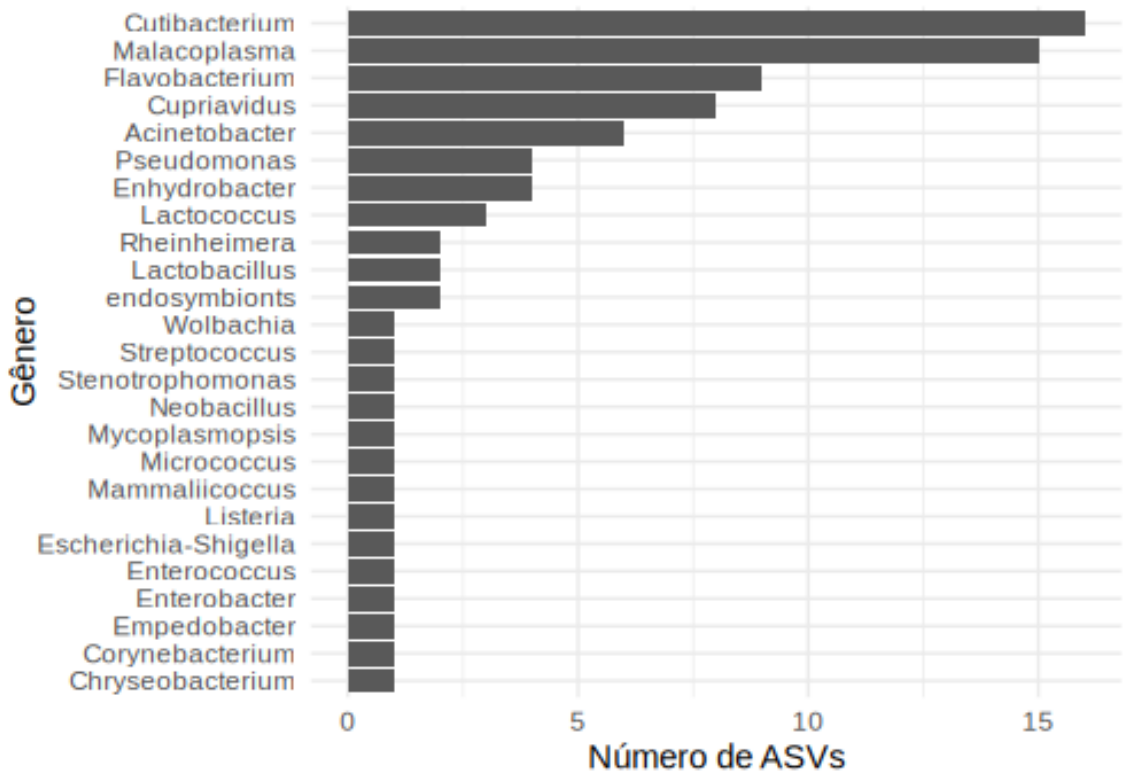


Figura 4. Gêneros de bactérias contaminantes identificados pelo processo de descontaminação via Decontam. Destacam-se os gêneros *Cutibacterium* spp., *Malacoplasma* spp., *Flavobacterium* spp., *Cupriavidus* spp. e *Acinetobacter* spp., com contagem superior a cinco ASVs.

4.5 Análises de Composição e Diversidade Microbiana

A caracterização da composição microbiana nas moscas *Trichobius johnsonae* (TJ) e *Trichobius parasiticus* (TP) revelou predominância das classes Gammaproteobacteria (destacada em rosa-claro na **Figura 5**) e Alphaproteobacteria (destacada em roxo na **Figura 5**) como principais componentes do microbioma dessas espécies. No entanto, TJ apresentou maior diversidade microbiana, com a presença de outras classes em menor proporção, como Bacilli, Verrucomicrobia e Gemmatimonadia, enquanto TP exibiu uma composição mais conservada, marcada pela dominância das duas classes principais. Esses resultados indicam diferenças na estrutura microbiana entre as duas espécies de ectoparasitos, possivelmente relacionadas a fatores ecológicos ou fisiológicos específicos de cada espécie. Para facilitar a visualização, gêneros com abundância relativa inferior a 0,01% e/ou presentes

em menos de 10% das amostras foram agrupados na categoria “Others” (**Figura 5**).

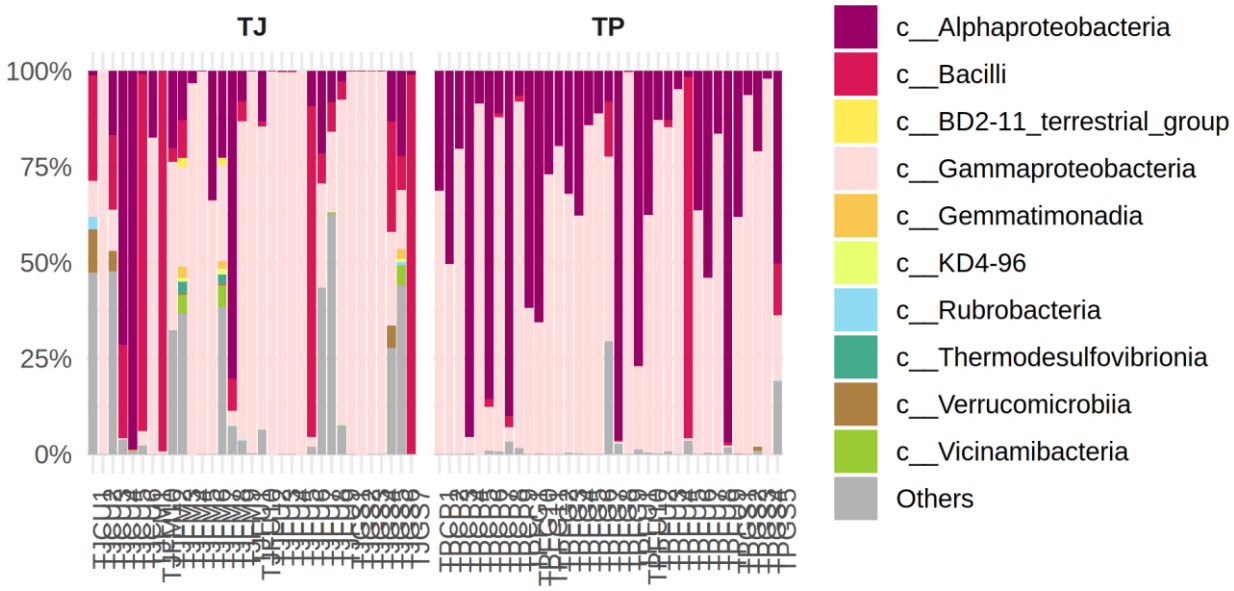


Figura 5. Abundância relativa das classes bacterianas associadas às amostras de *Trichobius johnsonae* coletadas de *Pteronotus gymnonotus* e *Trichobius parasiticus* coletadas de *Desmodus rotundus.*

A análise da abundância relativa dos gêneros bacterianos reforça esse padrão de diferenciação. As amostras de *T. parasiticus* apresentaram uma composição microbiana mais conservada, marcada pela predominância do gênero *Arsenophonus* (destacada em pink na **Figura 6**), seguido por *Bartonella* (destacada em amarelo na **Figura 6**), ambos detectados em grande parte das amostras. Em contraste, as amostras de *T. johnsonae* exibiram maior diversidade e variação entre os perfis bacterianos, com destaque para os endossimbiontes (destacados em laranja na **Figura 6**), além de *Bartonella* e *Metamycoplasma* (destacado em verde-claro na **Figura 6**), entre outros gêneros com menor abundância. Vale destacar que os microrganismos agrupados na categoria "endosymbionts" não foram classificados ao nível de gênero pelo banco de dados utilizado (**Figura 6**). Para melhor compreensão da identidade molecular desses microrganismos, as sequências correspondentes às OTUs associadas a esse grupo foram extraídas e submetidas a buscas por similaridade via BLASTn (**Tabela 6**). Foram selecionadas as cinco OTUs com maior contagem

relativa no conjunto de dados. A maioria das sequências apresentou alta similaridade com endossimbiontes previamente descritos em *Trichobius yunkeri* e *Trichobius* sp..

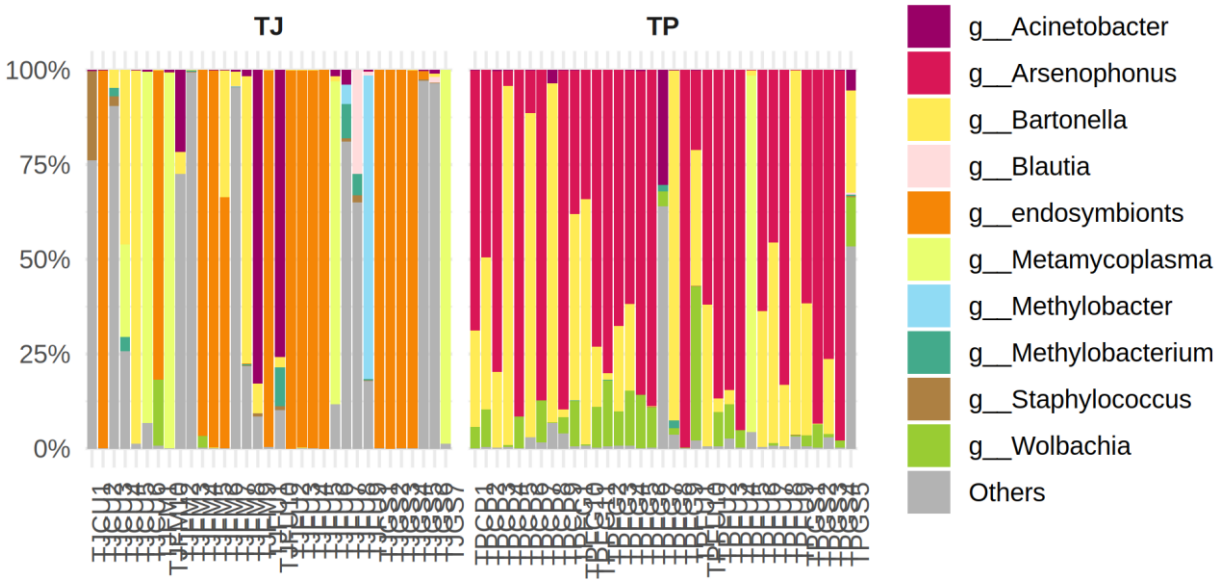


Figura 6. Abundância relativa dos gêneros bacterianos associados às amostras de *Trichobius johnsonae* coletadas de *Pteronotus gymnonotus* e *Trichobius parasiticus* coletadas de *Desmodus rotundus.*

Tabela 6. Resultados de BLASTn para OTUs associadas à categoria "endosymbionts" não classificadas ao nível de gênero

OTU	Número de contagens	Resultado BLASTn	Query coverage (%)	E-value	Identidade	Hospedeiro	Número de Acesso/ Localidade
OTU_104	124629	Bacterium endosymbiont	100%	0.0	99,32%	*Trichobius cf. yunkeri*	KC597723 / Guiana Francesa
OTU_110	20592	Bacterium endosymbiont	100%	0.0	97,51%	*Trichobius* sp.	KC597745 / México
OTU_1982	64	Bacterium endosymbiont	100%	0.0	96,15%	*Trichobius* sp.	KC597745 / México
OTU_942	28	Bacterium endosymbiont	100%	0.0	94,57%	*Trichobius* sp.	KC597745 / México
OTU_2100	12	Bacterium endosymbiont	100%	0.0	93,89%	*Trichobius* sp.	KC597745 / México

4.5.1 Diversidade alfa e seus determinantes nos ectoparasitos de morcegos cavernícolas

A análise de diversidade alfa foi conduzida com base nos índices Observed, Shannon e diversidade filogenética (Phylogenetic Diversity – PD), considerando os fatores espécie, caverna e sexo. As comparações estatísticas foram realizadas conforme a disponibilidade amostral em cada grupo (detalhados na **Tabela 2**). As cavernas FU e GS foram as únicas que apresentaram indivíduos de ambas as espécies (*T. johnsonae* e *T. parasiticus*) e de ambos os sexos, possibilitando uma análise conjunta dos três fatores. Nessa comparação multifatorial, foram detectadas diferenças significativas em todos os índices de diversidade alfa. O índice Observed apresentou efeitos significativos para o fator sexo ($p = 0,005$), bem como para as interações caverna × sexo ($p = 0,043$) e espécie × sexo ($p = 0,007$). Além disso, diferenças significativas também foram observadas para os índices Shannon e PD, reforçando que a diversidade microbiana varia entre machos e fêmeas de dípteros, e que essa variação pode ser modulada pela caverna de origem e pela espécie do hospedeiro (**Tabela 7**).

Para *T. johnsonae*, analisada separadamente nas cavernas CU, FM, FU e GS, os índices Observed ($p = 0,010$), Shannon ($p = 0,026$) e diversidade filogenética ($p = 0,004$) indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os sexos. Esses resultados mostram que a diversidade microbiana associada a essa espécie de díptero varia de forma consistente entre machos e fêmeas, independentemente da caverna de origem. Na análise de *T. parasiticus*, observaram-se diferenças significativas entre os sexos nos índices Observed ($p = 0,0059$) e diversidade filogenética ($p = 0,0012$). Adicionalmente, foi identificada uma interação significativa entre caverna e sexo para o índice de diversidade filogenética ($p = 0,0002$), indicando que o efeito do sexo pode variar conforme o ambiente de origem (**Tabela 7**).

A comparação entre espécies também revelou diferenças significativas nos índices de diversidade alfa. *Trichobius johnsonae* apresentou valores mais elevados de riqueza taxonômica (Observed), índice de Shannon e diversidade filogenética em relação a *T. parasiticus* ($p < 0,05$ para todas as métricas),

evidenciando um padrão de maior complexidade microbiana associada à primeira espécie.

A análise detalhada desses índices evidenciou padrões contrastantes entre os sexos dentro de cada espécie. Em *T. johnsonae*, fêmeas apresentaram maior riqueza de espécies, maior diversidade considerando abundância e uniformidade (índice de Shannon), e maior diversidade filogenética (PD) do que os machos. Em contrapartida, em *T. parasiticus*, os machos exibiram valores mais elevados para os três índices, sugerindo comunidades bacterianas mais diversas e filogeneticamente amplas nesse grupo. Esses achados demonstram que o efeito do sexo sobre a diversidade microbiana não é homogêneo entre espécies, podendo refletir diferenças biológicas ou ecológicas específicas.

Tabela 7. Resultados das análises de variância (ANOVA) aplicadas aos índices de diversidade alfa (Observed, Shannon e diversidade filogenética), considerando os fatores sexo, espécie e caverna nos diferentes agrupamentos amostrais. Estão apresentados os valores dos graus de liberdade (Df), soma de quadrados (Sum Sq), soma de quadrados residuais (Sum Sq.res), valores de F e níveis de significância (*p*-valor). Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão destacados.

GRUPOS	INDICES	FATOR	Df	Df.res	Sum Sq	Sum Sq.res	F value	Pr(>F)
Caverna FU e GS (todos os fatores)	Observed	SEXO	1	24	677,39662	1704,85	9,5360406	0,0050296
	Observed	CAVERNA:SEXO	1	24	388,61165	2044,05	4,5628432	0,0430757
	Observed	ESPECIE:SEXO	1	24	674,48622	1862,9667	8,6891888	0,0070237
	Shannon	SEXO	1	24	920,31328	1570,0667	14,067886	0,0009868
	Shannon	CAVERNA:SEXO	1	24	467,26328	2141,7833	5,2359726	0,0312295
	Shannon	ESPECIE:SEXO	1	24	775,08383	1746,0833	10,653565	0,0032882
	Phylogenetic diversity	SEXO	1	24	920,31328	1570,0667	14,067886	0,0009868
	Phylogenetic diversity	CAVERNA:SEXO	1	24	467,26328	2141,7833	5,2359726	0,0312295
	Phylogenetic diversity	ESPECIE:SEXO	1	24	775,08383	1746,0833	10,653565	0,0032882
Cavernas CU, FM, FU e GS - TJ	Observed	SEXO	1	25	592,23269	1916,7833	7,724304	0,0101932
	Shannon	SEXO	1	25	527,18346	2336,2667	5,6413023	0,0255259
	Phylogenetic diversity	SEXO	1	25	799,76021	1964,1667	10,179383	0,0038033
Cavernas CP, FG, FU e GS - TP	Observed	SEXO	1	27	777,23916	2346,8833	8,9418409	0,005884
	Phylogenetic diversity	SEXO	1	27	1081,3855	2211,0167	13,205422	0,0011557
	Phylogenetic diversity	CAVERNA:SEXO	3	27	1796,7334	1744,2167	9,2709815	0,000221

4.6 Diversidade beta

A análise de diversidade beta indicou diferenças estatisticamente significativas na composição microbiana entre as espécies hospedeiras (PERMANOVA, Bray-Curtis*, p* < 0,001). A separação entre os grupos também foi visualmente corroborada na análise de ordenação por PCoA (**Figura 7**), na qual os componentes do microbioma se agruparam de acordo com a espécie de díptero, revelando padrões distintos na estrutura da comunidade microbiana. De modo complementar, o agrupamento hierárquico dos dados de abundância relativa, representado pelo dendrograma com base na distância de Bray-Curtis, revela uma clara separação entre a composição do microbioma procariótico de espécimes de *T. johnsonae* (TJ) e *T. parasiticus* (TP). Observou-se que a maioria dos espécimes de cada espécie de díptero formou clusters distintos, refletindo diferenças consistentes na composição da comunidade microbiana associada. Espécimes de *T. johnsonae* agruparam-se predominantemente em um grande bloco à direita do dendrograma, enquanto aqueles de *T. parasiticus* aparecem agrupados principalmente à esquerda. Essa separação reforça a ideia de que a composição microbiana associada difere substancialmente entre as espécies hospedeiras (**Figura 8**). Esse padrão é coerente com os resultados das análises de PCoA e PERMANOVA, as quais apontaram diferenças significativas na composição microbiana entre as duas espécies ($p < 0.001$).

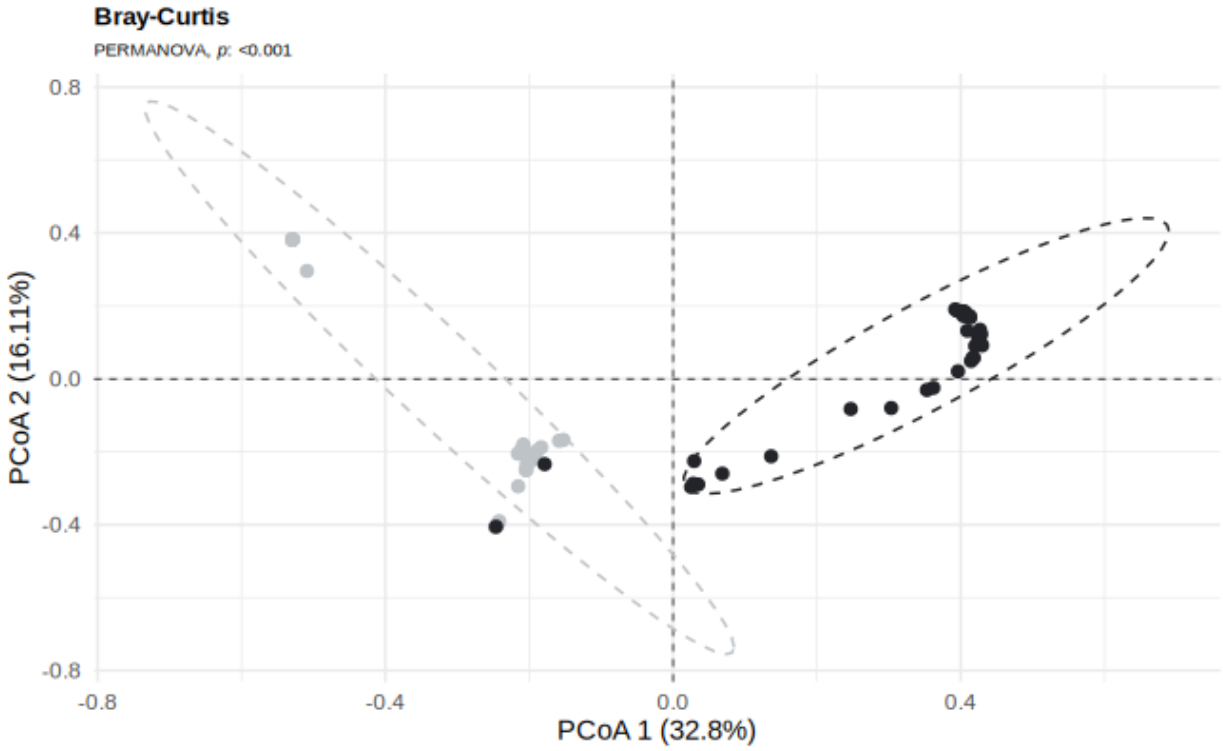


Figura 7. Análise de ordenação por coordenadas principais (PCoA) baseada na distância de Bray-Curtis, evidenciando a separação entre os microbiomas procarióticos associados a *Trichobius johnsonae* (cinza) e *T. parasiticus* (preto). As elipses representam a dispersão multivariada dentro de cada grupo.

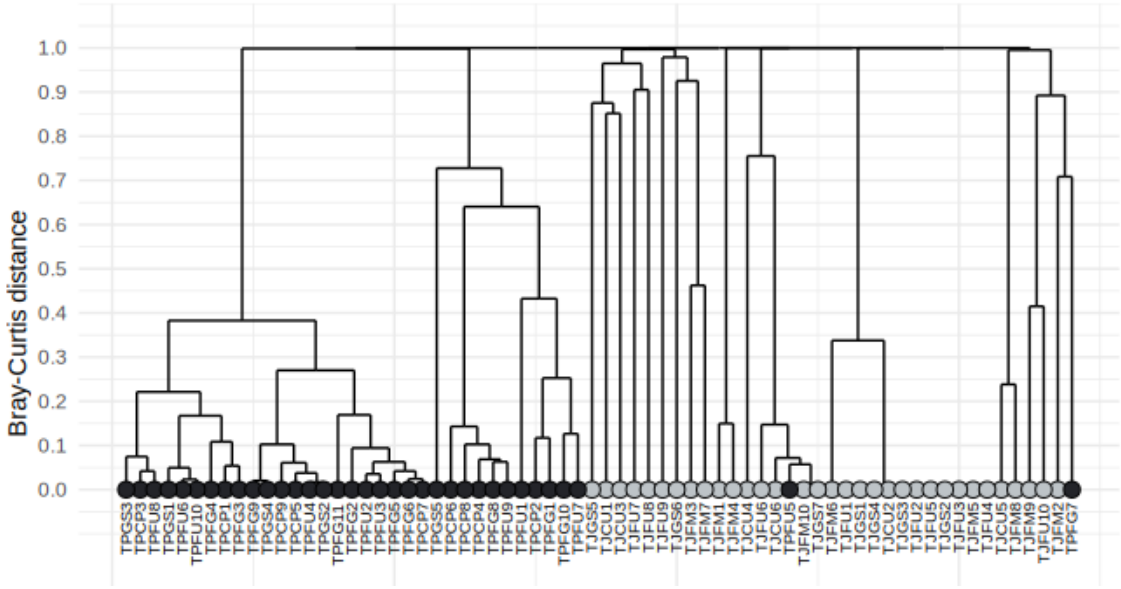


Figura 8. Dendrograma gerado a partir da análise de agrupamento hierárquico utilizando a distância de Bray-Curtis, baseado na composição de abundância relativa da comunidade microbiana associada aos espécimes de *Trichobius johnsonae* (TJ, em cinza) e *Trichobius parasiticus* (TP, em preto). Cada ponto terminal representa uma amostra individual, e as cores indicam a espécie do hospedeiro.

5. DISCUSSÃO

A análise da composição microbiana associada às moscas *T. johnsonae* e *T. parasiticus* revelou a predominância das classes Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria em ambas as espécies. Esse padrão está em consonância com estudos prévios envolvendo moscas da família Streblidae. Os resultados deste trabalho corroboram os achados de Morse et al. (2012), que investigaram endossimbiontes em moscas das famílias Streblidae e Nycteribiidae provenientes de diferentes regiões geográficas, incluindo Estados Unidos, Panamá, México, Porto Rico, Costa Rica, Peru e República Dominicana, e identificaram Gammaproteobacteria, especialmente o gênero *Arsenophonus*, como o grupo microbiano dominante. De maneira semelhante, Speer et al. (2022) relataram a dominância de Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria em moscas ectoparasitas coletadas de morcegos na Mata Atlântica do Rio de Janeiro, reforçando o papel central dessas classes na estrutura microbiana dos ectoparasitos. Além disso, André et al. (2023) também descreveram alta frequência dessas mesmas classes em espécimes de *Trichobius* spp., embora tenham identificado *Mollicutes* como a classe bacteriana mais abundante em *Trichobius* sp., seguida de *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*.

A composição taxonômica da microbiota procariótica de *T. johnsonae* e *T. parasiticus*, previamente discutidaao nível de classe, reflete padrões consistentes também ao nível de gênero, reforçando a ideia de que a composição microbiana é espécie-específica em ectoparasitos. No presente estudo, os principais táxons identificados em *T. parasiticus* foram os gêneros *Arsenophonus*, seguido por *Bartonella* e *Wolbachia*; por outro lado, *T. johnsonae* apresentou predominância de endossimbiontes não classificados, além de *Bartonella* e *Metamycoplasma*, estes últimos em menor abundância. Esse perfil corrobora com os achados recentes de Speer et al. (2025), que demonstraram que mesmo entre ectoparasitos que compartilham o mesmo ambiente e hospedeiros filogeneticamente próximos, as comunidades bacterianas tendem a ser específicas por espécie de díptero

A alta prevalência de *Arsenophonus* em *T. parasiticus*, em consonância com os achados de Morse et al. (2012), reforça sua importância como simbionte recorrente em Streblidae. Esse gênero, pertencente à classe Gammaproteobacteria, está frequentemente associado à transmissão vertical e

pode exercer funções simbióticas, tais como manipulação reprodutiva e suplementação nutricional. Sua predominância em *T. parasiticus* pode estar relacionada à ecologia alimentar de seu hospedeiro, o morcego hematófago *Desmodus rotundus*, cujas exigências fisiológicas diferem daquelas de espécies de morcegos insetívoras do gênero *Pteronotus*, parasitadas por *T. johnsonae*, que apresentou microbiota mais diversa. Evidências sugerem que a dieta do hospedeiro influencia indiretamente o microbioma dos ectoparasitos, seja por exposição diferencial a patógenos ou pela composição dos nutrientes ingeridos (Lutz et al., 2019).

Além disso, a presença significativa de *Bartonella* em ambas as espécies de mosca observadas neste trabalho também é relevante, dado o potencial patogênico deste gênero. André et al. (2023) relataram a presença de *Bartonella* com alta frequência em *Trichobius* sp., sugerindo que moscas Streblidae podem atuar como possíveis vetores dessas bactérias, que apresentam importância médica e veterinária. A detecção de *Wolbachia* em *T. parasiticus* também corrobora os dados de Morse et al. (2012) e André et al. (2023), que documentaram sua ocorrência em diversas espécies de artrópodes, muitas vezes associada à manipulação reprodutiva, como feminização ou indução de partenogênese.

Por sua vez, *T. johnsonae* apresentou maior proporção de táxons classificados genericamente como “endosymbionts”, além de *Bartonella* (classe Alphaproteobacteria), *Acinetobacter* (Gammaproteobacteria) e *Metamycoplasma* (Mollicutes), o que também corrobora com os achados de André et al. (2023), os quais identificaram Mollicutes como o principal grupo taxonômico em *Trichobius* sp. A comparação entre os dados obtidos no presente estudo e as evidências previamente descritas na literatura sugere a existência de uma associação microbiana recorrente e específica, tanto em nível de classe quanto de gênero. Isso indica que, mesmo em ambientes cavernícolas, nos quais fatores como temperatura, umidade e ausência de luz, poderiam teoricamente afetar a composição microbiana das moscas Streblidae, essas ainda mantêm comunidades bacterianas características.

Esse padrão reforça a ideia de que a identidade taxonômica do ectoparasito, bem como a de seu hospedeiro, exerce um papel determinante na estruturação da microbiota, superando variáveis ambientais isoladas. Essa

interpretação é apoiada pelos resultados obtidos por Speer et al. (2022), os quais demonstraram que a identidade do ectoparasito foi o principal fator explicativo da composição microbiana em moscas Streblidae e Nycteribiidae, mesmo em contextos de fragmentação severa de habitat. Embora aspectos ambientais, como o tamanho dos fragmentos ambientais, tenham influenciado certas métricas estruturais das redes microbianas (como modularidade e conectividade), a composição bacteriana manteve-se altamente específica por espécie de díptero, sugerindo um processo de filtragem ecológica rigoroso ou coespecialização simbiótica (Speer et al., 2022).

O presente estudo identificou padrões distintos na composição microbiana de *T. johnsonae* e *T. parasiticus*; contudo, algumas limitações metodológicas devem ser consideradas na interpretação desses achados. O número amostral reduzido por espécie, principalmente após o processamento e filtragem das amostras, compromete a robustez estatística e a capacidade de detectar diferenças sutis entre grupos (Weiss et al., 2017). Além disso, a ausência de ambas as espécies de moscas em todas as cavernas amostradas impediu análises diretas sobre o efeito do ambiente físico (como bioma, umidade e temperatura) na composição microbiana entre espécies, limitando a testagem de hipóteses relacionadas à influência ambiental. Outro fator relevante diz respeito às limitações taxonômicas, como a anotação genérica de táxons recorrentes como “endosymbionts”, reflexo da escassez de genomas de referência disponíveis para organismos não-modelo (Eisenhofer et al., 2019).

Tais limitações dificultam a interpretação funcional e filogenética dos microrganismos identificados, restringindo a avaliação de algumas hipóteses originalmente propostas, como a variação da composição microbiana em função do bioma, estação ou variáveis ambientais. Além disso, quando múltiplos fatores ecológicos e espaciais se sobrepõem, pode haver confundimento entre efeitos, o que compromete a identificação precisa das variáveis mais influentes, um problema comum de desenho experimental em estudos ecológicos. Como apontado por Knight et al. (2018), estudos de microbioma demandam amostragem balanceada entre grupos e ambientes para permitir inferências robustas, o que nem sempre é possível em condições de campo envolvendo animais selvagens.

Apesar das limitações metodológicas discutidas, os dados permitiram revelar padrões microbianos consistentes entre as espécies *T. johnsonae* e *T. parasiticus*. A análise de diversidade alfa evidenciou diferenças estatisticamente relevantes na riqueza taxonômica (Observed), no índice de Shannon e na diversidade filogenética entre as espécies, sugerindo maior complexidade microbiana em *T. johnsonae*, o que pode estar relacionado à sua capacidade de infestar múltiplas espécies de morcegos. Já em *T. parasiticus*, observou-se menor diversidade, indicando um microbioma mais conservado e possivelmente coevoluído com seu hospedeiro mamífero restrito.

A diversidade microbiana entre machos e fêmeas também apresentou padrões distintos entre as espécies analisadas. Em *T. johnsonae*, fêmeas exibiram maior diversidade (Observed, Shannon e Diversidade Filogenética - PD), indicando comunidades bacterianas mais complexas e evolutivamente amplas. Já em *T. parasiticus*, o padrão se inverteu, com os machos apresentando maiores índices de diversidade. Esses achados sugerem que o sexo do hospedeiro influencia a composição microbiana, mas esse efeito não é uniforme entre espécies, possivelmente refletindo diferenças fisiológicas, comportamentais ou ecológicas entre os sexos e entre as espécies de ectoparasitos. Além disso, foi identificada uma interação significativa entre caverna e sexo para o índice PD em *T. parasiticus*, o que sugere que fatores ambientais podem modular a diversidade microbiana de forma específica para cada grupo. Tais achados reforçam a complexidade das interações entre microbiota, biologia do parasito e ambiente.

As análises de diversidade beta (Bray–Curtis) indicaram diferenças significativas na composição microbiana entre *T. johnsonae* e *T. parasiticus*, evidenciando o papel central da espécie do ectoparasito e de seu hospedeiro na estruturação das comunidades bacterianas. Esses resultados estão alinhados com estudos prévios que apontam a espécie do ectoparasito como principal determinante da composição microbiana, mesmo em ambientes controlados ou sob fragmentação ambiental (Speer et al., 2022; Novianto et al., 2025), apontando que as características intrínsecas dos ectoparasitos são mais influentes na delimitação das comunidades microbianas do que variáveis ambientais contextuais.

Em conjunto, os resultados deste estudo reforçam que a composição microbiana de *T. johnsonae* e *T. parasiticus* está mais fortemente associada à espécie do ectoparasito e de seu hospedeiro do que a fatores ambientais isolados. A manutenção de perfis bacterianos distintos entre espécies de dípteros que compartilham o mesmo habitat sugere relações simbióticas estáveis, possivelmente moldadas ao longo da evolução. Esses achados ressaltam a importância de se considerar os aspectos ecológicos e filogenéticos dos sistemas parasito-hospedeiro na investigação de comunidades microbianas em ambientes naturais. Estudos futuros, com amostragem expandida e análises funcionais mais aprofundadas, poderão esclarecer as vias metabólicas envolvidas nessas interações e validar as hipóteses aqui propostas. Compreender essas associações é fundamental para ampliar o conhecimento sobre os fatores que estruturam comunidades microbianas em sistemas ecológicos complexos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo revelou diferenças significativas na composição microbiana associada às espécies *T. johnsonae* e *T. parasiticus*, evidenciando perfis bacterianos específicos por espécie de díptero. A predominância de *Gammaproteobacteria* em ambas as espécies confirma a hipótese de que esse grupo constitui o táxon com maior abundância relativa nesses microbiomas (Hipótese i). As análises de diversidade alfa e beta reforçaram o papel central da espécie do ectoparasito e de seu hospedeiro na modulação das comunidades bacterianas, mesmo em ambientes fisicamente similares, indicando que fatores biológicos exercem influência mais determinante do que variáveis ambientais isoladas.

A diversidade de táxons procarióticos foi maior em *T. johnsonae*, em consonância com sua associação a múltiplas espécies de morcegos e sua ocorrência em cavernas com maior riqueza de hospedeiros, o que sustenta parcialmente a Hipótese iii. Por outro lado, limitações amostrais impediram uma avaliação conclusiva da Hipótese ii, relacionada à influência de bioma, estação, temperatura e umidade sobre a composição microbiana. Ainda assim, a ausência de variações consistentes em função da estação, temperatura ou umidade

médias sugere que esses fatores tiveram influência limitada, enquanto o bioma e o grau de influência externa nas cavernas merecem investigação mais aprofundada.

Em conjunto, os achados deste estudo contribuem para a compreensão das interações entre comunidade bacteriana, parasito e hospedeiro, ressaltando a importância de se considerar características biológicas e ecológicas específicas dos ectoparasitos na investigação de suas composições microbianas. Estudos futuros, incorporando abordagens funcionais, metagenômicas e amostragens mais abrangentes entre diferentes ambientes, poderão elucidar os mecanismos subjacentes a essas associações simbióticas, com potenciais implicações ecológicas e zoonóticas.

6. ORIENTAÇÕES

Durante o período em questão, embora não tenha atuado formalmente como orientadora de alunos de Iniciação Científica ou de pós-graduação, participei ativamente de atividades de orientação informal e colaboração científica em diversos contextos. Contribuí com o desenvolvimento de projetos conduzidos por membros do meu grupo de pesquisa e de grupos colaboradores, oferecendo suporte metodológico, análise de dados e discussão de resultados.

No ambiente laboratorial, auxiliei estagiários e estudantes em atividades práticas e na compreensão dos fundamentos técnicos e teóricos dos procedimentos executados. Além disso, participei da redação e revisão de artigos científicos, incluindo trabalhos já publicados e outros atualmente em fase de produção ou em processo de submissão.

Essas experiências proporcionaram um ambiente contínuo de troca de conhecimento e formação científica, reforçando meu comprometimento com a consolidação de uma prática colaborativa e integrada à formação de novos pesquisadores.

7. DISCIPLINAS MINISTRADAS COM A RESPECTIVA CARGA HORÁRIA E/OU A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE EXTENSÃO

Durante o período avaliado, participei da publicação de dois artigos científicos em periódicos internacionais, vinculados a projetos colaborativos na área de Parasitologia e Saúde Única, envolvendo morcegos como modelo de estudo:

- Franco EO, de Oliveira LB, Calchi AC, **de Mello VVC**, Lee DAB, Arantes PVC, Graciolli G, Machado RZ, Coelho TFSB, André MR. Genetic diversity of *Bartonella* spp. in vampire bats and associated Streblidae bat flies in the Brazilian Amazon. **Parasitology International**, 106: 103019, 2025

- Silva AID, Franco EO, Calchi AC, Santos FCBD, Verde RS, **de Mello VVC**, Lee DAB, Secato CT, Dias CM, Machado RZ, Roque ALR, André MR. Molecular Survey of Hemopathogens in Bats from the Western Brazilian Amazon. **Pathogens**, 14: 527, 2025.

Além desses, colaborei em outros manuscritos em fase de desenvolvimento, sendo que um deles foi submetido recentemente ao periódico Tropical Animal Health and Production (**First molecular evidence of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in cattle from Mozambique"** by Caroline Tostes Secato; Carlos António Matos; Daniel Antônio Braga Lee; Jovêncio Mateus Sada; Anna Claudia Baumel Mongruel; Eliz Oliveira Franco; Victória Valente Califre de Mello; Rosangela Zacarias Machado; Marcos Rogério André). No que se refere especificamente ao meu projeto de pós-doutorado, os resultados obtidos estão sendo organizados para redação e submissão de um artigo científico. A estruturação do manuscrito envolve a análise integrada dos dados produzidos e será uma das principais entregas científicas do projeto.

No âmbito da divulgação científica, participei da elaboração e apresentação de trabalhos em eventos acadêmicos nacionais e internacionais. No XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV 2024), apresentei o trabalho "Diversidade de *Ehrlichia* spp.*, Anaplasma* spp. e

Neorickettsia spp. em morcegos hematófagos*”*, além de integrar, como coautora, em outros estudos relacionados à detecção molecular de agentes Anaplasmataceae e *Bartonella* spp. em morcegos e marsupiais da região amazônica, listados abaixo:

- **de Mello, VVC**; De Oliveira, LB; Coelho, TFSB; Lee, DAB; Neves, LF; Franco, EO; Mongruel, ACB; Machado, RZ; André, MR. Diversidade de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Neorickettsia* spp. em morcegos hematófagos. XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV 2024), Pirenópolis – 2024.

- Franco, EO; De Oliveira, LB; Calchi, AC.; **de Mello, VVC**; Lee, DAB; Arantes, PVC; Graciolli, G Machado, RZ; Coelho, TFSB; André, MR. Ocorrência e diversidade genética de *Bartonella* spp. em morcegos hematófagos e moscas de morcegos Streblidae associadas na Amazônia brasileira. XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV 2024), Pirenópolis – 2024.

- Franco, EO; Santos, FCB; Verde, RS; Calchi, AC; **de Mello, VVC**; Lee, DAB; Dias, CM; Carvalho, AAB; Roque, ALR; André, MR. Ocorrência e diversidade genética de Bartonella spp. em morcegos no estado do Acre, na Amazônia brasileira. XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV 2024), Pirenópolis – 2024.

- Silva, AI; Franco, EO; Calchi, AC; Santos, FCB; Verde, RS; **de Mello, VVC**; Lee, DAB; Dias, CM; Machado, RZ; André, MR. Investigação molecular de agentes Anaplasmataceae em morcegos não-hematófagos do Estado do Acre. XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV 2024), Pirenópolis – 2024.

- Braga, MSC; Costa, FB; Pereira, JG; Santos, LS; Machado, RZ; Calchi, AC; **de Mello, VVC**; Dias, CM; Bassini-Silva, R; André, MR. Molecular detection and characterization of vector-borne agents in common opossums (Didelphis

marsupialis) from northeastern Brazil. XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV 2024), Pirenópolis – 2024.

Também atuei como coautora de trabalho apresentado no 11th Ticks and Tick-Borne Pathogens Conference (2024), relacionado à caracterização molecular de Anaplasmataceae em morcegos hematófagos da Amazônia brasileira:

- **de Mello, VVC**; Oliveira, LB; Coelho, TFSB; Lee, DAB; Neves, LF; Franco, EO; Mongruel, ACB; Machado, RZ; André, MR. Molecular detection and characterization of tick-borne Anaplasmataceae agents in vampire bats in the Brazilian Amazon. 11th Ticks and Tick-Borne Pathogens Conference (TTP11), 2024, Varadero – Cuba.

Essas participações contribuíram para a disseminação dos resultados da pesquisa em espaços acadêmicos ampliados, promovendo interface direta entre ciência, saúde e sociedade.

Complementarmente, participei como ouvinte no webinar “Genômica de Microrganismos na Era da IA” (03/07/2025) e no ciclo internacional de seminários “Microbiología Genómica y Bioinformática como herramientas de los Proyectos de Una Salud” (16 a 20/09/2024). Também atuei como expositora no XIV BioNativa, evento de divulgação científica realizado em praça pública no município de Jaboticabal (SP), no dia 13/09/2024, com carga horária de 8 horas.

Tais experiências evidenciam meu envolvimento ativo com a produção científica, a formação continuada e a popularização da ciência, consolidando uma atuação interdisciplinar alinhada aos princípios da pesquisa em saúde única.

8. COMENTÁRIOS DO SUPERVISOR

O relatório mostra-se bem escrito e ilustrado, trazendo resultados importantes no que diz respeito ao microbioma de duas espécies de moscas Streblidae parasitas de morcegos cavernícolas. O manuscrito está sendo redigido e será submetido à publicação. A bolsista participou como coautora em dois artigos já publicados e em um que foi submetido à publicação. Infelizmente, não pôde orientar alunos de Iniciação Científica devido ao curto período de bolsa.

9. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, N.M.; LIU, L.; JUTRAS, B.L.; YADAV, A.K.; NARASIMHAN, S.; GOPALAKRISHNAN, V.; ANSARI, J.M.; JEFFERSON, K.K.; CAVA, F.; JACOBS-WAGNER, C.; FIKRIG, E. Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, p. E781–E790, 2017. doi: 10.1073/pnas.1613422114.

ALCANTARA, DMC; GRACIOLLI, G; NIHEI, SS. Revision of *Noctiliostrebla* (Diptera: Streblidae), parasites of bulldog bats (Chiroptera: Noctilionidae: noctilio). **Zootaxa**, v. 4560, n. 3, p. 483-521, 2019. 10.11646/zootaxa.4560.3.4

ANDRÉ, M.R.; GUTIÉRREZ, R.; IKEDA, P.; DO AMARAL, R.B.; DE SOUSA, K.C.M.; NACHUM-BIALA, Y.; LIMA, L.; TEIXEIRA, M.M.G.; MACHADO, R.Z.; HARRUS, S. Genetic diversity of *Bartonella* spp. in vampire bats from Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 6, p. 2329-2341, 2019. 10.1111/tbed.13290.

ANDRÉ, M.R.; IKEDA, P.; LEE, D.A.B.; DO AMARAL, R.B.; CARVALHO, L.A.L.; PINHEIRO, D.G.; TORRES, J.M.; DE MELLO, V.V.C.; RICE, G.K.; CER, R.Z.; LOURENÇO, E.C.; OLIVEIRA, C.E.; HERRERA, H.M.; BARROS-BATTESTI, D.M.; MACHADO, R.Z.; BISHOP-LILLY, K.A.; DALGARD, C.L.; DUMLER, J.S. Characterization of the bacterial microbiome of non-hematophagous bats and associated ectoparasites from Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. 10.3389/fmicb.2023.1261156.

AVENA, CV et al. Deconstructing the bat skin microbiome: influences of the host and the environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1753, 2016. 10.3389/fmicb.2016.01753

BEVANS, A.I.; FITZPATRICK, D.M.; STONE, D.M.; BUTLER, B.P.; SMITH, M.P.; CHEETHAM, S. Phylogenetic relationships and diversity of bat-associated *Leptospira* and the histopathological evaluation of these infections in bats from Grenada, West Indies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007940, 2020. 10.1371/journal.pntd.0007940.

BINETRUY, F.; DUPRAZ, M.; BUYSSE, M.; DURON, O. Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 268, 2019. doi: 10.1186/s13071-019-3517-5. PMID: 31138324; PMCID: PMC6537145.

CAMILOTTI, V.L.; GRACIOLLI, G.; WEBER, M. M.; ARRUDA, J.L.S.; CÁCERES, N.C. Bat flies from the deciduous Atlantic Forest in southern Brazil: Host-parasite relationships and parasitism rates. **Acta Parasitologica**, v. 55, p. 194-200, 2010. 10.2478/s11686-010-0026-2.

CHEN, S.; ZHOU, Y.; CHEN, Y.; GU, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884-i890, 2018. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.

CHEN, Y.-L.; LEE, C.-C.; LIN, Y.-L.; YIN K.-M.; HO, C.-L.; LIU, T. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. **BMC bioinformatics**, v. 16, p. 1-11, 2015.

CICUTTIN, GL et al. Molecular detection of *Neorickettsia risticii* in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from Buenos Aires, Argentina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 648-650, 2013. 10.1590/S0100-736X2013000500016

DAVIS, N. M.; PROCTOR, D. M.; HOLMES, S. P.; RELMAN, D. A.; CALLAHAN, B. J. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. **Microbiome,** v. 6, p. 226, 2018.

DE MELLO, VICTÓRIA VALENTE CALIFRE; CALCHI, ANA CLÁUDIA; DE OLIVEIRA, LARYSSA BORGES; COELHO, TACIANA FERNANDES SOUZA BARBOSA; LEE, DANIEL ANTÔNIO BRAGA; FRANCO, ELIZ OLIVEIRA; MACHADO, ROSANGELA ZACARIAS; ANDRÉ, MARCOS ROGÉRIO. Molecular Survey of Piroplasmids and Hemosporidians in Vampire Bats, with Evidence of Distinct Piroplasmida Lineages Parasitizing *Desmodus rotundus* from the Brazilian Amazon. **Parasitologia**, v. 3, p. 248-259, 2023.

DÍAZ-SÁNCHEZ, S.; HERNÁNDEZ-JARGUÍN, A.; TORINA, A.; DE MERA, I.G.F.; BLANDA, V.; CARACAPPA, S.; GORTAZAR, C.; DE LA FUENTE, J. Characterization of the bacterial microbiota in wild-caught *Ixodes ventalloi*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, p. 336–343, 2019 doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.11.014.

DICK, C.W. Streblidae (Bat Flies). In: Mehlhorn, H (ed.). **Encyclopedia of Parasitology***,* springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 2561-2564, 2016. 10.1007/978-3-662-43978-4

DICK, C.W.; DITTMAR, K. Parasitic bat flies (Diptera: Streblidae and Nycteribiidae): host specificity and potential as vectors. In: Klimpel, S; Mehlhorn, H (eds.). Bats (Chiroptera) as vectors of diseases and parasites: Facts and myths, **Springer Berlin**, Heidelberg, 2014. 10.1007/978-3-642-39333-4

DICK, C.W.; GETTINGER, D. A faunal survey of streblid flies (Diptera: Streblidae) associated with bats in Paraguay. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1015-1024, 2005. 10.1645/GE-536R.1.

DICK, C.W.; MILLER, J. Streblidae. In: Brown BV et al. *Manual of central American diptera*, **NRC Research Press**, v. 2, p. 1249-1260, 2010.

DICK, C.W.; PATTERSON, B.D. Bat flies: obligate ectoparasites of bats. In: Morand S; Krasnov, B; Poulin, R (eds.). *Micromammals and macroparasites*: from evolutionary ecology to management. **Springer-Verlag**. 2006. 10.1007/978-4-431-36025-4.

DIETRICH, M et al. The excreted microbiota of bats: evidence of niche specialisation based on multiple body habitats. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 1, p. fnw284, 2017. 10.1093/femsle/fnw284

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2460–2461, 2010.

EISENHOFER, R.; MINICH, J.J.; MAROTZ, C.; COOPER, A.; KNIGHT, R.; WEYRICH, L.S. Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. **Trends in Microbiology,** v. 27, n. 2, p. 105-117, 2019. doi: 10.1016/j.tim.2018.11.003.

EWELS, P.; MAGNUSSON, M.; LUNDIN, S.; KÄLLER, M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n; 19, p. 3047-3048, 2016. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354.

FEDERICI, L.; MASULLI, M.; DE LAURENZI, V.; ALLOCATI, N. An overview of bats microbiota and its implication in transmissible diseases. **Frontiers in Microbiology,** v. 13, p. 1012189, 2022. doi: 10.3389/fmicb.2022.1012189

FERREIRA, MS et al. *Coxiella* and *Bartonella* spp. in bats (Chiroptera) captured in the Brazilian Atlantic Forest biome. **BMC Veterinary Research**, v. 14, p. 1-10, 2018. 10.1186/s12917-018-1603-0

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v.3, n. 5, p. 294 – 299, 1994.

FRAGO, E.; MALA, M.; WELDEGERGIS, B.T.; YANG, C.; MCLEAN, A.; GODFRAY, H.C.J.; GOLS, R.; DICKE, M. Symbionts protect aphids from parasitic wasps by attenuating herbivore-induced plant volatiles. **Nature Communications**, v. 8, p. 1860, 2017. doi: 10.1038/s41467-017-01935-0.

GALAN, M.; RAZZAUTI, M.; BARD, E.; BERNARD, M.; BROUAT, C.; CHARBONNEL, N.; DEHNE-GARCIA, A.; LOISEAU, A.; TATARD, C.; TAMISIER, L.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; VIGNES, H.; COSSON, J.F. 16S rRNA amplicon sequencing for epidemiological surveys of bacteria in wildlife. **mSystems Journal**, v. 1, p. e0032-16, 2016. doi: 10.1128/mSystems.00032-16.

GARBINO, G.S.T.; CLÁUDIO, V.C.; GREGORIN, R.; LIMA, I.P.; LOUEIRO, L.O.; MORAS, L.M.; MORATELLI, R.; DO NASCIMENTO, M.C.; NOGUEIA, M.R.; NOVAES, L.R.M.; PAVAN, A.C.; TAVARES, V.C.; PERACCHI, A.L. Updated checklist of bats (Mammalia: Chiroptera) from Brazil. **Zoologia,** v. 41, p. e23073, 2024. doi: 10.1590/S1984-4689.v41.e2307.

GOFTON, A.W.; OSKAM, C.L.; LO, N.; BENINATI, T.; WEI, H.; MCCARL, V.; MURRAY, D.C.; PAPARINI, A.; GREAY, T.L.; HOLMES, A.J.; BUNCE, M.; RYAN, U.; IRWIN, P. Inhibition of the endosymbiont "*Candidatus* Midichloria mitochondrii" during 16S rRNA gene profiling reveals potential pathogens in Ixodes ticks from Australia. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 345, 2015. doi: 10.1186/s13071-015-0958-3.

GRACIOLLI, G. Streblidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/2624>. Acesso em: 16 jan. 2024.

HAHN, K et al. *Yersinia pseudotuberculosis* serotype O: 1 infection in a captive Seba's short tailed-fruit bat (*Carollia perspicillata*) colony in Switzerland. **BMC Veterinary Research**, v. 17, p. 1-8, 2021. 10.1186/s12917-021-02796-y

IKEDA, P et al. Intra-and inter-host assessment of *Bartonella* diversity with focus on non-hematophagous bats and associated ectoparasites from Brazil. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1822, 2020. 10.3390/microorganisms8111822

IKEDA, P et al. Molecular survey of Anaplasmataceae agents and Coxiellaceae in non-hematophagous bats and associated ectoparasites from Brazil. **Parasitologia***,* v. 1, n. 4, p. 197-209, 2021. 10.3390/parasitologia1040021

INGALA, MR; SIMMONS, NB; PERKINS, SL. Bats are an untapped system for understanding microbiome evolution in mammals. **Msphere**, v. 3, n. 5, 2018. 10.1128/msphere.00397-18

KAY, M.; ELKIN, L.; HIGGINS, J.; WOBBROCK, J. ARTool: Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial ANOVAs (Version 0.11.2) [Computer software]. **Zenodo**, 2025 https://doi.org/10.5281/zenodo.594511

KNIGHT, R.; VRBANAC, A.; TAYLOR, B.C.; AKSENOV, A.; CALLEWAERT, C.; DEBELIUS, J.; GONZALEZ, A.; KOSCIOLEK, T.; MCCALL, L.I.; MCDONALD, D.; MELNIK, A.V.; MORTON, J.T.; NAVAS, J.; QUINN, R.A.; SANDERS, J.G.; SWAFFORD, A.D.; THOMPSON, L.R.; TRIPATHI, A.; XU, Z.Z.; ZANEVELD, J.R.; ZHU, Q.; CAPORASO, J.G.; DORRESTEIN, P.C. Best practices for analysing microbiomes. **Nature Reviews Microbiology,** v. 16, n. 7, p. 410-422, 2018. doi: 10.1038/s41579-018-0029-9.

KOLODNY, O.; WEINBERG, M.; RESHEF, L.; HARTEN, L.; HEFETZ, A.; GOPHNA, U.; FELDMAN, M.W.; YOVEL, Y. Coordinated change at the colony level in fruit bat fur microbiomes through time. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 116-124, 2019. 10.1038/s41559-018-0731-z

LAHTI, L.; SHETTY, S. et al. Tools for microbiome analysis in R. Version, 2017. Disponível em <http://microbiome.github.com/microbiome>. Acesso em 15 de fevereiro de 2025.

LALZAR, I.; HARRUS, S.; MUMCUOGLU, K.Y.; GOTTLIEB, Y. Composition and seasonal variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology Journal**, v. 78, p. 4110–4116, 2012. doi: 10.1128/AEM.00323-12.

LANDESMAN, W.J.; MULDER, K.; ALLAN, B.F.; BASHOR, L.A.; KEESING, F.; LOGIUDICE, K.; OSTFELD, R.S. Potential effects of blood meal host on bacterial community composition in *Ixodes scapularis* nymphs. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, p. 523–527, 2019. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.01.002.

LANDMANN, F. The *Wolbachia* Endosymbionts. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, 2019. 10.1128/microbiolspec.bai-0018-2019.

LEE, D.A.B.; FERNANDES SHIMABUKURO, P.H.; BRILHANTE, A.F.; CADINA ARANTES, P.V.; SANCHES, G.S.; FRANCO, E.O.; MACHADO, R.Z.; MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B.; ANDRÉ, M.R. *Bartonella* spp. in Phlebotominae Sand Flies, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 30, n. 10, p. 2099-2107. doi: 10.3201/eid3010.240397.

LEGGETT, R.M.; RAMIREZ-GONZALEZ, R.H.; CLAVIJO, B.J.; WAITE, D.; DAVEY, R.P. Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. **Frontiers in Genetics**, v. 4, p. 288, 2013. doi: 10.3389/fgene.2013.00288.

LEJAL, E.; ESTRADA-PEÑA A.; MARSOT, M.; COSSON, J.F.; RUÉ, O.; MARIADASSOU, M.; MIDOUX, C.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; POLLET, T. Taxon appearance from extraction and amplification steps demonstrates the value of multiple controls in tick microbiota analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 492638, 2020.

LEMIEUX-LABONTÉ, V et al. Environment and host species shape the skin microbiome of captive neotropical bats. **PeerJ Open Research***,* v. 4, p. e2430, 2016. 10.7717/peerj.2430

LOURENCO, E.C.; ALMEIDA, J.C.; FAMADAS, K.M. Richness of ectoparasitic flies (Diptera: Streblidae) of bats (Chiroptera)—a systematic review and meta-analysis of studies in Brazil. **Parasitology Research**, v. 115, p. 4379-4388, 2016. 10.1007/s00436-016-5223-y.

LOURENCO, E.C.; ALMEIDA, J.C.; FAMADAS, K.M. Richness of ectoparasitic flies (Diptera: Streblidae) of bats (Chiroptera)—a systematic review and meta-analysis of studies in Brazil. **Parasitology Research**, v. 115, p. 4379-4388, 2016. 10.1007/s00436-016-5223-y.

LOURENÇO, E.C.; FAMADAS, K.M.; GOMES, L.A.C.; BERGALLO, H.G. Ticks (Ixodida) associated with bats (Chiroptera): an updated list with new records for Brazil. **Parasitology Research**, v. 122, n. 10, p. 2335-2352, 2023. doi: 10.1007/s00436-023-07935-y.

LUTZ, HL et al. Ecology and host identity outweigh evolutionary history in shaping the bat microbiome. **mSystems**, v. 4, n. 6, 2019. 10.1128/mSystems.00511-19

MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, p. 2957-2963, 2011 doi: 10.1093/bioinformatics/btr507.

MCMURDIE, P.J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
MORSE, S.F.; DICK, C.W.; PATTERSON, B.D.; DITTMAR, K. Some like it hot: evolution and ecology of novel endosymbionts in bat flies of cave-roosting bats (hippoboscoidea, nycterophiliinae). **Applied and Environmental Microbiology Journal,** v. 78, n. 24, p. 8639-49, 2012. doi: 10.1128/AEM.02455-12.
MUEGGE, BD ET AL. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. **Science**, v. 332, n. 6032, 2011. 10.1126/science.1198719
MÜHLDORFER, K et al. *Yersinia* species isolated from bats, Germany. **Emerging Infectious Diseases** , v. 16, n. 3, p. 578, 2010. 10.3201/eid1603.091035
NOVIANTO, D.; TUANGPERMSUB, S.; NGAMPRASERTWONG, T.; KAEWTHAMASORN, M. Host associations and genetic diversity of bat flies (Diptera: Nycteribiidae and Streblidae) in bats from Thailand. **Parasites & Vectors**, v. 18, n. 1, p. 188, 2025. doi: 10.1186/s13071-025-06814-y.
NOWAK, R. M. & WALKER, E. P. Walker's Bats of the World (**Johns Hopkins Univ. Press**, 1994).
OKSANEN, J.; BLANCHET, F.G.; FRIENDLY, M. et al. (2022). vegan: Community Ecology Package. **R package version 2.6-2**. https://cran.r-project.org/package=vegan
PERKINS, SL; SCHAER, J. A modern menagerie of mammalian malaria. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 772-782, 2016. 10.1016/j.pt.2016.06.001
PETERSEN, F.T.; MEIER, R.; KUTTY, S.N.; WIEGMANN, B.M. The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, n. 1, p. 111-122, 2007. 10.1016/j.ympev.2007.04.023.
PETERSEN, F.T.; MEIER, R.; KUTTY, S.N.; WIEGMANN, B.M. The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, n. 1, p. 111-122, 2007. 10.1016/j.ympev.2007.04.023.
PREVEDELLO, J.A.; GRACIOLLI, G.; DE CARVALHO, C.J.B. A fauna de dípteros (Streblidae e Nycteribiidae) ectoparasitos de morcegos (Chiroptera) do estado do Paraná, Brasil: composição, distribuição e áreas prioritárias para novos estudos. **Biociências**, v. 13, n. 2, 2005.
QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41(Database issue): D590-6, 2013. doi: 10.1093/nar/gks1219.
REEVES, W.K.; LLOYD, J.E. Louse flies, keds, and bat flies (Hippoboscoidea). In: Mullen, GR; Durden, LA (eds.). **Medical and veterinary entomology**. Academic Press, 2019. p. 421-438. 10.1016/B978-0-12-814043-7.00020-0
SATO, H; MAFIE, E. "Visiting old, learn new": taxonomical overview of chiropteran trypanosomes from the morphology to the genes. **Parasitology Research**, v. 121, n. 3, p. 805-822, 2022. 10.1007/s00436-022-07423-9
SOARES, F.A.M.; GRACIOLLI, G.; ALCÂNTARA, D.M.C.; RIBEIRO, C.E.B.P.; VALENÇA, G.C.; FERRARI, S.F. Bat flies (Diptera: Streblidae) ectoparasites of bats at an Atlantic Rainforest site in northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 13, p. 242-246, 2013. 10.1590/S1676-06032013000200024.
SPEER, K.A.; TEIXEIRA, T.S.M.; BROWN, A.M.; PERKINS, S.L.; DITTMAR, K.; INGALA, M.R.; WULTSCH, C.; KRAMPIS, K.; DICK, C.W.; GALEN, S.C.; SIMMONS, N.B.; CLARE, E.L. Cascading effects of habitat loss on ectoparasite-associated bacterial microbiomes. **ISME Communications**, v. 2, n. 1, p. 67, 2022. 10.1038/s43705-022-00153-0.
SPEER, K.A.; VÍQUEZ-R, L.; FRICK, W.F.; IBARRA, A.; SIMMONS, N.B.; DITTMAR, K.; CALDERÓN, R.S.; PRECIADO, R.; MEDELLÍN, R.; TSCHAPKA, M.; SOMMER, S.; PERKINS, S.L. Comparative Community Ecology Reveals Conserved Ectoparasite Microbiomes Amidst Variable Host and Environment Microbiomes. **Ecology & Evolution**, v. 15, n. 4, e71120, 2025. doi: 10.1002/ece3.71120.
STUCKEY, M.J.; CHOMEL, B.B.; GALVEZ-ROMERO, G.; OLAVE-LEYVA, J.I.; OBREGÓN-MORALES, C.; MORENO-SANDOVAL, H.; ARÉCHIGA-CEBALLOS, N.; SALAS-ROJAS, M.;

AGUILAR-SETIÉN, A. *Bartonella* infection in hematophagous, insectivorous, and phytophagous bat populations of Central Mexico and the Yucatan Peninsula. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 2, p. 413, 2017. 10.4269/ajtmh.16-0680.

STUCKEY, MJ et al. *Bartonella* infection in hematophagous, insectivorous, and phytophagous bat populations of Central Mexico and the Yucatan Peninsula. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 2, p. 413, 2017. 10.4269/ajtmh.16-0680

SZENTIVÁNYI, T.; CHRISTE, P.; GLAIZOT, O. Bat Flies and Their Microparasites: Current Knowledge and Distribution. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 115, 2019. doi: 10.3389/fvets.2019.00115.

UPHAM, N et al. Mammal diversity database. **Mammal Diversity Database** (Version 1.12). Zenodo, 2024. 10.5281/zenodo.4139722.

VIEIRA, TM et al. *Leishmania* diversity in bats from an endemic area for visceral and cutaneous leishmaniasis in Southeastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 228, p. 106327, 2022. 10.1016/j.actatropica.2022.106327

WALLAU GL et al. 2023. The virome of bats inhabiting Brazilian biomes: knowledge gaps and biases towards zoonotic viruses. **Microbiology Spectrum**, 10.1128/spectrum.04077-22.

WANG, X.; LIU, T.; WU, Y.; ZHONG, D.; ZHOU, G.; SU, X.; XU, J.; SOTERO, C.F.; SADRUDDIN, A.A.; WU, K.; CHEN, X.G.; YAN, G. Bacterial microbiota assemblage in *Aedes albopictus* mosquitoes and its impacts on larval development. **Molecular Ecology**, v. 27, p. 2972-2985, 2018. doi: 10.1111/mec.14732.

WEISS, S.; XU, Z.Z.; PEDDADA, S.; AMIR, A.; BITTINGER, K.; GONZALEZ, A.; LOZUPONE, C.; ZANEVELD, J.R.; VÁZQUEZ-BAEZA, Y.; BIRMINGHAM, A.; HYDE, E.R.; KNIGHT, R. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 27, 2017. doi: 10.1186/s40168-017-0237-y.

WENZEL, R. L**.** (1976). The streblid batflies of Venezuela (Diptera: Streblidae). Brigham Young University Science Bulletin. ***Biological Series***, 20(4), 1–76.

WILKINSON, D.A.; DURON, O.; CORDONIN, C.; GOMARD, Y.; RAMASINDRAZANA, B.; MAVINGUI, P.; GOODMAN, S.M.; TORTOSA, P. The Bacteriome of Bat Flies (Nycteribiidae) from the Malagasy Region: a Community Shaped by Host Ecology, Bacterial Transmission Mode, and Host-Vector Specificity. **Applied and Environmental Microbiology Journal,** v. 82, n. 6, p, 1778-88, 2016. doi: 10.1128/AEM.03505-15. PMID: 26746715; PMCID: PMC4784053.

WINTER, AS et al. Skin and fur bacterial diversity and community structure on American southwestern bats: effects of habitat, geography and bat traits. **PeerJ Open Research**, v. 5, p. e3944, 2017. 10.7717/peerj.3944

WOBBROCK, J.O.; FINDLATER, L.; GERGLE, D.; HIGGINS, J.J. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only ANOVA procedures. **Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems** (CHI '11), ACM, New York, NY, USA, pp. 143–146, 2011. https://doi.org/10.1145/1978942.1978963.

WRIGHT, E. S. Using DECIPHER v2. 0 to analyze big biological sequence data in R, 2016.

YU, Y.; LEE, C.; KIM, J.; HWANG, S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 670–679, 2005.