

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
FioCruz Amazônia

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO
PATÓGENO HOSPEDEIRO (PPGBIO – INTERAÇÃO)**

JOKEBEDE MELYNDA DOS SANTOS PAULINO ROSA

***Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) EM MARUINS DO GÊNERO
Culicoides e *Leptoconops* (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE)
COLETADOS NOS ESTADOS DO AMAZONAS E PARÁ**

Manaus – AM
2021



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

JOKEBEDE MELYNDA DOS SANTOS PAULINO ROSA

***Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) EM MARUINS DO GÊNERO
Culicoides e *Leptoconops* (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE)
COLETADOS NOS ESTADOS DO AMAZONAS E PARÁ**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Leônidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ-AM, para obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação patógeno hospedeiro área de concentração eco-epidemiologia das doenças transmissíveis.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Arley Costa Pessoa

Coorientador: Prof. Dr. James Lee Crainey

Manaus – AM

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

R788w

Rosa, Jokebede Melynda dos Santos Paulino

Wolbachia (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em Maruins do gênero *Culicoides* e *Leptoconops* (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE) coletados nos estados do Amazonas e Pará. / Jokebede Melynda dos Santos Paulino Rosas. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2021.

61 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2021.

Orientador: Prof^o. Dr. Felipe Arley Costa Pessoa.

Co-orientador: Prof. Dr. James Lee Crainey.

1. Culicoides 2. Wolbachia 3. Filogenia I. Título

CDU 595.77 (043.3)

CDD 595.772

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos - CRB-11/ 287

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, toda honra e Glória, seja dada a Ele.

Agradeço a Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ – ILM) pela oportunidade de realizar este projeto de pesquisa, por conceder acesso ao laboratório, pela disponibilidade de equipamentos e pelo auxílio do corpo docente, técnico e de servidores que foram essenciais durante estes anos.

Ao meu orientador, Felipe Arley Costa Pessoa, por tudo o que me ensinou nesta jornada, pela paciência e pela compreensão. Agradeço por inserir-me em um grupo de pesquisa que tanto me cativou e que levarei os ensinamentos para toda a vida.

Ao meu coorientador, James Lee Crainey, por tudo que me ensinou nesta trajetória da pós-graduação. Obrigada por todo conhecimento e ensino.

A Emanuelle Farias, com seu dom para o ensino e sua paixão pelos *Culicoides* por ajudar-me nessa caminhada. Agradeço por todo o conhecimento que foi compartilhado e por mostrar-me esse mundo fantástico.

Ao Tulio Romão, por disponibilizar do seu tempo para me ajudar nas etapas moleculares deste projeto. Obrigada por todo o conhecimento e paciência.

A Dra. Ana Caroline, por disponibilizar do seu tempo para fazer as sequencias no seu laboratório. E a todos do grupo pela dedicação e apoio. Muito obrigada

A Caroline, por toda ajuda e disponibilização do seu tempo para me ajudar nessa reta final. Obrigada.

Aos meus pais que me deram amor e oportunidades, obrigada por terem me criado com amor, bondade e carinho, foi essencial para o meu crescimento até este momento.

Ao Charles, meu esposo e meu melhor amigo que está comigo desde o começo dessa trajetória em momentos bons e de tristeza. Agradeço por estar presente em mais uma etapa da minha vida, por sempre ser o primeiro a me incentivar nos estudos e por acreditar que eu seria capaz. Agradeço por me apoiar sempre em todas

as dificuldades e lutas. Todas as minhas conquistas são nossas conquistas.

Agradeço a Sanmya e Jhonata que acompanharam minha trajetória na pós-graduação. Obrigada por toda ajuda e conversas.

Agradeço a todos os meus colegas da minha turma de Pós-graduação, e principalmente a minha amiga Kemily por toda ajuda, conversas, desabafos e risadas que tivemos nesse período do mestrado.

Agradeço a todos aos meus colegas de laboratório EDTA, por todo conhecimento e ensinamento que tive esses anos com vocês.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro em modelo de bolsa de estudo que ajudou nas minhas necessidades nesse período de pandemia do Covid-19

Por fim, agradeço a todos direta e indiretamente que contribuíram para que fosse possível a realização desse trabalho, o meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

*Dou sempre graças por todas as coisas a nosso Deus e Pai, em nome de
nosso Senhor Jesus Cristo. (Efésios 5:20)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de Vida. A- Ovos; B- Larva; C- Pulpa; D- Adulto, fêmea de *C. insignis*

Figura 2A – Árvore filogenética dos supergrupos de *Wolbachia* (A-F, H, L, S)

Figura 2B – Árvore filogenética dos supergrupos de *Wolbachia* (A-F, J, L, S)

Figura 3 – Diagrama esquemático da filogenia de *Wolbachia pipientis*

Figura 4 – Árvore representativa (genes *nouG*, *dnaA*, *aspC* e *WD 0198*).

Figura 5 – Árvore representativa (genes *atpD* e *coxA*).

Figura 6 – Árvore representativa (genes *ftsZ* e *nouG*).

Figura 7 – Gel de agarose com screening (genes *aspC*, *aspS* e *atpD*)

Figura 8 – Gel de agarose com screening (gene *coxA*)

Figura 9 – Gel de agarose com screening (genes *dnaA*, *fabk* e *hcpA*)

Figura 10 – Gel de agarose com screening (genes *WD0237*, *WD0183* e *WD1005*)

Figura 11 - Gel de agarose com screening (gene *nadH*)

Figura 12 – Gel de agarose com screening (genes *nouD*, *nouG* e *pdhB*)

Figura 13 – Gel de agarose com screening (gene *sucB*)

Figura 14 – Árvore filogenética construída com gene *nouG*

Figura 15 – Árvore filogenética construída com gene *WD0198*

Figura 16 – Árvore filogenética construída com gene *aspC*

Figura 17- Árvore filogenética construída com gene *DnaA*

Figura 18 – Árvore filogenética construída com gene *atpD*

Figura 19 - Árvore filogenética construída com gene *CoxA*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programação da reação de sequenciamento adotada nesse experimento para a amplificação dos primers

Tabela 2 – Alvos e sequências iniciadoras para a detecção de *Wolbachia* nas amostras de *Culicoides* analisadas

Tabela 3 – Amostras de *Culicoides* positivas para os alvos analisados nesse trabalho

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEC - Dietilcarbamazina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DOX – Doxiciclina

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

IC - Incompatibilidade citoplasmática

ILMD - Instituto Leônidas e Maria Deane

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

MLST – *Multi locus sequencing typing*

pb - Pares de Base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

rDNA – Dna ribossomal

L. – *Leshmania*

C. - *Culicoides*

ORO- Oropouche

RESUMO

A família Ceratopogonidae é composta de pequenos dípteros Culicomorpha, que medem de 1 a 6 mm de comprimento, com corpos esguios a moderadamente robustos. Algumas espécies dessa família são hematófagas e conhecidas vulgarmente no Brasil como maruins, mosquitinhos pólvora e mosquitinhos de mangue. *Wolbachia* sp. são um gênero de bactéria endossimbiótica, gram-negativa intracelular obrigatória de transmissão materna, que infecta os artrópodes e nematóides filarias em todo o mundo e são conhecidos por terem efeitos epidemiológico importantes na biologia de seus hospedeiros. Até o momento, esse trabalho abordou a detecção e caracterização de *Wolbachia* sp. em espécimes da família Ceratopogonidae com importância médica e veterinária na América do Sul, por este fato, um estudo com levantamento de cepas de *Wolbachia* sp. O objetivo deste trabalho foi detectar e caracterizar *Wolbachia* sp. em ceratopogonídeos hematófagos do Amazonas e Pará. Usando um total de 17 ensaios de PCR de detecção de *Wolbachia* de baixa especificidade e sequenciamento de Sanger foram rastreados os extratos de DNA de 15 espécies de Ceratopogonídeos para a presença de *Wolbachia*. As pesquisas do BLAST revelaram que oito dos 48 produtos de PCR amplificados na triagem inicial de PCR eram de origem *Wolbachia* e das sequências de genes alvo. Quatro dessas sequências foram amplificadas de *Culicoides phlebotomus*; a análise filogenética de cada uma das sequências de genes individualmente (nouG, dnaA, aspC e WD 0198) colocou essas sequências em grupos suportados por bootstrap com super clado B de *Wolbachia*, alterando essas sequências todas derivadas de uma única cepa de *Wolbachia* chamada wCphl. Duas sequências de genes do supergrupo B (atpD e coxA) também foram amplificadas de *C. leopoldoi*, essas duas sequências também são consideradas derivadas da mesma cepa de *Wolbachia*, que denominamos de wCleo. A análise filogenética com as duas sequências de genes amplificadas de uma extração de DNA de *Culicoides pseudodiabolicus* (ftsZ e nouG) sugeriu que eles pertencem ao mesmo supergrupo de *Wolbachia* que wCfeJ, a cepa de *Wolbachia* recentemente encontrada infectando pulgas de gato. A triagem não apresentou evidências de infecções por *Wolbachia* em qualquer uma das outras 13 espécies de Ceratopogonidae testadas para este estudo. É importante ressaltar que nossos resultados sugerem que todos os três vetores da doença *Culicoides* que testamos (*C. insignis*, *C. foxi*, *C. paraensis*, *C. phlebotomus*) são livres de *wolbachia*.

Palavras-chave: *Culicoides*; *Wolbachia* sp.; Filogenia.

ABSTRACT

The family Ceratopogonidae is composed of small Culicomorpha Diptera, measuring 1 to 6 mm in length, with slender to moderately robust bodies. Some species of this family are hematophagous and commonly known in Brazil as maruins, gunpowder mosquitoes and mangrove mosquitoes. *Wolbachia* sp. are a genus of endosymbiotic bacteria, obligate intracellular gram-negative of maternal transmission, which infects filarial arthropods and nematodes worldwide and which are known to have epidemiologically important effects on the biology of their hosts. So far, no work has addressed the detection and characterization of *Wolbachia* sp. in specimens of the family Ceratopogonidae with medical and veterinary importance in South America, for this fact, a study with a survey of strains of *Wolbachia* sp. The objective of this work was to detect and characterize *Wolbachia* sp. in anthropophilic ceratopogonids from the Amazonas e Pará. Using a total of 17 low-specificity *Wolbachia*-detecting PCR assays and Sanger sequencing, I screened DNA extracts from 15 species of Ceratopogonids for the presence *Wolbachia*. BLAST searches revealed that 8 of the 48 PCR products amplified in our initial PCR screening were of *Wolbachia* origin and from the targeted gene sequences. Four of these sequences were amplified from *Culicoides phlebotomus*; phylogenetic analysis with each of the gene sequences individually (nouG, dnaA, aspC and WD 0198) placed these sequences in bootstrap supported groups with super clade B of *Wolbachia*, suggesting these sequences all derive from a single *Wolbachia* strain named wCphl here. Two supergroup B gene sequence (atpD and coxA) were also amplified from *C. leopoldoi*, these two sequences are also presumed derive from the same *wolbachia* strain, which we have named here wCleo. Phylogenetic analysis with the two gene sequences amplified from a DNA extraction of *Culicoides pseudodiabolicus* (ftsZ and nouG) suggested that they belong to the same supergroup of *Wolbachia* as wCfeJ, a *Wolbachia* strain recently found infecting cat fleas. My screening failed to provide evidence of *wolbachia* infections in any of the other 13 species of Ceratopogonidae species tested for this study. Importantly, our results suggest that all three of *culicoides* disease vectors that we tested (*C. insignis*, *C. foxi*, *C. paraensis*, *C. phlebotomus*) were *wolbachia*-free

Keywords: *Culicoides*., *Wolbachia* sp., Prevalence, Phylogeny.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. CERATOPOGONÍDAE	13
2.2. WOLBACHIA	15
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo Geral	21
4.2 Objetivos Específicos	21
5. METODOLOGIA.....	22
5.1. Área de estudo e aspectos éticos	22
5.2. Procedimentos	22
5.2.1 Coleta de insetos	22
5.2.2 Identificação taxonômica.....	22
5.2.3 Extração de DNA	23
5.2.4. Condições padrão de reação de PCR.....	23
5.2.5. PCR screening para Wolbachia usando baixa temperatura de anelamento.....	24
5.2.6. Eletroforese	27
5.2.7. Purificação de produtos de PCR e sequenciamento de Sanger	28
5.2.8. Análise preliminar de seqüências de DNA	28
5.2.9. Análise filogenética de genes de Wolbachia sp.....	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	<u>29</u>
6.1 O isolamento de seqüências de Wolbachia sp. a partir de três espécies diferentes de Culicoides spp.	<u>29</u>
6.2 Classificação molecular de uma nova cepa de Wolbachia sp. (wCphI) de Culicoides phlebotomus	30
6.3 Classificação molecular de uma nova cepa de Wolbachia sp. (wCleo) isolada de Culicoides leopoldoi	333
6.4 Classificação molecular de uma nova cepa de Wolbachia sp. (wCpse) isolada de Culicoides pseudodiabolicus	35
7. CONCLUSÕES PARCIAIS	39
8. MATERIAL SUPLEMENTAR	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A família Ceratopogonidae é composta de pequenos dípte Culicomorpha, que medem de 1 a 6 mm de comprimento, com corpos esguios a moderadamente robustos (Downes et al., 1981). Algumas espécies dessa família são hematófagas e conhecidas vulgarmente no Brasil como maruins, mosquitinhos pólvora e mosquitinhos de mangue (Downes et al., 1981).

A fauna mundial de Ceratopogonidae é composta 6.267 espécies, sendo encontrada na região Neotropical 1.305 espécies, no Brasil 507 espécies e na região Amazônica 296 espécies (Borkent & Dominiak 2020). Dentre os 112 gêneros dessa família, quatro possuem espécies hematófagas em vertebrados, incluindo o homem; são *Austroconops*, *Forcipomyia* do subgênero *Lasiohelea*, *Leptoconops* e *Culicoides* (Mellor et al., 2000). Na Amazônia brasileira ocorrem os três últimos gêneros (Borkent, 2005; Borkent, Spinelli 2007; Pessoa et al., 2012). Os maruins são insetos bastante estudados por serem vetores de patógenos de importância médica e veterinária, transmitindo uma variedade de agentes patogênicos, como vírus, protozoários e nematoides (Mellor et al., 2000), principalmente por espécies de *Culicoides* (Mellor et al., 2000). Devido ao tipo de probóscide, as picadas causam incômodos aos hospedeiros e dependendo do grau de sensibilidade dos mesmos aos componentes da saliva desses insetos, as reações podem causar dermatites alérgicas, pápulas, pústulas e eczema (Ronderos et al. 2003). *Leptoconops*, *Forcipomyia* e *Culicoides* transmitem diferentes espécies de filárias ao homem e outros primatas (Borkent & Spinelli, 2007). Também, espécies de *Culicoides* podem estar envolvidas na transmissão da *Leishmania* Ross (Seblova et al., 2012;2015; Slama et al., 2014).

Wolbachia sp. é um gênero de bactéria endossimbiótica, gram-negativa intracelular obrigatória de transmissão materna, que infecta os artrópodes e filárias em todo o mundo. A *Wolbachia* é encontrada tanto nos tecidos somáticos quanto nos reprodutivos (Dobson et al., 2002) de diversas espécies de artrópodes e nematóides (Hilgenboecker et al., 2008).

Cerca de 15-76% das espécies de insetos abrigam *Wolbachia* sp. (Hilgenboecker et al., 2008; Werren et al., 1995; Werren, 1997; Bordenstein et al., 2001; Clark et al., 2001; Stevens et al., 2001). A infestação por *Wolbachia* ocorre em artrópodes de regiões geográficas distintas (Prezotto, 2012). Em insetos, por

exemplo, foram encontrados *Wolbachia* no Panamá, América do Norte, Inglaterra, Indonésia, Estados Unidos, Austrália e Israel (Werren et al., 1995; Lewis et al., 2014; Mee et al., 2015) No Brasil, Lavagnolli et al. (2005) encontraram 45% de infecção numa amostragem de insetos de uma área de mata atlântica no litoral Norte do estado de São Paulo.

Até recentemente pouco se conhecia sobre *Wolbachia* em *Culicoides*, mas na última década ocorreram vários avanços no desenvolvimento no campo. Lewis et al. (2014) detectaram a presença de endossimbionte *Wolbachia* e *Cardinium* em *Culicoides* spp. e Covey et al. (2019) detectaram infecções por *Wolbachia* em mais nove espécies de *Culicoides*. Ghosh et al. (2019) conseguiram estabilizar infecções artificiais em células de *Culicoides sonorensis*, entretanto ainda é pouco conhecido em *Culicoides* da América latina.

Na história recente tiveram vários avanços no controle de arboviroses utilizando *Wolbachia* para criar infecções artificiais em mosquitos (Dutra et al., 2016). Embora *Culicoides* seja vetor de vários patógenos de importância médica e veterinária, essa tecnologia ainda não se aplica para o controle de doenças transmitidas por *Culicoides* (Ghosh et al., 2019). Semelhante a isso, é conhecida que algumas espécies de mosquitos tenham infecções de *Wolbachia* naturais que tem um grande efeito no desenvolvimento de patógenos de importância médica em *Plasmodium falciparum* (Gomes et al., 2017). Mas ainda nada é conhecido sobre infecções naturais em *Culicoides* de importância médica e veterinária na América Latina, e podem ser um impacto epidemiológico nas doenças regionais (Gosh et al., 2019; Lewis et al., 2014; Covey et al., 2019).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CERATOPOGONÍDAE

Os maruins são insetos holometábolos (Figura 1). As fêmeas adultas, por sua vez, precisam fazer uma refeição de sangue para amadurecer seus folículos ovarianos (Mellor et al., 2000). As larvas e pupas de maruins podem desenvolver-se em ambientes com água ou semiaquáticos, dentre rios, poças, correntezas, brejos, lamaçais, praias, pântanos, buracos de árvores, esterco de animais e tecidos de frutas ou outros vegetais em decomposição (Mellor et al., 2000).

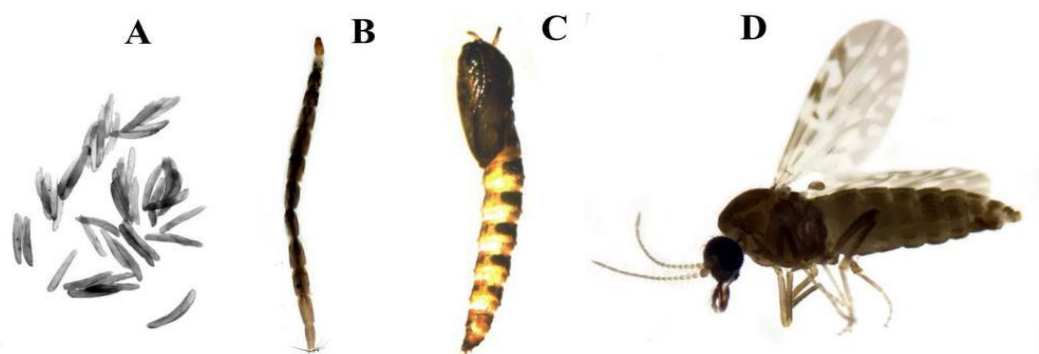


Figura 1: Ciclo de vida do maruim nas fases- A: ovos, B- larva, C- pupa e D- adulto fêmea *C. insignis*. (Fonte: EDTA)

Na Amazônia brasileira, podem ser encontrados em diversos substratos, como inflorescência de *Heliconia* (helicônias), cascas de frutos de *Theobroma cacao* Linn. (cacau), troncos de *Musa paradisíaca* Linn (bananeira) em decomposição, *Guzmania brasiliensis* Ule (bromélias epífitas e terrestres) e Serapilheira (Spinelli et al., 2007; Torreias & Ferreira-keppler 2011). A maioria das espécies de *Culicoides* são de hábito crepuscular, sendo encontradas ao entardecer e ao amanhecer. Embora algumas espécies possuam hábitos diurno, como *Culicoides paraensis* (Goeldi) e *Leptoconops brasiliensis* (Lutz) (Trindade & Gorayeb 2005).

Entre os Ceratopogonidae hematófagos a maioria das espécies pertencem ao gênero *Culicoides*, com cerca de 1.400 espécies registradas em todo o mundo, (Mellor et al., 2000). Sobre o gênero *Leptoconops* existem 12 espécies na região Neotropical, distribuídas em quatro subgêneros, com apenas as espécies *L. knowltoni* Clastrier & Wirth, registradas no Estado de Santa Catarina e *L. brasiliensis* (Lutz), tendo registros no Acre, Amazonas e Pará. Essas espécies

também ocorrem na Argentina e no Uruguai (Trindade & Gorayeb 2005; Pessoa et al., 2012; Farias et al., 2015).

Existem mais de 50 arbovírus que foram isolados em *Culicoides*, dentro das famílias Bunyaviridae (20 vírus), Reoviridae (19 vírus) e Rhabdoviridae (11 vírus) (Meiswinkel et al., 1994), entre eles o vírus da Língua Azul em ruminantes domésticos e selvagens, vírus da febre catarral (VFC), vírus da doença hemorrágica epizootico (EHDV), vírus da encefalomielite equina (EEV) e o vírus Oropouche, em humanos (Mellor et al., 2000).

Estudo feito por Rebêlo et al. (2016) relataram a presença de DNA de *Leishmania* em *Culicoides* spp. pela primeira vez no Brasil. Também, detectaram DNA de *Le. braziliensis* em *C. foxi* Ortiz, *C. ignacioi* Forattini e *C. insignis*, enquanto *Le. amazonensis* (Lainson & Shaw) o DNA foi detectado em *C. filariferus* Hoffman e *C. flavivenulus* Lutz. Essas duas espécies de *Leishmania* são conhecidas como agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana.

Culicoides insignis é vetor do vírus da língua azul em ruminantes domésticos e selvagem da Américas Central e do Sul. Corrêa et al. (2007) estudaram a incidência de dermatites alérgicas em ovinos ocasionadas por picadas de *Culicoides insignis* Lutz no Sul do Brasil. Felipe-Bauer e Sternheim (2008) coletaram *C. insignis* buscando repasto sanguíneo nas partes expostas do corpo das pessoas e algumas desenvolveram dermatite inflamatória (eczema) devido a reação alérgica causada pelas picadas. Rebelo et al., (2016) encontraram espécies do grupo *guttatus* positivos em infecção natural por *Leshmania*, *C. insignis*, *C. ignacioi* e *C. foxicom* com DNA de *L. braziliensis* e *C. filariferus* e *C. flavivenula* com DNA de *L. amazonenses*.

Culicoides paraensis é a espécie mais importante de Ceratopogonidae devido a sua importância médica na Região Neotropical. Essa espécie transmite *Mansonella ozzardi* em seres humanos na Argentina (Shelley & Coscarón 2002) e infecções por vírus Oropouche (ORO) no Panamá, Peru e Brasil. Essa doença viral é uma séria ameaça à saúde pública em áreas tropicais e subtropicais da América Central e América do Sul (Pinheiro et al., 1981)

No Brasil, foram relatadas de 1960 á 1980 epidemias de ORO no estado Pará, região Norte do Brasil. Durante as últimas décadas, o vírus ORO se espalhou para os estados vizinhos do Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia, Maranhão e Tocantins (Nunes et al. 2007). Em relação aos vetores de filarias que transmitem

Mansonella ozzardi além de Simulídeos são: *Culicoides insinuatus* (Colômbia); *C. guttatus* (Guiana, Suriname e Venezuela); *C. paraensis* (Guiana Francesa, Argentina e Bolívia); *C. debilipalpis* (Bolívia e Argentina); *C. lahillei* (Argentina); *C. furens* (Haiti e São Vicente); *C. barbosai* (Haiti); *C. paraensis* (São Vicente); *C. phlebotomus* (Trinidad) e *Leptoconops bequaerti* (Haiti) (Linley et al., 1983; Lane, Crosskey, 1990; Crosskey, 1993).

Culicoides phlebotomus é uma espécie bem conhecida na região Neotropical por atacar humanos e cães em praias marinhas, é também conhecida por atacar tartarugas marinhas que vão à praia para depositar seus ovos (Borkent e Spinelli 2007). Trindade e Gorayeb (2005) estudaram os ceratopogonídeos hematógagos de duas áreas costeiras do Estado do Pará: uma do litoral Atlântico, onde registraram seis espécies, sendo as mais abundantes *C. maruim* Lutz e *C. phlebotomus* (Williston), e a outra do estuário do rio Pará, onde registraram 14 espécies, sendo *C. batesi* Wirth & Blanton a mais abundante; e *Leptoconops brasiliensis* (Lutz), que foi a única espécie comum a esses dois ambientes estudados.

2.2. WOLBACHIA

As bactérias *Wolbachia* são da classe Proteobacteria, ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae (Werren et al., 2008). Esta classe constitui o maior grupo taxonômico de bactérias e contém as espécies mais relevantes para a saúde de humanos, animais e plantas. Representa ainda o conjunto com maior diversidade metabólica e ecológica (Funke et al., 2005). Lefoulon et al. (2020) fizeram duas análises filogenômicas: uma utilizando 367 genes de 25 cepas de *Wolbachia* (que podem ser considerada um padrão de ouro para classificação de *Wolbachia*) e a outra de 160 genes que podem ser considerado uma análise muito robusta que permite inclusão de 49 cepas de *Wolbachia* e dessa forma permite reconhecimento de mais supergrupos de *Wolbachia*. (figuras 2 A e 2 B).

Como foi observada nas análises anteriores que usaram *multi locus sequence typing (MLST)* (Crainey et al., 2010), na análise de Lefoulon et al. (2020), supergrupos “A” e “B” só tinha artrópodes (figuras 2A e 2B); e as *Wolbachia* em supergrupos “C” e “D” todos pertencem em nematoides. Na análise filogenômica de 367 genes os supergrupos “E” e “F” são só representados com uma cepa de

Wolbachia (figura 2A), mas na análise filogenômica de 160 genes supergrupo “F” pode ser visto de incluir ambos *Wolbachia* que pertencem de nematoides e artrópodes.

(a) 101,894 amino-acid sites (367 single-copy orthogroups)

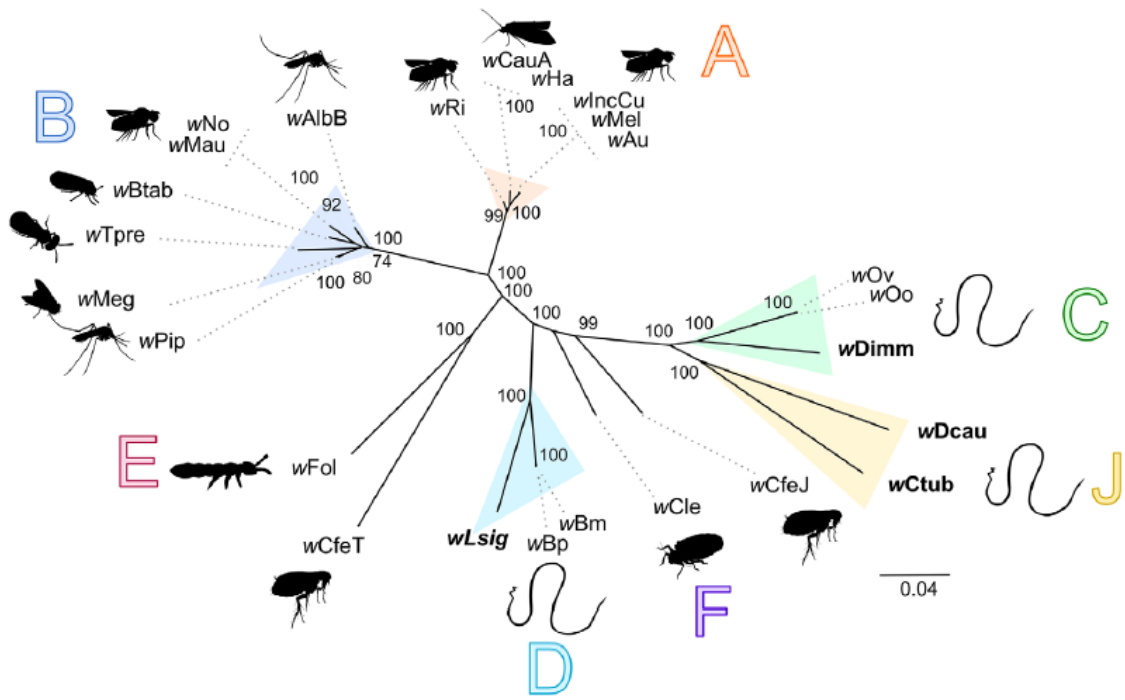


Figura 2A. Árvore filogenética dos supergrupos (A-F e J) de *Wolbachia* baseada na concatenação de seis genes. (Fonte: Lefoulon et al., 2020a)

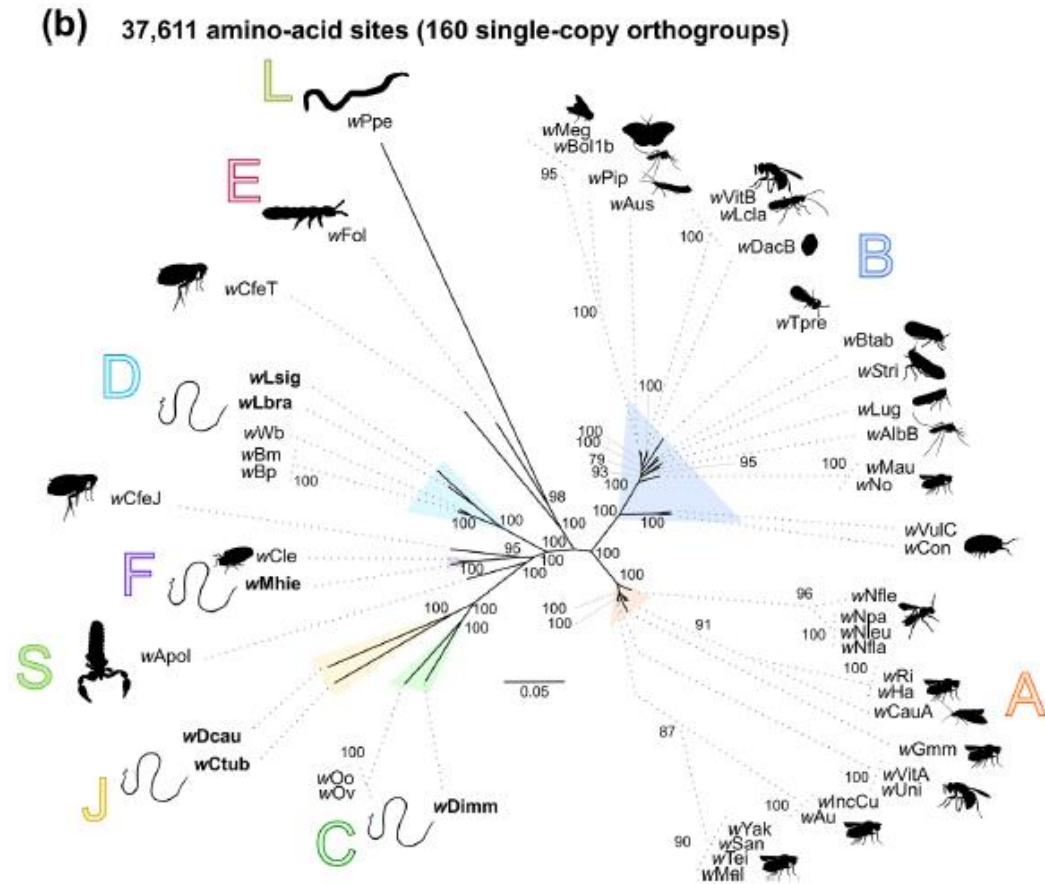


Figura 2B. Árvore filogenética dos supergrupos (A-F, J, L, S) de *Wolbachia* baseada na concatenação de 160 genes. (Fonte: Lefoulon et al., 2020b).

Wolbachia possui uma ampla gama de interações com seus hospedeiros que vão do mutualismo ao parasitismo (Werren et al. 1995). Nos artrópodes, as bactérias *Wolbachia* sp.se comportam geralmente como parasitas reprodutivos, tendo efeitos fenotípicos em seus hospedeiros (Werren et al. 2008).

A habilidade para garantir a própria sobrevivência deve-se, em parte, ao fato de manipular geneticamente seus hospedeiros artrópodos, produzindo fenótipos (figura 3) como: **incompatibilidade citoplasmática (IC)**, entre esperma e ovo, efeito mais frequentemente encontrado, o qual evita que machos infectados tenham sucesso no cruzamento com fêmeas que não são infectadas ou que não possuam o mesmo padrão de infecção por *Wolbachia* sp.; **partenogênese**, a qual elimina a participação dos machos na reprodução; **feminização**, resultado da transformação da prole de machos em fêmeas e **morte de machos**, onde em uma prole, os indivíduos competem pela vida, os machos infectados são eliminados e as fêmeas favorecidas (Clark, 2007; Werren; Baldo; Clark, 2008). Coletivamente esses fenótipos

são referidos como parasitismo reprodutivo e todos contribuem para o aumento de fêmeas infectadas e permanência do endossimbionte na natureza.

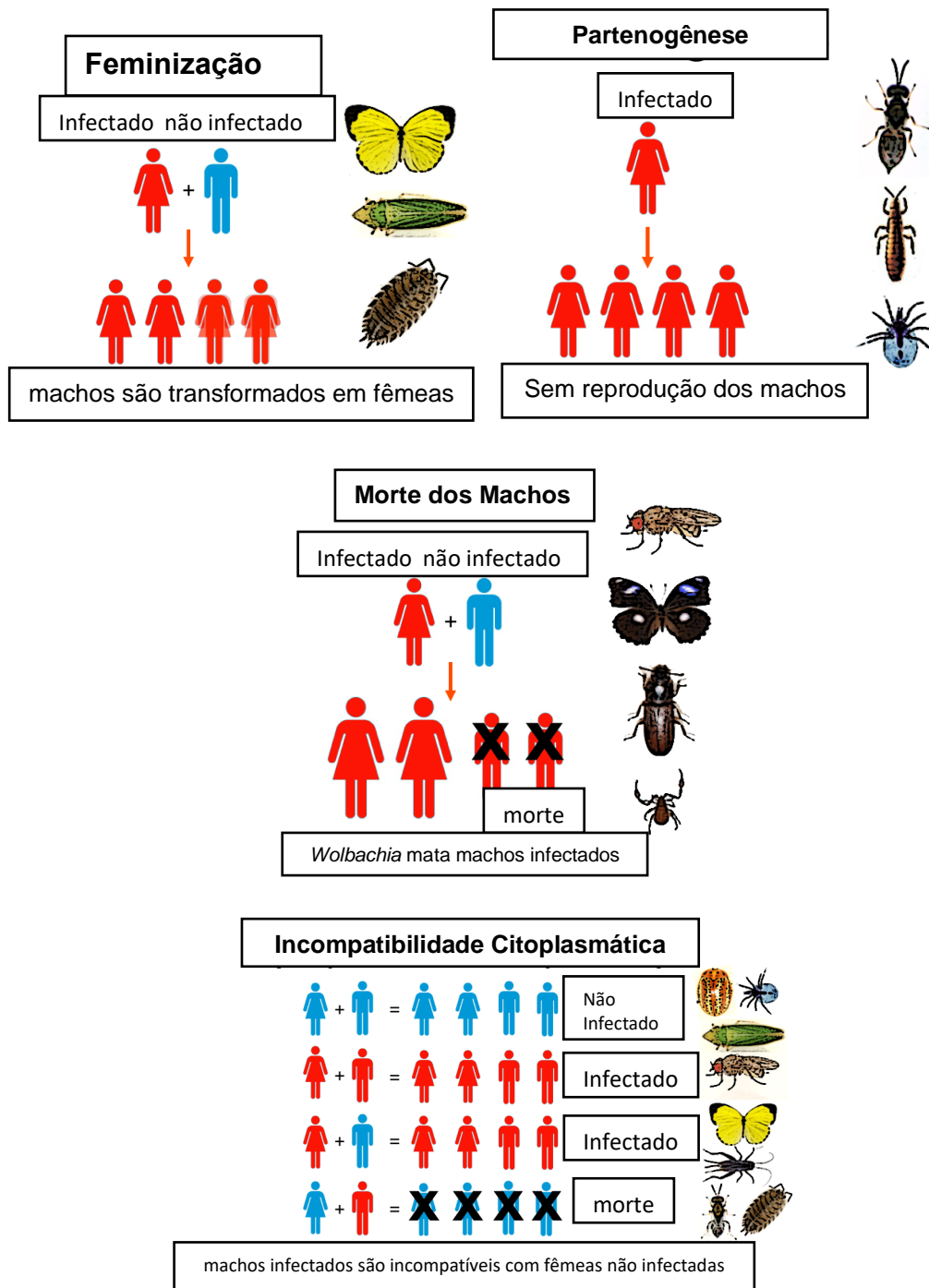


Figura 3: Fenótipos induzidos por *Wolbachia*. Nota: Quatro distintos fenótipos reprodutivos são observados em uma gama de ordens de artrópodos. Feminização (Hemiptera, Isopoda e Lepidoptera). Partenogênese (Acari, Hymenoptera e Thysanoptera). Morte de machos (Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Pseudoscorpione). Incompatibilidade citoplasmática (Acari, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isopoda, Lepidoptera e Orthoptera). Fonte: Googles

Dentre várias espécies de artrópodes encontraram uma variação ou muito alta (>90%) ou muito baixa (<10%) de indivíduos infectados. *Wolbachia* têm o potencial de modular os principais parâmetros da capacidade vetorial dos artrópodes. Então, a infecção com certas cepas de *Wolbachia* sp. pode levar a uma diminuição na sobrevivência dos artrópodes, como no *Aedes aegypti* (Mcmeniman et al., 2008).

A abordagem para controle de doenças veiculadas por insetos vetores que consiste na utilização da bactéria *Wolbachia pipientis*, como uma medida de diminuição ou bloqueio da transmissão de patógenos, tem sido amplamente utilizada contra *Dengue*, *Chikungunya*, *Plasmodium* e, mais recentemente, contra os vírus *Zika* e *Mayaro* (Bian et al., 2013, Dutra et al., 2016, Pereira et al., 2018). Nas últimas décadas, o endossimbionte *Wolbachia* sp. tem despertado o interesse nas pesquisas científicas, principalmente por causa da sua vasta abundância, dos efeitos diversos nos hospedeiros, que vão da manipulação reprodutiva ao mutualismo, e dos potenciais aplicações no controle de pragas e doenças transmitidas por vetores (Bourtzis 2008). Ghosh et al. (2019) conseguiram infectar duas linhagens celulares de *Culicoides sonorensis* (W3 e W8) com infecção por *Wolbachia* (walbB) de células doadoras de *Aedes albopictus* (Aa23) demonstrando que a capacidade de *Culicoides* pode ter utilidade de uso de *Wolbachia* para uma substituição populacional para limitar a transmissão de doenças vetorizadas por *C. sonorensis*.

Gomes et al. (2017) estudaram uma cepa *Wolbachia* de ocorrência natural (WAnga-Mali) que foi identificado em mosquitos de *Anopheles gambiae* e concluíram que a infecção por Ana-Mali não limita os estágios iniciais do *Plasmodium* de infecção do mosquito, mas tem um forte efeito sobre esporozoítos e reduz a transmissão da malária.

Estudos que detectaram a presença de endossimbiontes *Wolbachia* sp. em *Culicoides* foram feitos por Nakamura et al. (2009) na Ásia; Lewis et al. (2014) detectaram o mesmo endossimbionte em *Culicoides* no Reino Unido. Covey et al. (2019) detectaram infecções por *Wolbachia* em nove espécies de *Culicoides*. A presença de *Wolbachia* nas populações de *Culicoides* sugere a necessidade de mais investigações com uma estratégia para limitar a transmissão de doenças transmitidas por *Culicoides*.

A infecção natural pode causar um bloqueio no desenvolvimento dessa doença que é transmitida por *Wolbachia* nos artrópodes tendo um impacto

epidemiológico. Ainda não foi bem explorado esse assunto e no Brasil não temos estudos.

3. JUSTIFICATIVA

O potencial da *Wolbachia* como ferramenta para o controle de doenças já foi claramente demonstrado para os mosquitos (Caragata et al., 2021). *Aedes aegypti* artificialmente infectados com *Wolbachia* estão sendo usados para controlar doenças transmitidas no mundo todo (Caragata et al., 2021). Até agora, a *Wolbachia* nunca foi utilizada para controlar qualquer tipo de doença transmitida por insetos de família Ceratopogonidae, no entanto, trabalhos recentes de Gosh et al. (2019) demonstraram que infecções artificiais por *Wolbachia* podem ser estabelecidas em insetos dessa família. Os mesmos insetos da família Ceratopogonidae, artificialmente infectados com *Wolbachia* para o controle de doenças transmitido por esses artrópodes será claramente uma possibilidade no futuro próximo (Ghost et al., 2019).

Até recentemente, pouco se conhecia sobre infecções naturais em insetos de família Ceratopogonidae. Nos últimos sete anos várias novas cepas foram relatadas de diversas regiões de mundo (Covey et al., 2020; Ghosh et al., 2019 e Lewis et al., 2014). E especificamente na Amazônia Brasileira nunca houve um estudo investigando a presença dessas bactérias em insetos hematófagos. Como alguns desses insetos são envolvidos na transmissão de doenças humanas, como vírus Oropouche, a detecção natural de *Wolbachia* (que são conhecidos por serem capazes de afetar aspectos epidemiológicos importantes da biologia dos insetos hospedeiros) em maruins pode ajudar a entender a epidemiologia dos patógeno transmitida por esses insetos (Covey et al., 2020; Ghosh et al., 2019 e Lewis et al., 2014).

Neste estudo foi utilizado uma bateria de 17 ensaios de PCR para tentar detectar a *Wolbachia* em 15 espécies de Ceratopogonidae que picam os seres humanos na Amazônia brasileira. Algumas das espécies que testamos são conhecidas por terem um papel na transmissão de doenças humanas; todas as espécies têm o potencial de serem vetores de doenças infecciosas emergentes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Detectar e caracterizar *Wolbachia* sp. em ceratopogonídeos hematófagos amazônicos.

4.2 Objetivos Específicos

- Detectar *Wolbachia* em maruins (Culicoides e Leptoconops) hematófagos amazônicos usando um screening preliminar de 17 ensaios de PCR de baixa especificidade de 15 espécies de ceratopogonídeos
- Verificar a detecção de *Wolbachia* do screening preliminar com busca de BLAST
- Caracterizar sequências individuais de *Wolbachia* obtidos de screening em Culicoides e Leptoconops hematófagos amazônicos usando análises filogenéticas
- Caracterizar em detalhe novas cepas de *Wolbachia* isoladas de Culicoides e Leptoconops Amazônicos usando MLST

5. METODOLOGIA

5.1. Área de estudo e aspectos éticos

A parte laboratorial deste projeto foi realizada nas dependências da fundação Oswaldo Cruz/Instituto Leônidas e Maria Deane FIOCRUZ/ILMD utilizando espécies de Ceratopogonidae coletados no Pará e Amazonas. A captura desses vetores foi realizada com aprovação do SisBio (Licença permanente para coleta de material zoológico): Número: 12186-1. E o SISGEN Registro das espécies em processo.

5.2. Procedimentos

5.2.1 Coleta de insetos

As coletas já foram realizadas nos anos de 2016-2019, no período noturno em diferentes municípios da Amazônia brasileira: Oriximiná, Itaituba, Sapucaia, Nhamundá e Óbidos, Estado do Pará e no município de Presidente Figueiredo, Estado do Amazonas. Os insetos foram coletados nos seus habitats naturais, áreas florestais e em ambientes de peridomicílio usando armadilhas do tipo CDC luminosa, no horário de 18:00 às 06:00 e após capturados, foram inseridos em frascos contendo álcool absoluto e transportados para o laboratório aonde foram identificados.

A confecção do mapa incluindo os locais de coleta de maruins foi feito pelo programa Simple mapppr (<https://www.simplemapppr.net/>).

5.2.2 Identificação taxonômica

A identificação morfológica, dos *Culicoides* e *Leptoconops*, foi feita através de caracteres como disposição das manchas nas asas, comprimento e relação costal da asa, a relação do comprimento da probóscide/comprimento da cabeça, separação dos olhos, forma e relação palpal: comprimento do 3º segmento do palpo/largura do mesmo e variabilidade do órgão sensorial; comprimento dos segmentos flagelares e distribuição das fossetas sensoriais nos segmentos antenais; coloração do tórax e halteres; a coloração das patas, o comprimento dos segmentos tarsais e o número de cerdas no pente tibial; o número, comprimento e

forma das espermatecas da genitália feminina; e a forma da genitália masculina.

Utilizamos as chaves de identificação e classificação (Spinelli et al. 1993; Spinelli et al., 2005; Veras 2001 e Felipe-Bauer et al. 2009, 2013), e artigos com descrição de espécies (tabela 3 forneceu uma lista das 15 espécies de Ceratopogonidae hematófagas utilizados nesse estudo).

5.2.3 Extração de DNA

Os insetos inteiros foram macerados com pistilos estéreis e submetidos a extração de DNA utilizando o kit Dneasy® Blood and Tissue (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram identificadas e depois armazenadas em microtubos. Posteriormente, adicionados 180 µl de ALT e 20 µl de proteinase K, agitados e aquecidos em termobloco a 56° C (overnight de 18 horas e repouso de 5 minutos nas duas etapas finais antes da centrifugação) para lise completa das células. No dia seguinte, foram adicionados 200 µl de tampão AL e 200 µl de álcool absoluto. Todo o conteúdo dos microtubos foram transferidos para uma coluna mini spin e centrifugado a 8.000 rpm durante 2 minutos. Foram realizadas duas lavagens através da adição de 500 µl de tampão AW1 e AW2 com as respectivas centrifugações: 8.000 rpm (2 minutos) e 14.000 (4 minutos). Por fim, uma nova transferência de coluna e adição de 100 µl de água auto clavada com centrifugação a 8.000 rpm durante 2 minutos. Todos os extratos de DNA utilizados nesse estudo já foram testados para presença de DNA amplificado utilizando CO1 PCR. Para isso usamos 5µl de Extrato de DNA. O mesmo método foi utilizado para *pools* e para as espécies individuais.

5.2.4. Condição padrão de reação de PCR

Todas as PCRs para detecção das bactérias foram realizadas para um volume de reação de 50 µl, utilizando o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega, EUA), segundo as instruções do fabricante: 10 µl de tampão para PCRm [5x]; 0,5 µl de cada um dos primers em concentração de 100µM; 4 µl de MgCl₂ em concentração de 25mM; 1µl de DNTPs em concentração de 10mM; 0,2µl de GoTaq Polimerase em concentração de 5U/µL; 5µl de extratos de DNA de *Culicoides* e 28,8µl de água destilada estéril. Cada extrato de DNA de 15 espécies foi preparado

em *pools*. *Pools* foram compostos de 50 µl de extratos de DNA usando 15 indivíduos de cada espécie.

5.2.5. PCR screening para *Wolbachia* usando baixa temperatura de anelamento.

Iniciamos com uma seleção de sequências-alvo para detecção de *Wolbachia* sp., e escolhemos as que tinha utilidade taxonômica comprovada nas análises filogenéticas utilizada no protocolo padrão de *MLST* (Borderstein et al., 2009, Leles 2019 e Ferreira 2021). Ao total 17 ensaios de PCR foram aplicados utilizando um único protocolo de PCR (tabela 1) e reação de mix padrão (citada no 5.2.4). Todos os 17 ensaios foram “nested” PCRs com duas etapas de reação. A primeira reação de PCR projetada para amplificação de um fragmento de PCR entre ~600 e ~900pb em tamanho e a segunda projetada para amplificar um fragmento interno entre ~200 e 500pb em tamanho. A primeira amplificação amplificou produtos de PCR utilizando 5ul de extrato DNA de *Culicoides* e *Leptoconops*, a segunda reação amplificou produtos de PCR utilizando 2ul produto da primeira reação de PCR.

Na tabela 2 estão listadas as sequencias, primers e alvos utilizado para estes 17 ensaios. Os primers foram desenvolvidos por Leles (2019) e Ferreira (2021).

Tabela 1. Ciclagem para identificação de *Wolbachia* com técnica *MLST*

REAÇÃO	PROTOCOLO	
1 e 2*	95°C – 50 segundos	39 CICLOS
	50°C – 50 segundos	
	72°C – 1:10 minutos	
	72°C – 10 minutos	1 CICLO

*PCR tipo Nested realizado em 2 etapas. 1º PCR utilizando como amostra DNA extraído, 2º PCR utilizando como amostra amplicons provenientes da 1º reação

Tabela 2. Alvos e sequências iniciadoras analisadas para a detecção de *Wolbachia* sp. nas amostras de *Culicoides*. e *Leptoconops* .

ALVO	SEQUÊNCIA	Banda (pb)	Atuação
FtsZ	Ftsz_UNI_F1: GGAGCATATAAAAAGATAGTCAT	1° Ciclo:	Proteína de
	FtsZ_UNI_R1: ATCRATRCCAGTTGCAAG	~850pb	membrana para
	FtsZ_int_F2: CTTTTTCATCACGGCAGGAAT	2° Ciclo:	divisão celular
	FtsZ_int_R2: ATCTTCTCCCTCCGCTTCTC	~602pb	bacteriana
Wd0183	Wd0183_F1: C(R)AGGCTGGAGTTAGTCAGG	1° Ciclo:	proteína CcmE da
	Wd0183_R1:T(KS)(Y)ACC(M)ATTGCAAATTCA	~750pb	biogênese do
	Wd0183_INT_F2: TTTTTGCTTGG(Y)GGAGTAGT	2° Ciclo:	citocromo tipo C
	Wd0183_INT_R2: GACGTCA@TTCCGTTC(Y)TGT	~500pb	
CoxA	CoxA_F1: GCCCCATTTGAAGAGGTGTA	1° Ciclo:	
	CoxA_R1: TCGCTTTAGCGGTRCT(T/G)GCT	~850pb	Citocromo c oxidase
	CoxA_INT_F2: GTCGGGTATACGCCTT(A/G)GCA	2° Ciclo:	Subunidade 1
	CoxA_INT_R2:TTGGTCA(T/G)CC(T/G)GAAGTTTAC	~650pb	
DnaA	DnaA_F1: TCCAATACCAGGMAAGCAACC	1° Ciclo:	
	DnaA_R1: CTTACAAGACCRCGAAGCCT	~730pb	ATPase iniciadora da
	DnaA_F2:TCTCCTAGYGATCTTGATGGA	2° Ciclo:	replicação
	DnaA_R2: GGARTGCATATCYGCGCWACTTTT	~375pb	
FabK	FabK_F1:TTGGCRTAATTGCATGTKGT	1° Ciclo:	
	FabK_R1: CTTTGGCCTGCCATTAAGA	~780pb	Trans-2-enoil-ACP
	FabK_F2:GGYGGRYTACCGACAAAACC	2° Ciclo:	redutase fabK
	FabK_R2: TGGAATTACAGGAAAATCAGMA	~420pb	

	NouG_F1:TAA(Y)GGATCTTGACCGATGA	1° Ciclo:	
NouG	NouG_R1: TT(Y)GGGCCACTTATTGAAAC	~940pb	Subunidade gama da
	NouG_F2:GCATT(Y)TCTAT@CCCT(S)A(RY)	2° Ciclo:	NADH desidrogenase
	NouG_R2: GTGGGAAGTGCGATCAGAGT	~410pb	
	NuoD_F1:TTGGAGCGATRACTCCTCTT	1° Ciclo:	
NuoD	NuoD_R1: GCAAGCATGTG(Y)CCTTTT	~750pb	Subunidade I D de
	NuoD_INT_F2:TATTAGGCCAGGTGGAGTGG	2° Ciclo:	NADH desidrogenase
	NuoD_INT_R2: GTTTTCATCTC(Y)GCTCTTGG	~440pb	
	PhB_F1:CGAAAGGATTGCTGAAGGAG	1° Ciclo:	Subunidade beta da
PdhB	PhB_R1:ACCCTCTTCTACGCTGACCA	~680pb	piruvato
	PhB_INT_F2:GGATTTGCTGGTCTTGCTGT	2° Ciclo:	desidrogenase do
	PhB_INT_R2:TT(R)CATC(Y)TTTCCTTC(Y)CGT	~400pb	complexo E1
	SucB_F1:TTGCGGAGGGTTTAT(K)ATCG	1° Ciclo:	2-oxoglutarato
SucB	SucB_R1:CTGACAAAACAGCGCTTGAA	~850pb	desidrogenase E2
	SucB_INT_F2:TC(R)GCACTCCGAATAACCGG	2° Ciclo:	componente
	SucB_INT_R2:GCTGAACA(R)CCTGC(R)GT(RR)A	~400pb	dihidrolipoamida succiniltransferase
	NadH_F1:GGTGTACATTGCCCACATGA	1° Ciclo:	
NadH	NadH_R1:TCTGGCTGGAAGAGCAAAC	~720pb	
	NadH_INT_F2:AAGACCCGCGTATCAC	2° Ciclo:	Desidrogenase
	NadH_INT_R2:GCCTGTAAATCGGGCTATGA	~400pb	
	HcpA_F1:TCTCAAAAATTTACGAAGCTCAT	1° Ciclo:	
HcpA	HcpA_R1:GCTCTTCGACCAATGCAGAT	~600pb	proteina não
	HcpA_INT_F2:ATCCACGTCTTCGTTCTGCT	2° Ciclo:	caracterizada
	HcpA_INT_R2:GCATCACGCACTTTACCAAA	~420pb	

	Wd0237_F1:GAATGCTCGACATTGGGTTT	1° Ciclo:	
Wd0237	Wd0237_R1:GGCTGGATCCAAGTG(R)TAAA	~900pb	Transposase não
	Wd0237_INT_F2:TCAGGCTGCAAATTTTTC	2° Ciclo:	caracterizada
	Wd0237_INT_R2:AATTGGTTTGGTTTCGCTGA	~440pb	
	Wd1005_F1:GGTAGCGGCACTTCAAGAAA	1° Ciclo:	
Wd1005	Wd1005_R1:CAGCGTATAAGCTCTCCAACC	~800pb	Proteína hipotética
	Wd1005_INT_F2:TGATG(Y)GCTGGAGAG(R)TATG	2° Ciclo:	
	Wd1005_INT_R2:AGATTGTGTAGCGGGCAAGT	~400pb	
	Wd0198_F1:TGGTCTCACGGAATTTCTCC	1° Ciclo:	fator de alongamento
Wd0198	Wd0198_R1:TTCCGGCTAACCCCTAACGAA	~600pb	da tradução FusA
	Wd0198_INT_F2:CCTCAAGGTAAAGGCCACAA	2° Ciclo:	GTPase
	Wd0198_INT_R2:CTGTAGCAACACGTGCCATT	~480pb	
	AspC_F1:AAGCCATCACCTACGATTGC	1° Ciclo:	
AspC	AspC_R1:A(Y)TCTCCAGCCTGTCAT(Y)GC	~700pb	Proteína não
	AspC_INT_F2:GCGTTTTAGCTGCAGGAGAG	2° Ciclo:	caracterizada
	AspC_INT_R2:CGTG(R)GGATATTC(M)AGCAAT	~480pb	
	AspS_F1:CCGGAGTCGAGGTGATA	1° Ciclo:	
AspS	AspS_R1:ATC(Y)CC@GGCTCT(R)T(R)TTCCG	~920pb	aspartil-tRNA
	AspS_INT_F2:AAAGTGTTGCGCAAATTTTCTC	2° Ciclo:	sinetase
	AspS_INT_R2:GAAGCT(K)CGTGGTTCCTCT(K)	~250pb	
	AtpD_F1:TCCCCATTTTCAGCTATTTGC	1° Ciclo:	
AtpD	AtpD_R1:TGAGTGTGGT(Y)CGCTGAAAG	~730pb	ATP sintase
	AtpD_INT_F2:GTTGCAGGAGCTGGATCAGT	2° Ciclo:	subunidade B
	AtpD_INT_R2:AGA(R)AG(R)ACGCGTGAAGGTA	~400pb	

5.2.6. Eletroforese

Os produtos de PCR foram analisados usando eletroforese em géis de agarose de 1% em tampão TAE. A eletroforese foi realizada em cubas horizontais

contendo solução TAE1x como tampão de corrida dos quais foram feitas em 30 minutos. Os géis foram corados com o GelRed, os quais foram visualizados em um transiluminador (UV 302nm T26M). (veja no anexo 1 figuras 7,8,9,10,11,12,13 e 14).

5.2.7. Purificação de produtos de PCR e sequenciamento de Sanger

Os produtos de PCRs que apresentaram banda única e tamanho conforme esperado foram purificadas através do kit QIAquick PCR Purification. As amostras selecionadas foram sequenciadas pelo método Sanger na Plataforma Genômica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FioCruz) utilizando o kit BigDye Terminator v3.1. Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados com EDTA/Etanol, seguindo o protocolo de Platt (2007), com modificações; por fim, foram sequenciados em ambas direções (senso e antisenso) no sequenciador automático DNA ABI PRIM 3130xl (Applied Biosystems).

5.2.8. Análise preliminar de sequências de DNA

As sequências de DNA obtidas da reação de sequenciamento Sanger foram extraídas dos seus cromatogramas no formato FASTA utilizando o programa *Chromas lite*. Sequências senso e antisenso foram alinhadas utilizando o programa *ClustalX* (versão 2.1) e utilizadas para formação de fita consenso no programa *GenDoc* (versão 2.7). As fitas consenso foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados Genbank utilizando os programas *BLASTn* e *BLASTx*. As sequências consenso com melhor correspondência com sequências de *Wolbachia* sp. foram alinhadas junto a 25 sequências de genes ortólogo recuperadas do banco de dados Genbank para análise filogenética.

5.2.9. Análise filogenética de genes de *Wolbachia* sp.

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando oito sequências de *Wolbachia* sp. obtidas deste estudo. Ao total, 10 árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança foram criadas a partir de dez alinhamentos gerados, sendo três árvores filogenéticas baseadas em *MLST* (genes concatenados) e sete árvores

utilizando as sequências individuais de cada gene.

A árvore filogenética construída utilizando o gene de *Wolbachia* sp. *nouG* contém sequências isoladas das espécies *Culicoides pseudodiabolicus* e *Culicoides phlebotomus* genes ortólogos de 25 linhagens de *Wolbachia* sp. com sequências completas disponíveis no banco de dados Genbank. As seis árvores filogenéticas restantes utilizando genes individuais, foram construídas utilizando uma única sequência de *Wolbachia* sp. alinhada as 25 sequências ortólogos de mesmas cepas de *Wolbachia* que foram utilizados na análise de gene *nouG*. As três árvores filogenéticas *MLST* construídas a partir da concatenação das sequências de múltiplos genes também incluíram a concatenação dos genes ortólogos obtidos das mesmas 25 cepas de *Wolbachia* para análise de Lefound et al., (2020) (veja na figura 2).

As 10 árvores filogenéticas deste estudo foram construídas a partir do alinhamento feitas usando o programa ClustalX (versão 2.1). As árvores foram construídas no método de Máxima Verossimilhança no programa *dnaml* do pacote de programas *PHYLP* (versão 3.698). A robustez dos grupos filogenéticos foi avaliada por análise de *bootstrap* utilizando o programa *seqboot* (pacote *Phylip*) que produção de 1000 réplicas por cada alinhamentos. Foram utilizado o programa *Consense* (pacote *Phylip*) para gerar uma árvore de consenso das 1000 árvores produzidas com as réplicas de alinhamento. Para visualização das árvores geradas foram utilizados dois programas *treeview* (versão 1.4.4) e *FigTree* (versão 1.4.4).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 O isolamento de sequências de *Wolbachia* sp. a partir de três espécies diferentes de *Culicoides* spp.

Embora a triagem inicial de PCR para *MLST* de 15 espécies (veja no anexo 2 tabela 3) de Ceratopogonidae tenha gerado um total de 46 amplicons de 13 das 15 espécies, após a análise de BLAST com das sequências, ficou aparente que apenas oito desses produtos de PCR eram de genes de *Wolbachia* sp. A maioria dos produtos de PCR restantes não gerou leituras com sequências de qualidade suficiente para que sua origem pudesse ser determinada. No entanto, os produtos que geraram sequências com qualidade razoável, mostraram evidências de

amplificação não específica. Algumas das sequências amplificaram, por exemplo, a sequência genômica associada a “*Culicoides sonorensis*”, que atualmente é objeto de um projeto de genoma (Gosh et al., 2019). Uma provável sequência do gene da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) de origem fúngica também foi amplificada de forma não específica.

Apenas 17% dos produtos de PCR (8/46) selecionados para sequenciamento foram confirmados como derivados de sequências de *Wolbachia* sp., esse resultado não foi inesperado dadas as baixas temperaturas de anelamento usadas nos protocolos de PCR aplicados para triagem de alvos de *Wolbachia* sp. baseado em *MLST* neste estudo (Lefoulon et. al. 2020). Como essa abordagem foi deliberadamente desenhada para maximizar a possibilidade de amplificação de sequências de *Wolbachia* sp., o fato de haver amplificação não específica pode ser interpretado como evidência de que esses protocolos estavam de fato alcançando o objetivo de não serem excessivamente específicos. Dado que minha PCR screening testou a presença de 17 genes e o fato de todas as espécies positivas terem sido positivas com mais do que um alvo, os resultados obtidos sugerem fortemente que as 13 espécies que testaram negativo no screening são realmente negativas para *Wolbachia*. Esta observação é particularmente importante para as espécies *C. insignis*, *C. foxi* e *C. paraensis* que tem importância médica e, portanto, poderiam ser alvos de programas de controle baseados em *Wolbachia*. Embora, em teoria seja possível introduzir infecções artificiais de *Wolbachia* em vetores que já apresentam infecções naturais, isso ainda não foi comprovado (Caragata et al 2021). Até o momento, todos os programas de controle de doenças que usam a *Wolbachia* para reduzir a transmissão da doença têm como alvo as espécies de vetores que não estão naturalmente infectadas com a *Wolbachia* (Caragata et al 2021). Então, resultados obtidos nesse estudo apoiam a possível utilização dessa tecnologia para controle de doenças que esses vetores transmitem.

6.2 Classificação molecular de uma nova cepa de *Wolbachia* sp. (wCphI) de *Culicoides phlebotomus*

Consistente com a hipótese de que todos os quatro genes amplificados de *C. phlebotomus*, pertençam de uma única cepa de *Wolbachia* sp. infectando dessa

mesma espécie, todas as quatro árvores construídas com genes individuais colocaram o *C. phlebotomus* no supergrupo filogenético B de *Wolbachia* sp. (veja o anexo 3, figura 14,15,16 e 17). Ambas as árvores filogenéticas dos genes *dnaA* e *aspC*, (figura 4) criam os mesmos super agrupamentos filogenéticos produzidos pela análise filogenômica de Lefoulon et. al. (2020) com alto suporte de *bootstrap*. Além disso, em ambas as árvores, os genes de *Wolbachia* recuperados por esse estudo podem ser visto como agrupado com supergrupo B. Embora o super agrupamento de *nouG* e *WD 0198* (analisados individualmente) não sejam idênticos aos de Lefoulon et. al., (2020) e, portanto, essas classificações filogenéticas não podem ser consideradas confiáveis como aquelas para *dnaA* e *aspC*), ambas as árvores colocam claramente as sequências recuperada por esse estudo em supergrupo B de *Wolbachia* sp. Então toda essa análise de genes individuais surgiu fortemente em *C. phlebotomus* que está infectado com uma cepa de *Wolbachia* que pertence ao supergrupo B e que é a partir desse momento é chamado de wCphl.

A Figura 4 mostra uma árvore representativa de Máxima Verossimilhança construída a partir de um alinhamento concatenado de quatro sequências de genes de wCphl. (*nouG*, *dnaA*, *aspC* e *WD 0198*). As classificações filogenéticas do supergrupo (A-F e G) que foram produzidas na análise filogenômica de Lefoulon et al. (2020) podem ser vistas nesta figura. É importante notar que todo esse agrupamento de supergrupos é altamente suportado com análise de *bootstrap* que significa essa classificação de *MLST* pode ser considerada muito robusta. Ainda mais importante de se notar que essa análise de *MLST* coloca wCphl em supergrupo B com alto suporte de *bootstrap*.

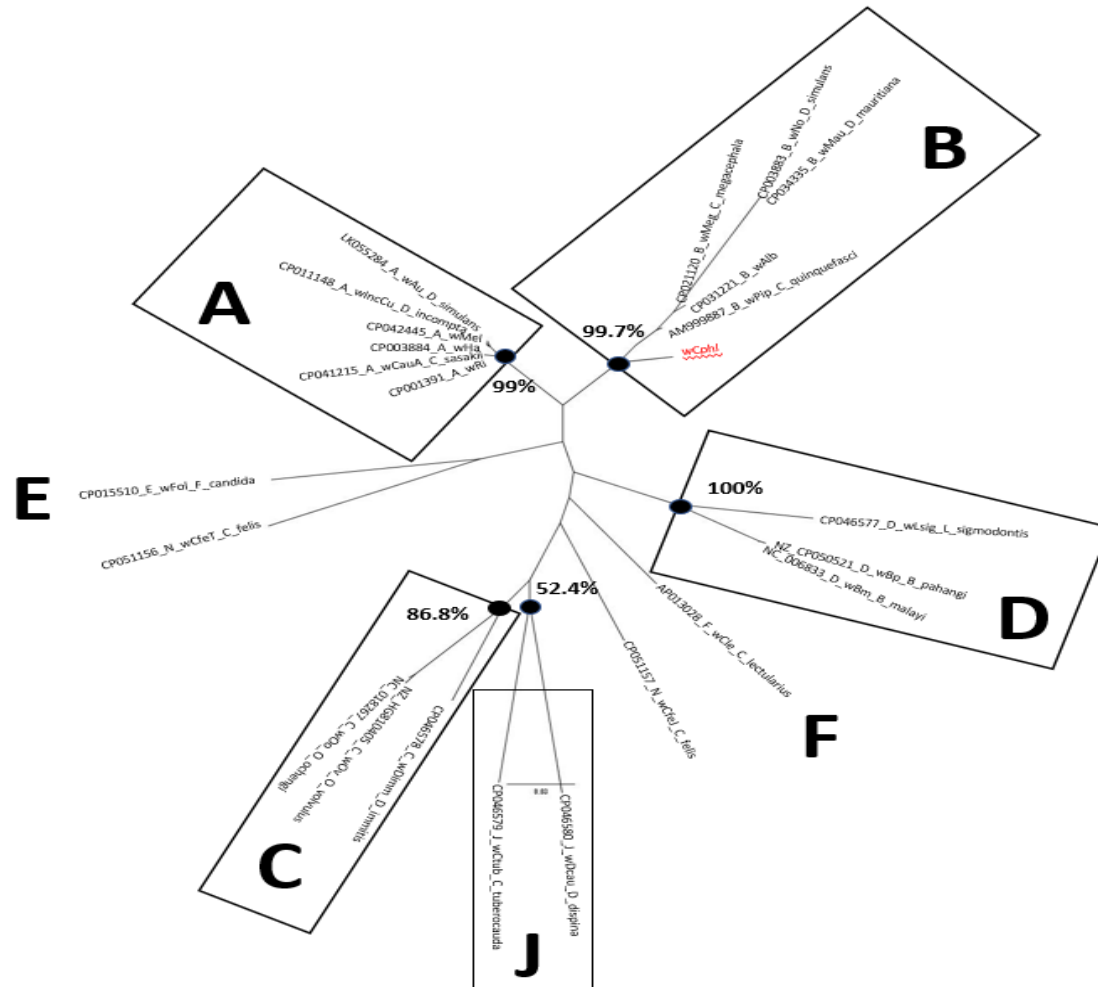


Figura 4 Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de *bootstrap* para sequência-alvos concatenadas de *Wolbachia* sp. de *C. phlebotomus* (genes *nouG*, *dnaA*, *aspC* e *WD 0198*). Em vermelho: agrupamento da nova cepa encontrada

Embora o *C. phlebotomus* usado para este trabalho incluía fêmeas adultas capturadas na natureza que podem estar infectados com parasitas filariais, não é provável que qualquer uma das sequências de wCphl isoladas para este estudo derivam de um parasita filarial. Até o momento, *Wolbachia* de supergrupo “B” só foi encontrado infectando artrópodes então apesar do fato que *Wolbachia* também pode infectar parasitas filariais, não é muito provável que wCphl pertençam de um parasita filária (Lefoulon et. al. 2020). Na verdade, podemos ter quase certeza que wCphl pertença *C. phlebotomus*. Apesar de ser interessante testar o *C. phlebotomus* para a presença de parasitas filariais, para descartar a possibilidade de infecção por filárias, na realidade será mais produtivo que os trabalhos futuros se concentrem na determinação da prevalência desta wCphl nas populações de *C. phlebotomus*. Como este trabalho mostrou que os protocolos de PCR para *dnaA*, *aspC*, *nouG* e *WD 0198*, usados neste estudo, amplificam satisfatoriamente wCphl, um ou uma combinação desses protocolos de PCR poderiam ser usados para avaliar a prevalência em populações de *C. phlebotomus*.

6.3 Classificação molecular de uma nova cepa de *Wolbachia* sp. (wCleo) isolada de *Culicoides leopoldoi*

A árvore filogenética da figura 5 foi construída utilizando duas sequências de genes de *Wolbachia* sp. (*atpD* e *coxA*) amplificados a partir de extrato de DNA de *Culicoides leopoldoi*. Tal como acontece com a árvore filogenética *MLST* produzida para a classificação de wCphl (figura 5), a árvore *MLST* produzida para classificar as sequências de *Wolbachia* sp. de *C. leopoldoi* (presumindo-se que derivem da mesma cepa de *Wolbachia* sp. denominada para este vetor como wCleo) reproduziu supergrupos A-D em clados suportados por *bootstrap* apoiando que esta árvore construída com dois genes fornece uma abordagem confiável para classificar esta nova cepa de *Wolbachia* sp. É importante ressaltar que a árvore produzida para wCleo coloca a sequência desses dois genes concatenados no supergrupo B, em contraste com a cepa wCphl que forma um grupo externo as outras cepas do supergrupo B e, portanto, parece ser uma cepa do supergrupo B basal ancestral as demais cepas de *Wolbachia* sp. deste supergrupo, desta forma, é observado que a cepa wCleo está se agrupando com as demais cepas de *Wolbachia* sp. do supergrupo B, mais especificamente próximo das cepas de *Wolbachia* sp. de *Culex pipiens* e *Chrysomya megacephala*.

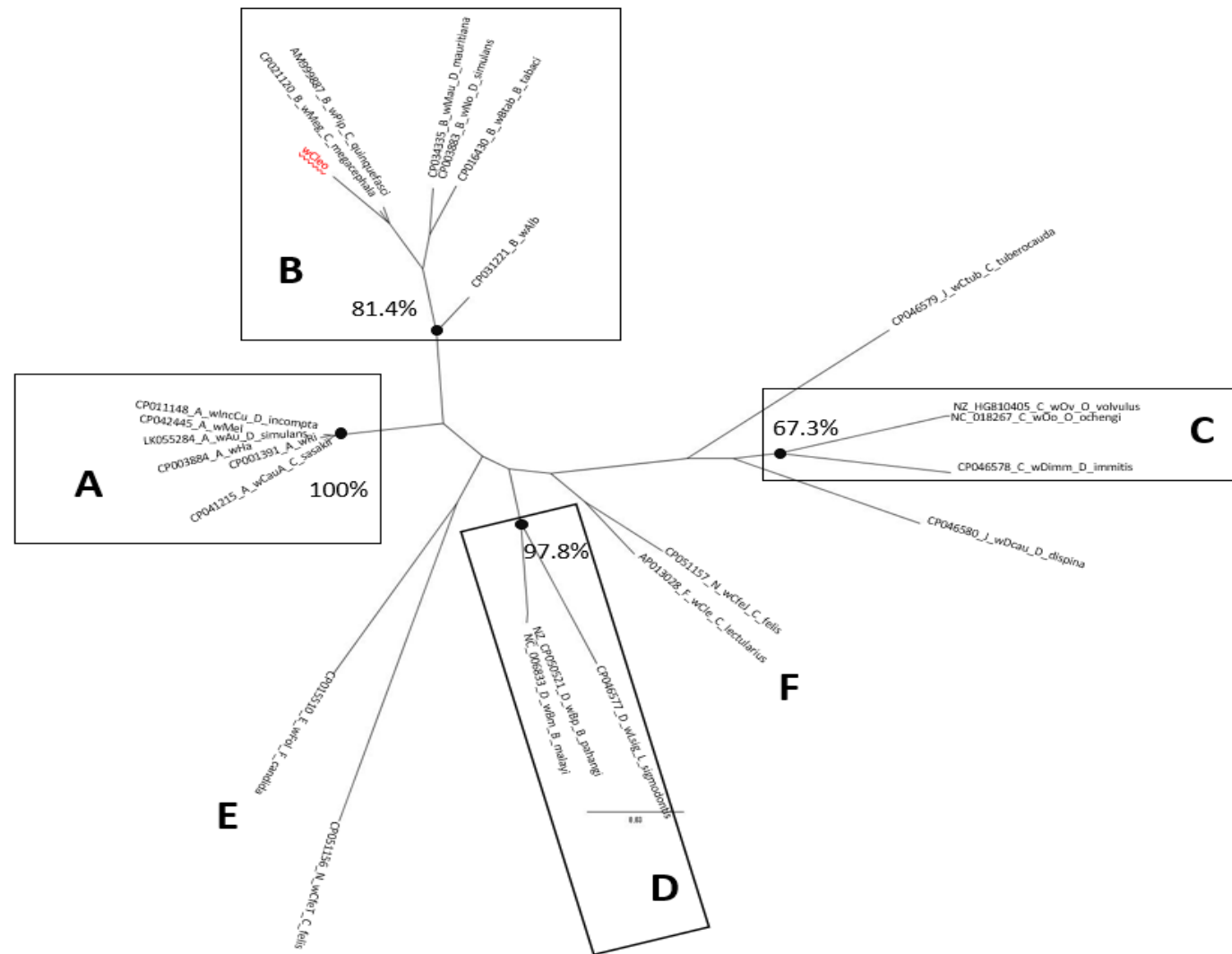


Figura 5 Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de *bootstrap* para sequência-alvos concatenadas de *Wolbachia* sp. de *C. leopoldoi* (genes *atpD* e *coxA*). Em vermelho: agrupamento da nova cepa encontrada

A análise de *MLST* com as sequências concatenadas de *wCphI* é consistente com a análise filogenética dos genes individuais de *Wolbachia* sp. isoladas de *C. leopoldoi*. Pode-se observar nas figuras suplementares 19 e 20, que ambas as sequências de *wCleo* estão agrupadas em grupos monofiléticos do supergrupo B com suporte de *bootstrap* >80. É importante destacar que embora o extrato de DNA usado para obter as sequências *wCleo* e *wCphI* possam ter sido obtidas de espécies de vida selvagem é improvável que estas cepas de *Wolbachia* sp. derivem de parasitas filariais, pois, para construção de todas as árvores deste estudo foram inclusas sequências de *Wolbachia* sp. de filárias que se agruparam em outros supergrupos distantes das cepas de *wCleo* e *wCphI*. Portanto, os dados gerados sugerem que ambos *C. leopoldoi* e *C. phlebotomus* estão infectados com *Wolbachia* sp. do supergrupo B, mas sendo duas sublinhagens distintas.

6.4 Classificação molecular de uma nova cepa de *Wolbachia* sp. (*wCpse*) isolada de *Culicoides pseudodiabolicus*

A Figura 6 mostra uma árvore filogenética de *MLST* que foi construída a partir de um concatenado de duas sequências de genes de *Wolbachia* sp. (*ftsZ* e *nouG*) amplificadas a partir de extrato de DNA de *Culicoides pseudodiabolicus*. Presumindo-se que essas sequências dos genes *ftsZ* e *nouG* derivem de uma única cepa de *Wolbachia* sp., esta foi denominada para *C. pseudodiabolicus* como *wCpse*. (Crainey et. al. 2010). Como todas as árvores filogenéticas *MLST* construídas para este estudo, a árvore na figura 6 foi construída a partir de um alinhamento usando as mesmas cepas de *Wolbachia* sp. de referência utilizadas na análise filogenômica de Lefoulon et. al. (2020), que pode ser considerada como o padrão-ouro de classificação da cepa *Wolbachia* sp. como já citado anteriormente. Assim como as outras análises *MLST* realizadas neste estudo, os agrupamentos filogenéticos produzidos com o alinhamento das sequências do gene *ftsZ* e *nouG* podem ser vistos como quase idênticos aos produzidos na análise filogenômica de Lefoulon et. al., (2020) e, portanto, esta análise pode ser vista como uma classificação confiável da cepa derivada de *C. pseudodiabolicus*, *wCpse*.

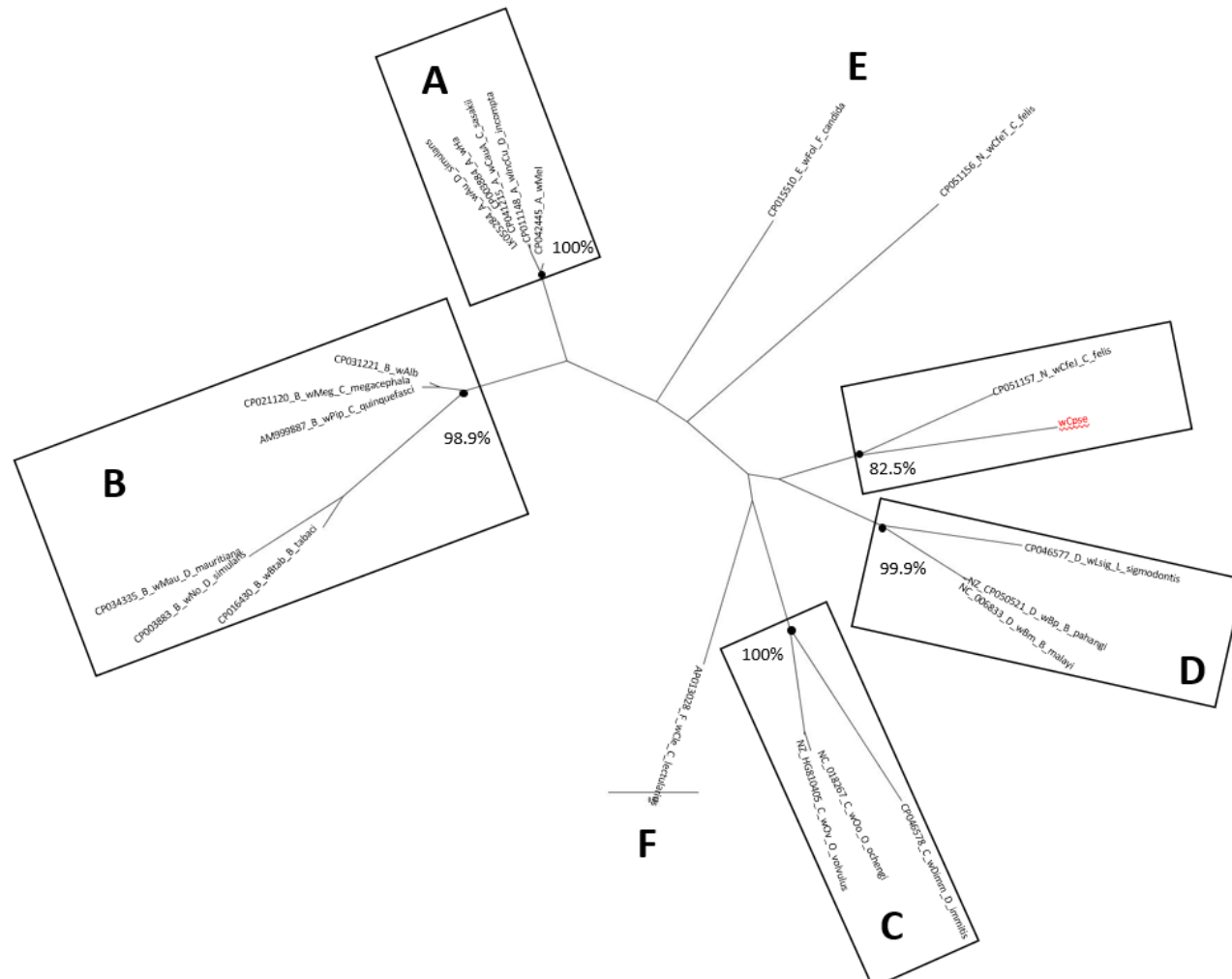


Figura 6. Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de *bootstrap* para sequência-alvos concatenadas de *Wolbachia* sp. de *C. pseudodiabolicus* (genes *ftsZ* e *nouG*). Em vermelho: agrupamento da nova cepa encontrada

No entanto, a classificação molecular de wCpse tanto na análise de gene individual quanto na análise de genes concatenados de *MLST* não inclui essa cepa de *Wolbachia* sp. em nenhum supergrupo de *Wolbachia* sp. conhecido (Lefoulon et al. 2020). Na análise *MLST*, esta cepa aparece em um cluster altamente suportado por *bootstrap* junto a cepa wCfeJ, que foi recentemente descrita na espécie *Ctenocephalides felis*, uma espécie de pulga de gato (Driscoll et al., 2020). Na análise filogenética de Lefoulon et al. (2020) observou-se que a cepa wCfeJ não pertence a nenhum dos supergrupos de *Wolbachia* sp. existentes. Embora as árvores filogenéticas individuais de *ftsZ* e *nouG* (figura 6) não forneçam prova incontestável dessa teoria de que esta cepa não está incluída em nenhum supergrupo, os resultados obtidos neste estudo reforçam essa hipótese. Na figura 14, por exemplo, a sequência *nouG* de wCpse pode ser vista agrupando-se em um grupo suportado por *bootstrap* com wCfeJ e, embora a análise filogenética do gene *ftsZ* não agrupe a cepa wCpse com wCfeJ, também não a coloca dentro de um supergrupo conhecido (Driscoll et al., 2020). É importante ressaltar que o posicionamento filogenético de *ftsZ* de wCpse não é suportado por *bootstrap*, o que significa que este posicionamento do gene não pode ser considerado confiável. Assim, embora o posicionamento filogenético de wCpse como um parente próximo de wCfeJ possa ser considerado como suportado, esse posicionamento não é tão robusto quanto os posicionamentos de wCleo e wCphl (Driscoll et al., 2020).

Embora o parente mais próximo de wCpse derive de um hospedeiro artrópode, a possibilidade de que wCpse derive de um parasita filarial, embora improvável, é mais difícil de descartar do que para wCleo e wCphl. Como as outras duas cepas de *Wolbachia* sp. descobertas para este estudo, wCpse foi amplificado a partir de DNA extraído de um grupo de *Culicoides* capturados na natureza que incluía espécimes femininos que poderiam, em teoria, estar infectados com um parasita filarial. Embora a maioria das cepas de *Wolbachia* sp. pertençam a supergrupos exclusivos de artrópodes ou de parasitas filariais, as cepas de *Wolbachia* sp. do supergrupo F podem ser encontradas infectando tanto artrópodes quanto parasitas filariais o que põe a classificação filogenética de wCpse em dúvida. Até o momento, nenhum parasita filarial foi registrado infectando *Culicoides pseudodiabolicus*, tendo em vista que os *Culicoides* são conhecidos por serem vetores de uma variedade de parasitas filariais e, portanto, a possibilidade de que os espécimes usados para este estudo estivessem infectados não pode ser completamente descartada (Trindade &

Gorayeb, 2005, 2010).

PCR com primers degenerados são capazes de detectar uma variedade de parasitas filariais, como os descritos em Tang et al. (2010) e Lefoulon et al. (2015), e poderiam ser utilizados para testar o DNA usado neste estudo a fim de investigar essa possibilidade, no entanto, mesmo que uma série de testes se mostrem negativos, a possibilidade de que essas sequências de *Wolbachia* sp. gerem falso negativas não pode ser descartada. Realizar ensaios de PCR com os extratos de DNA de wCpse em amostras de larvas (que não podem ser infectadas por parasitas filariais) seria, no entanto, suficiente para provar que essas sequências de *Wolbachia* sp. não vêm de parasitas filariais e, portanto, quase certamente estariam infectando *Culicoides pseudodiabolicus*.

Como as sequências de *Wolbachia* sp. isoladas de *Culicoides pseudodiabolicus* parecem pertencer a um potencial novo supergrupo filogenético de *Wolbachia* sp., pode-se argumentar que, investigar a cepa wCpse com mais profundidade no momento, é mais relevante do que investigar as outras duas cepas caracterizadas neste estudo. Um primeiro passo para uma investigação mais aprofundada desta cepa envolveria mais ensaios de PCR para tentar amplificar outras sequências do gene de *Wolbachia* sp. a partir do extrato de DNA utilizado inicialmente para este estudo, a fim de verificar se outras sequências possivelmente recuperadas de *Culicoides pseudodiabolicus* também se agrupariam filogeneticamente com o wCfeJ. Esse resultado poderia ser alcançado com a utilização de outras técnicas de amplificação como PCR touchdown ou gradiente utilizando o DNA de insetos individuais para amplificação dos genes *nouG* e *ftsZ*, e ainda, seria válido investigar também a prevalência dessas possíveis cepas em populações de *C. pseudodiabolicus*. Usando essas abordagens Leles (2019) conseguiu amplificar todos os alvos de *Wolbachia* que foram alvos desse estudo.

Das três cepas de *Wolbachia* sp. resultantes deste estudo, a cepa wCpse apresenta a maior relevância para novas abordagens que visem o sequenciamento do seu genoma completo. Além do fato de que numerosas cepas de *Wolbachia* sp. do supergrupo B já tiveram seus genomas completos sequenciados, o genoma de wCfeJ parece ser diferente de outros genomas de *Wolbachia* sp. e, portanto, seria válido verificar se wCpse compartilha algumas das mesmas características moleculares. Foi proposto, por exemplo, que a cepa wCfeJ adquiriu recentemente um operon de síntese de biotina de micróbios intracelulares obrigatórios (BOOM) e, (Driscoll et al.,

2020). Portanto, seria interessante ver se wCpse também possui este operon e, se o adquiriu recentemente, podendo essa possibilidade ser investigada também através de novos ensaios de PCR.

Foram realizadas em 15 espécies descrita no anexo 2 da tabela 3. Para o nosso trabalho podemos dizer que as 13 espécies que não demonstrarão a presença de *Wolbachia*, possa ter ocorrido devido a utilização de baixa temperatura de anelamento. Já as espécies selecionadas de importâncias médicas, *C. insignis*, *C. foxi* e *C. paraensis* não foi detectada com *Wolbachia* na população Amazônica, estudos comprovam que em outros Pais existem *Wolbachia* (Rêbello et. Al. 2016, Trindade & Gorayeb, 2005, 2010). *Culicoides* tem uma importância para a saúde pública tanto para os seres humanos como para os animais devido a sua transmissão de doenças, que são descritas mais de 50 vírus mundialmente. As três cepas que foram identificadas e caracterizadas não são de importâncias medicas, porem afetam os animais.

Pois existem poucos trabalhos realizados na Amazônia que focam a antropofília dos maruins (Trindade et al., 2010) Das 15 espécies identificadas neste estudo, algumas delas possuem comportamento antropofílico: *C. foxi*; *C. fusipalpis*; *C. insignis*; *C. paraenses*; *C. paraignacioi*; *C. pseudodiabolicus* e *C. leopoldoi* (Aitken et al., 1975; Bermúdez, 1986; Castellon, et al., 1991; Trindade & Gorayeb, 2005, 2010).

7. CONCLUSÕES

Portanto a abordagem de PCR screening é útil, pois testou-se com 17 alvos sendo que sete alvos diferentes deram positivo em 15 espécies e 13 deram negativas para *Wolbachia*. As espécies de *C. insignis*, *C. foxi* e *C. paraensis* são de importância medica.

Desta forma, quatro genes amplificados de *C. phlebotomus* pertencem a um único gene de *Wolbachia*, colococando *C. phlebotomus* no supergrupo filogenético B. Já os *Culicoide leopoldoi* foi amplificado usando alvos de *atpD* e *coxA*, que pertencem ao supergrupo B. E por fim *Culicoides pseudodiabolicus* foi amplificado usando alvos de *ftsZ* e *nouG* e presumimos que a cepa de wCpse não inclui a cepa de *Wolbachia* em nenhum supergrupo de *Wolbachia* conhecido, está próxima da cepa wCfeJ.

Ressaltamos que essa abordagem para detecção de *Wolbachia* ajudará muito no controle de doenças transmitidas por esses vetores. E esse trabalho tem a

importância das pesquisas com *Wolbachia* associadas a esses insetos, buscando compreender a possível interação das doenças transmitidas por esses vetores nas regiões do Amazonas e Pará.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

8.1. ANEXO 1: – Resultado da eletroforese em gel de agarose das etapas com 15 alvos utilizando 17 primers

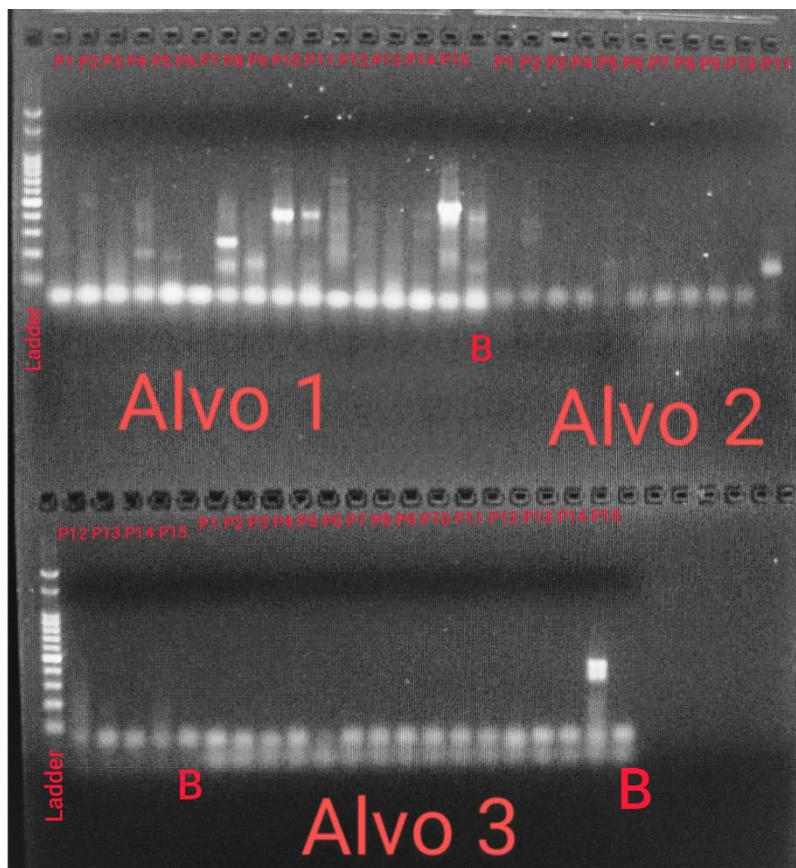


Figura 7: Produto amplificado em Gel de agarose, poços P1-*Culicoides pseudodiaboliscu*, P2- *C. foxi*, P3- *C. hildebrando*, P4- *C. hylas*, P5- *C. ruizi*, P6- *C.paraensis*, P7-*C. glabrior*, P8- *C.paraignacioi*, P9- *C.fusipalpis*, P10- *C. insignis*, P11- *Leptoconops*, P12 – *C. plaumanni*,P13- *C leopoldoi*, P14- *C. coutinhoi* e P15- *C.phlebotomus*, , alvo 1 (primer: aspC), poços (P1 -P15), alvo 2 (primer: aspS), poços P1 – P15 alvo 3 (primer: atpD). Ladder nos poços 1. Branco (água).

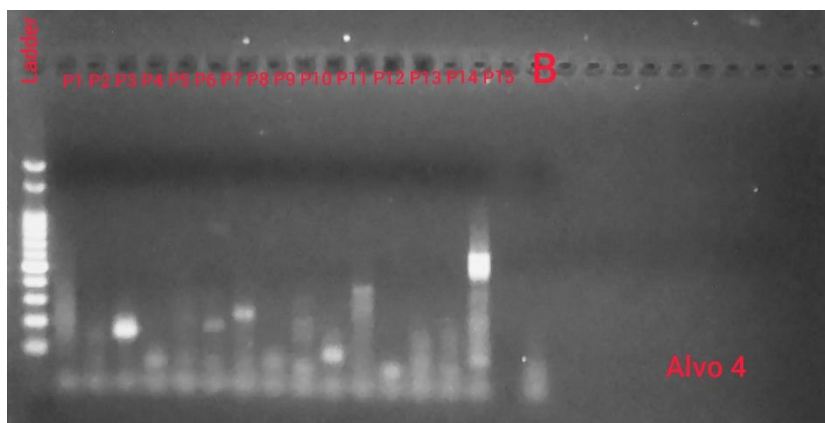


Figura 8: Produto amplificado em Gel de agarose, P1-*Culicoides pseudodiaboliscu*, P2- *C. foxi*, P3- *C. hildebrando*, P4- *C.hylas*, P5- *C. ruizi*, P6- *C.paraensis*, P7-*C. glabrior*, P8- *C.paraignacioi*, P9- *C.fusipalpis*, P10- *C. insignis*, P11- *Leptoconops*, P12 – *C. plaumanni*,P13- *C leopoldoi*, P14- *C. coutinhoi* e P15- *C.phlebotomus*, alvo 4 (primer: CoxA), Ladder nos poços 1. Branco (água).

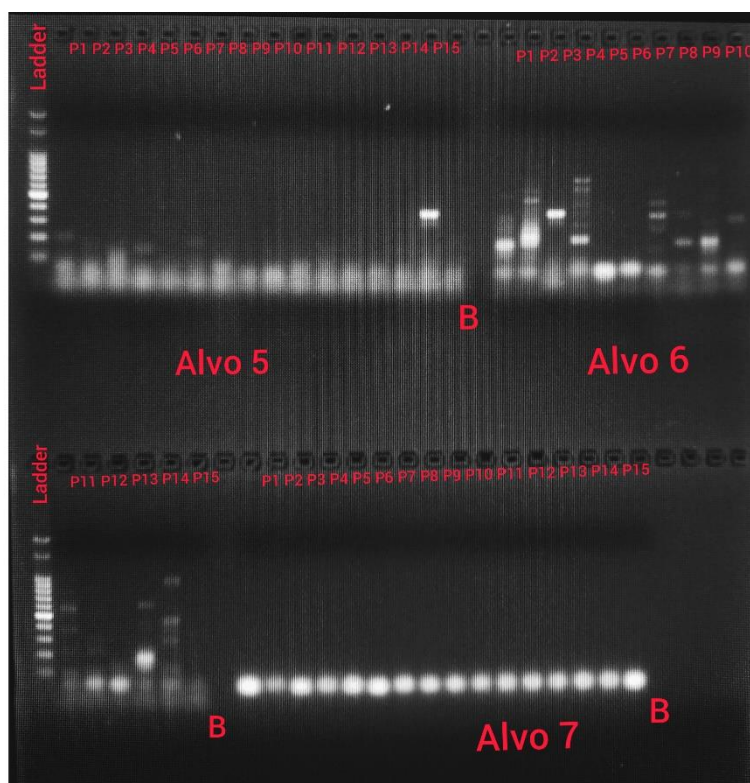


Figura 9: Produto amplificado em Gel de agarose, poços P1-*Culicoides pseudodiaboliscu*, P2- *C. foxi*, P3- *C. hildebrando*, P4- *C.hylas*, P5- *C. ruizi*, P6- *C.paraensis*, P7-*C. glabrior*, P8- *C.paraignacioi*, P9- *C.fusipalpis*, P10- *C. insignis*, P11- *Leptoconops*, P12 – *C. plaumanni*,P13- *C leopoldoi*, P14- *C. coutinhoi* e P15- *C.phlebotomus*, alvo 5 (primer:dnaA), alvo 6 (primer: fabK), alvo 7 (primer: hcpA). Ladder nos primeiros poços. Branco (água).

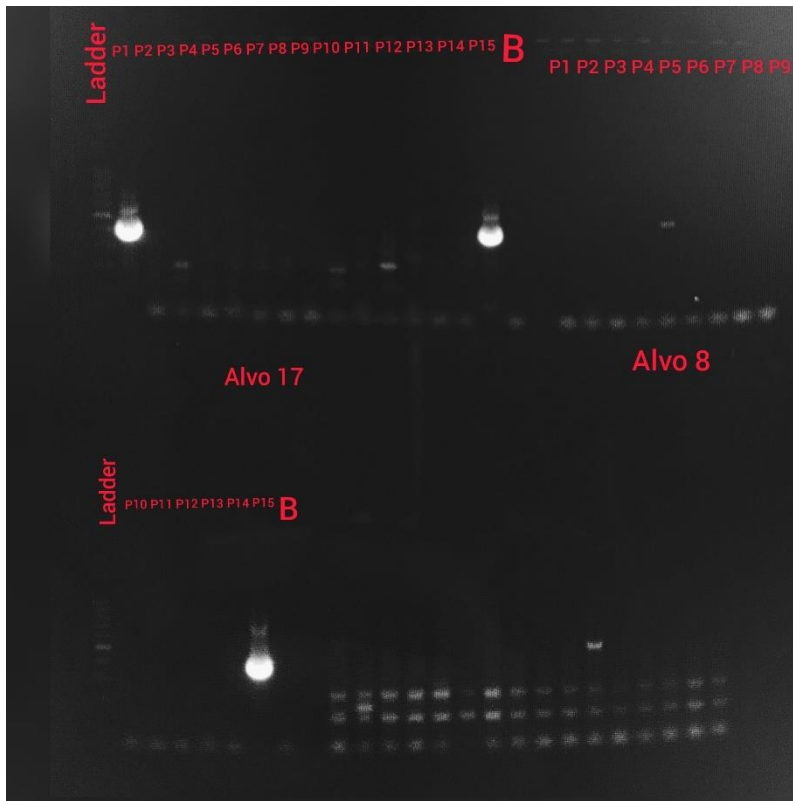


Figura 10: Produto amplificado em Gel de agarose, poços P1-*Culicoides pseudodiaboliscu*, P2- *C. foxi*, P3- *C. hildebrando*, P4- *C. hylas*, P5- *C. ruizi*, P6- *C. paraensis*, P7-*C. glabrior*, P8- *C. paraignacioi*, P9- *C. fusipalpis*, P10- *C. insignis*, P11- *Leptoconops*, P12 – *C. plaumanni*, P13- *C. leopoldoi*, P14- *C. coutinhoi* e P15- *C. phlebotomus*, alvo 8 (primer:WD 0198) e alvo 17 (primer: FtsZ). Ladder nos primeiros poços. Branco (água).

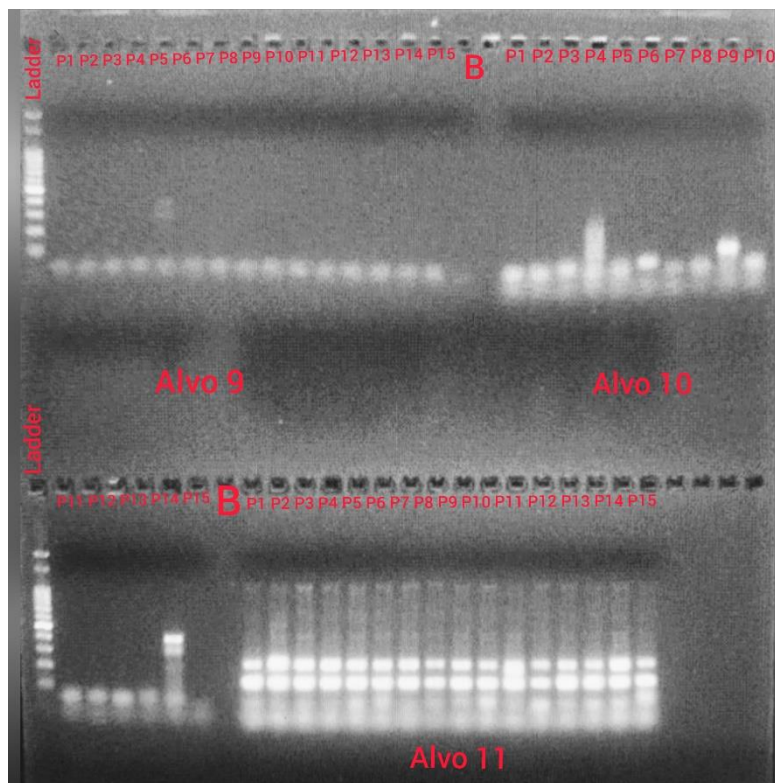


Figura 11: Produto amplificado em Gel de agarose, poços P1-*Culicoides pseudodiaboliscu*, P2- *C. foxi*, P3- *C. hildebrando*, P4- *C.hylas*, P5- *C. ruizi*, P6- *C.paraensis*, P7-*C. glabrior*, P8- *C.paraignacioi*, P9- *C.fusipalpis*, P10- *C. insignis*, P11- *Leptoconops*, P12 – *C. plaumanni*, P13- *C leopoldoi*, P14- *C. coutinhoi* e P15- *C.phlebotomus*, alvo 9 (primer:WD 0237), alvo 10 (primer:WD 0183), alvo 11 (primer: WD 1005). Ladder nos primeiros poços. Branco (água).

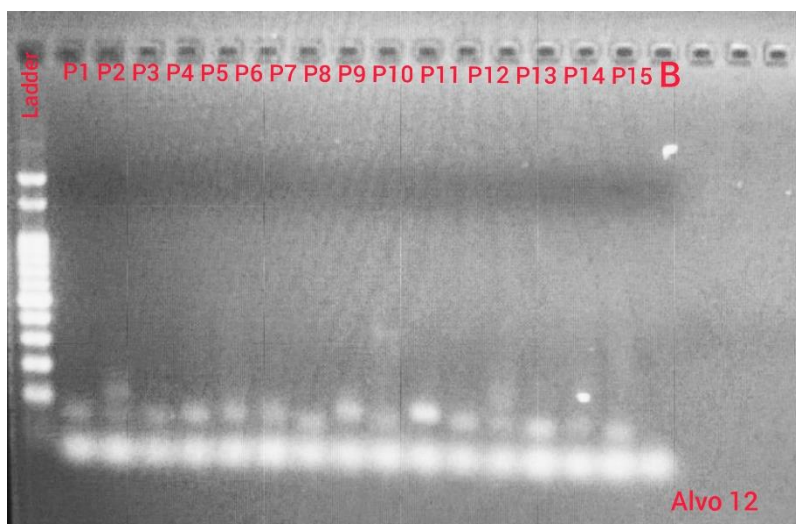


Figura 12: Produto amplificado em Gel de agarose, poços P1-*Culicoides pseudodiaboliscu*, P2- *C. foxi*, P3- *C. hildebrando*, P4- *C.hylas*, P5- *C. ruizi*, P6- *C.paraensis*, P7-*C. glabrior*, P8- *C.paraignacioi*, P9- *C.fusipalpis*, P10- *C. insignis*, P11- *Leptoconops*, P12 – *C. plaumanni*, P13- *C leopoldoi*, P14- *C. coutinhoi* e P15- *C.phlebotomus*, alvo 12 (primer:nadH), Ladder nos primeiros poços. Branco (água).

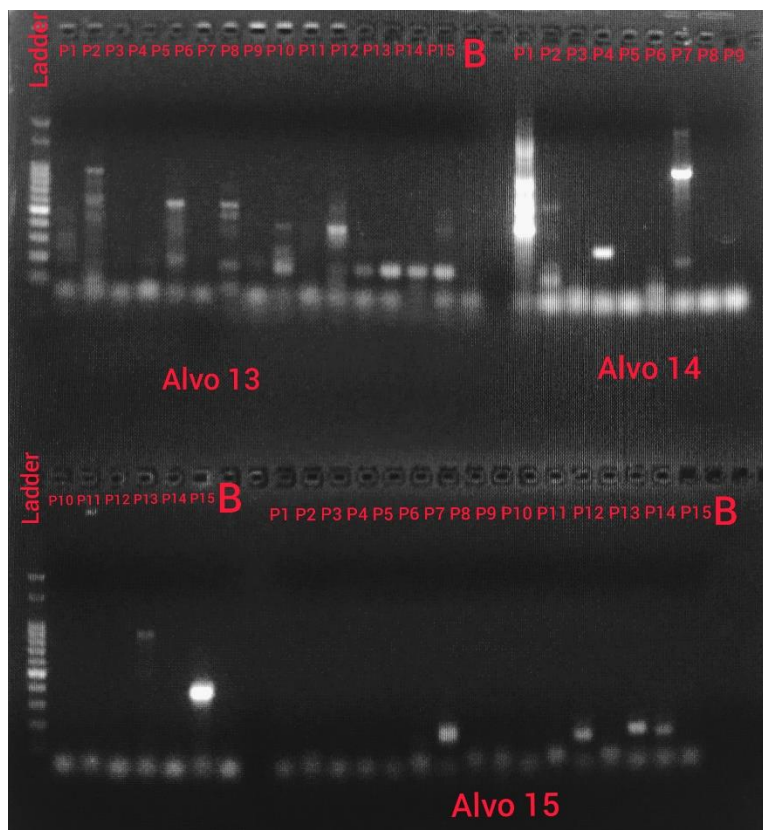


Figura 13: Produto amplificado em Gel de agarose, poços P1-*Culicoides pseudodiaboliscu*, P2- *C. foxi*, P3- *C. hildebrando*, P4- *C.hylas*, P5- *C. ruizi*, P6- *C.paraensis*, P7-*C. glabrior*, P8- *C.paraignacioi*, P9- *C.fusipalpis*, P10- *C. insignis*, P11- *Leptoconops*, P12 – *C. plaumanni*, P13- *C leopoldoi*, P14- *C. coutinhoi* e P15- *C.phlebotomus*, alvo 13 (primer: nouD), poços P1 -P15, alvo 14 (primer:nouG), poços P1 – P15 alvo 15 (primer: pdhB). Ladder nos primeiros poços. Branco (água).

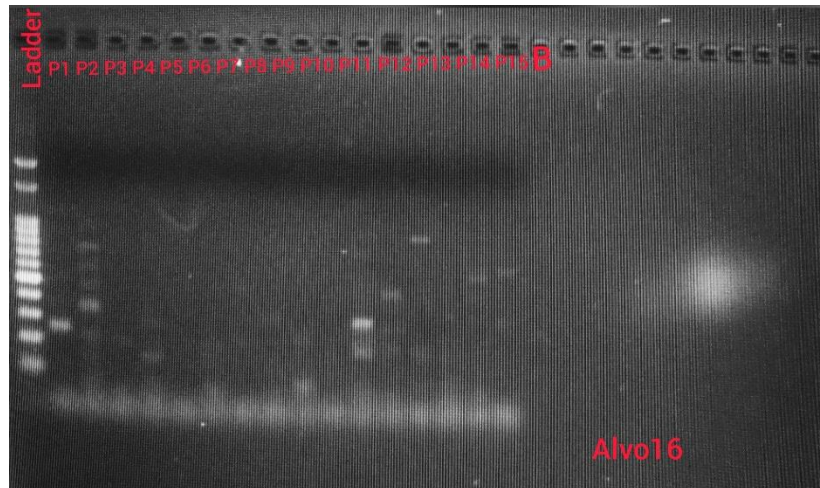


Figura 14: Produto amplificado em Gel de agarose, poços P1-*Culicoides pseudodiaboliscu*, P2- *C. foxi*, P3- *C. hildebrando*, P4- *C. hylas*, P5- *C. ruizi*, P6- *C. paraensis*, P7-*C. glabrior*, P8- *C. paragnacoi*, P9- *C. fusipalpis*, P10- *C. insignis*, P11- *Leptoconops*, P12 – *C. plaumanni*, P13- *C leopoldoi*, P14- *C. coutinhoi* e P15- *C. phlebotomus*, alvo 16 (primer: sucB), Ladder nos primeiros poços. Branco (água).

8.2. ANEXO 2. Tabela 3. Amostras de *Culicoides* spp. positivas para alvos os alvos analisados nesse trabalho.

Amostras	<i>apsC</i>	<i>aspS</i>	<i>atpD</i>	<i>coxA</i>	<i>dnaA</i>	<i>fabK</i>	<i>hcpA</i>	<i>WD0198</i>	<i>WD0237</i>	<i>WD0183</i>	<i>WD1005</i>	<i>nadH</i>	<i>nouD</i>	<i>nouG</i>	<i>pdhB</i>	<i>sucB</i>	<i>ftsZ</i>
<i>p1- C. pseudodiabolicus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>p2- C. foxi</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>p3- C. hildebrando</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p4- C. hylas</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>p5- C. ruizi</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>p6- C. paraensis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p7- C. glabrior</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>p8- C. paraignacioi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p9- C. fusipalpis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>p10- C. insignis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>p11- Leptoconops</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>p12- C. plaumanni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p13- C. leopoldoi</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p14- C. coutinhoi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p15- C. phlebotomus</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-

8.3. ANEXO 3. Árvore filogenética representativa construída usando método de Máxima Verossimilhança - gene *nouG*

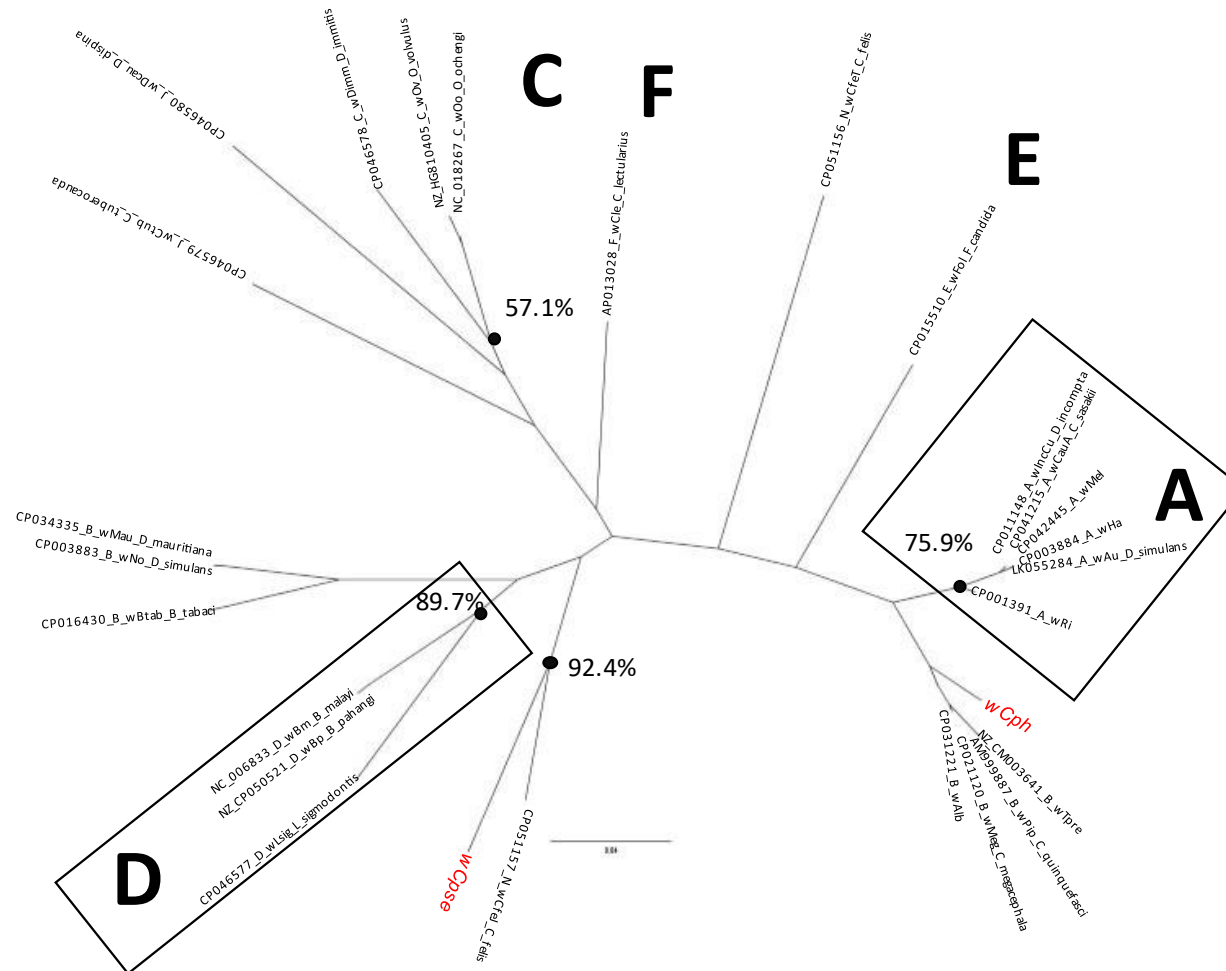


Figura 14. Uma árvore filogenética representativa construída usando método de Máxima Verossimilhança - gene *nouG*. Em vermelho: As cepas de *Wolbachia* sp. isolada de *Culicoides phlebotomus* (*wCphi*) e *Culicoides pseudodiabolicus* (*wCpse*).

8.4. ANEXO 4. Árvore filogenética representativa construída usando método de Máxima Verossimilhança - gene *WD 0198*

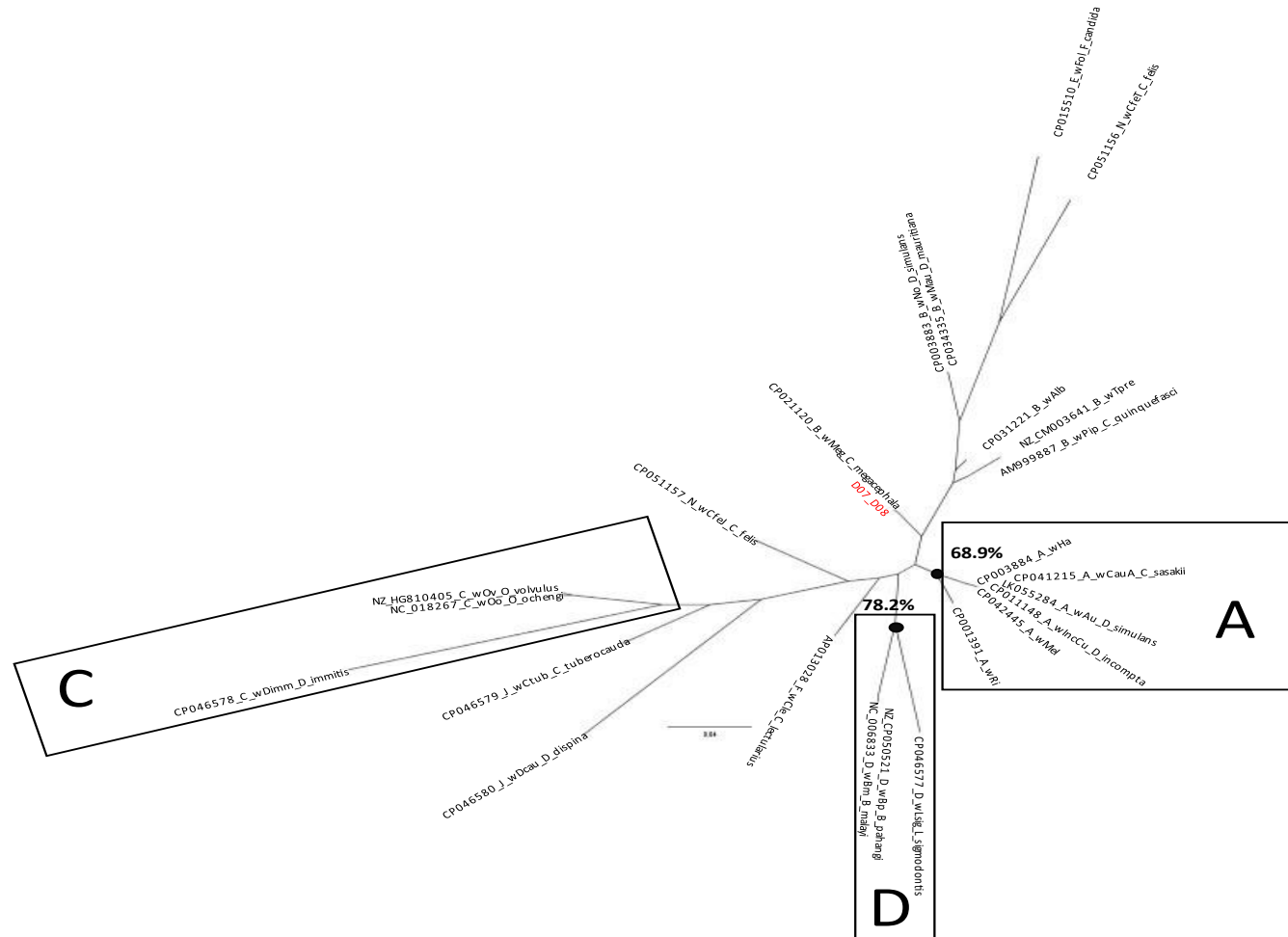


Figura 15. Uma árvore filogenética representativa construído usando método de Máxima Verossimilhança - gene *WD 0198*. Em vermelho: A cepa de *Wolbachia* sp. isolada de *Culicoides phlebotomus* (*wCphi*)

8.5. ANEXO 5. Árvore filogenética representativa construída com método de Máxima Verossimilhança - gene *aspC*

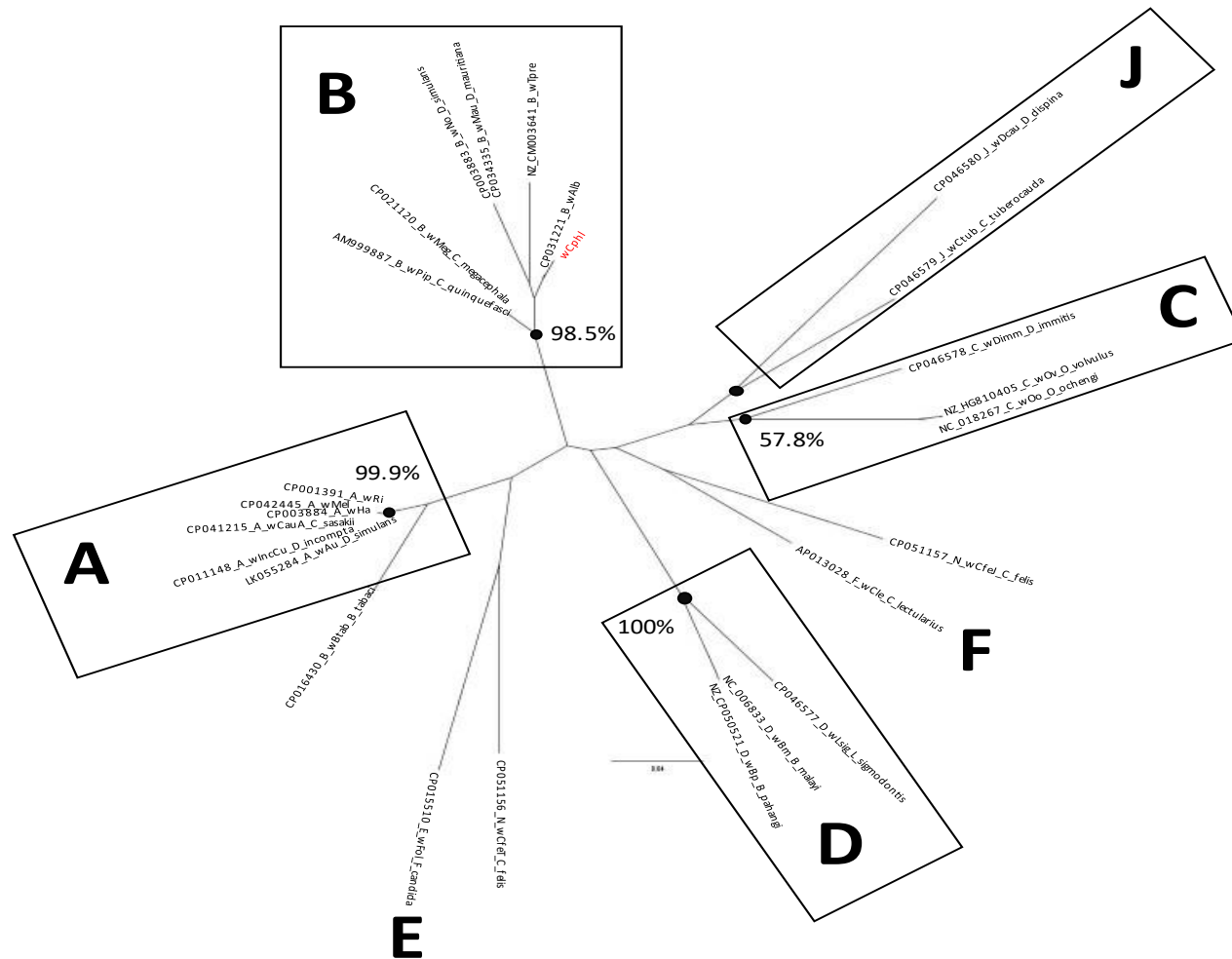


Figura 16. Árvore filogenética representativa construída com método de Máxima Verossimilhança - gene *aspC*. Em vermelho: A cepa de *Wolbachia* sp. isolada de *Culicoides phlebotomus* (*wCphi*)

8.6. ANEXO 6. Árvore filogenética representativa construída com método de Máxima Verossimilhança - gene *dnaA*

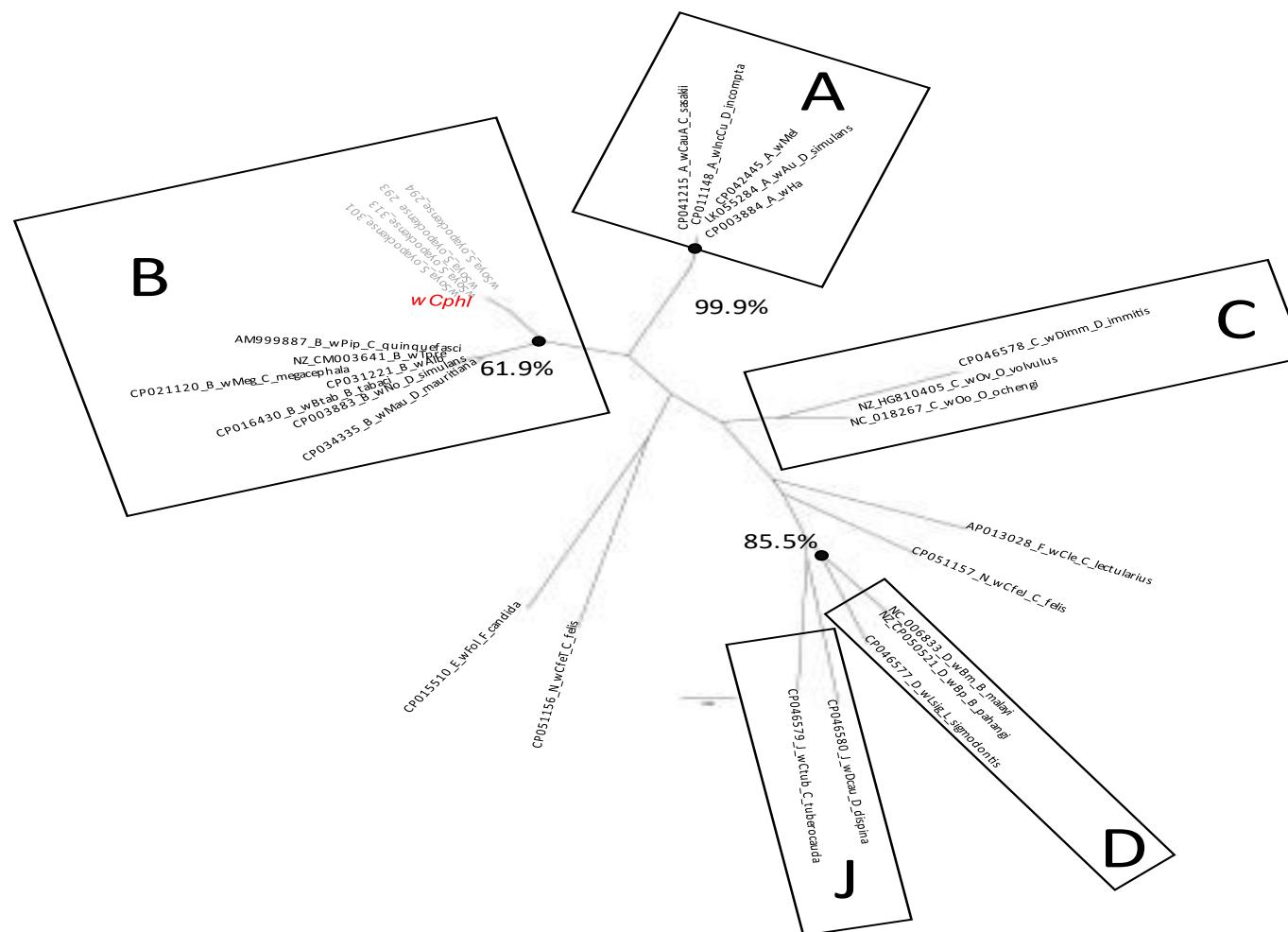


Figura 17. Árvore filogenética representativa construída com método de Máxima Verossimilhança -gene *dnaA*. Em vermelho: A cepa de *Wolbachia* sp. isolada de *Culicoides phlebotomus* (*wCphi*)

8.7. ANEXO 7. Árvore filogenética representativa construída com método de Máxima Verossimilhança -gene atpD

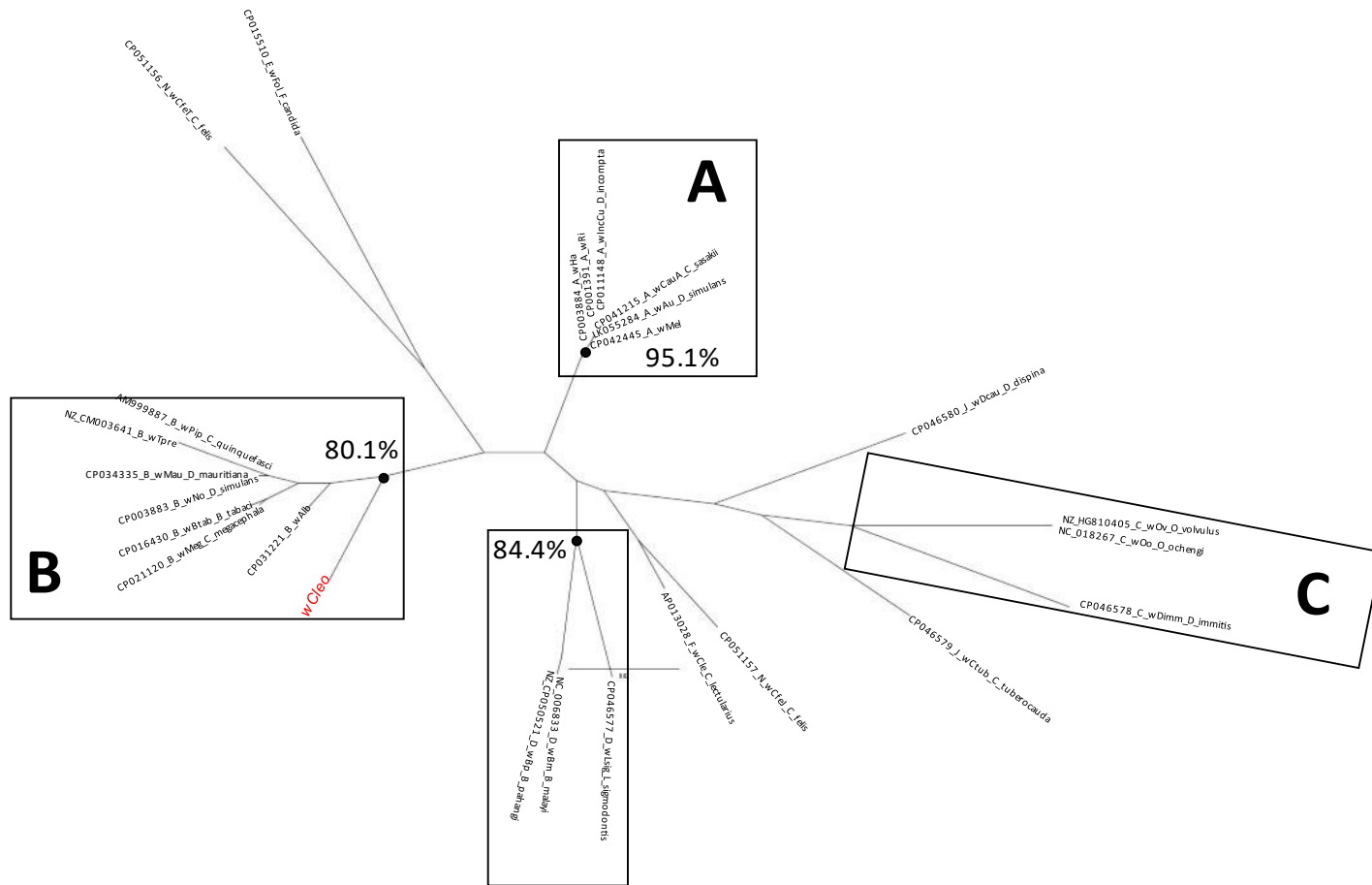


Figura 18. Árvore filogenética representativa construída com método de Máxima Verossimilhança - gene atpD. Em vermelho: cepa de *Wolbachia* sp. isolada de *Culicoides leopoldoi* (*wCle0*)

8.8. ANEXO 8. Árvore filogenética representativa construída com método de Máxima Verossimilhança - gene *CoxA*.

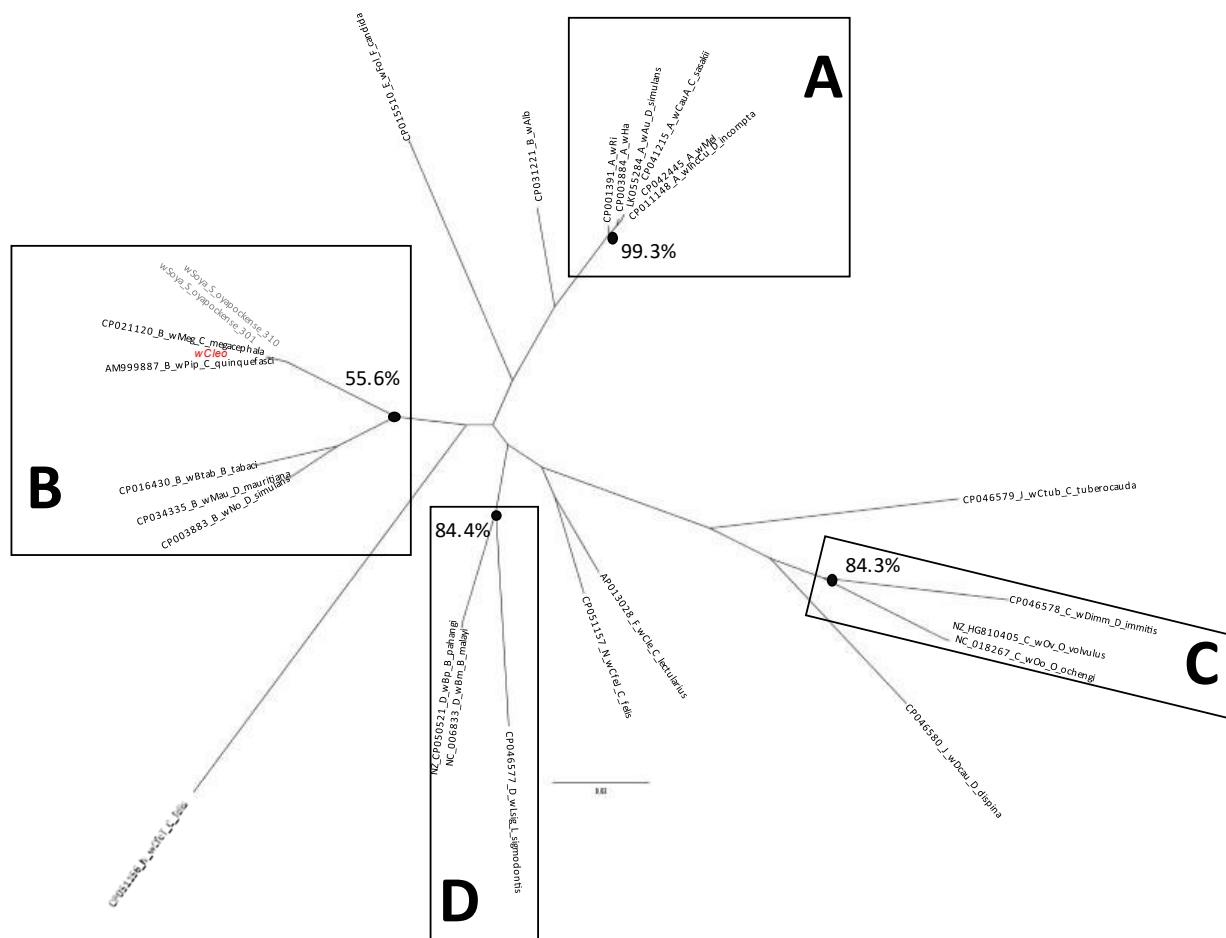


Figura 19. Árvore filogenética representativa construída com método de Máxima Verossimilhança- gene *CoxA*.. Em vermelho: cepa de *Wolbachia* sp. isolada de *Culicoides leopoldoi* (*wCleo*).

8.7. ANEXO 7. Sequências obtidas para os alvos nesse trabalho

nouG

>wCphi_A05_A06_CON *Culicoides phlebotomus*

TGCATTTTCTNTGCCCTCAGCAGTGGTGTGAATACATATGACCCACGAT
TATTTGGTATAAGCTTTGCTCCATCTTGCCTACAGTCTATATCCCCGAG
CCGAGCTTTTGCATCACTTCTTTGAGTAGAAGCATAGACTCACAATCTGC
TAAATCACCTGCAATTGCAGCTATCTTATTTGATTTTGTATTCTTTAATT
TCTTTGCAGCAACAGTTAATGCTTCATTCCAATCAACTGGGGCTAATTTA
CCATCTTTTTTTACATAAGGTTCGATTAAGACGCTGAACTTTTAGTCCATC
ATAGGCAAACGGGTTTTATCTGATATCCATTCTTCATTTACCTCTTCGC
TCAGCCTTGGAATATTCGCATAACTTCCAGGCCACGATAATCAACTCTG
ATCGCACTTCCCACCA

>wCpse_F04_F03_CONS *Culicoides pseudodiabolicus*

TGCATTTTATATGCCCTCAATGGTGGTATTAAACACATATGATCCGCGAT
TATTTGGTATAAACGTTGCTCCGTCCTGTCTGCAATCTATATTTGCTGAG
CCAAGTTTGCGCATCATTTCTTTTAGTAGAAGCATAGACTCACAATCTGC
TAGATCACCTGCAATGGCAGCTACTTTGTTTGGCTTTGTACTTCTTAGTT
TTTCTGCAGCAACAGTTAGTGCTTCATTCCAATCAGTTGACACTAATTTA
CCGTCTTTTTTTACGTAAGGTTGATCAAGGCGTTGCACTTTCAGTCCATC
GTAAGCAAAGCAAGTTTTATCTGATATCCACTCTTCGTTGATTTCTTCAT
TGAGCCTTGGCAGTATNCGCATAACTTCTGNGCCACGGTAGTCCACTCTG
ATCGCACTTCCCACCG

WD0198

>wCphi_D07_D08_CONS *Culicoides phlebotomus*

AAAGGCCACAAAAGCTTGAACGTTGCACTCAGAAAAAATCTAGGCTTGTA
TGCAAATATCAGACCATGCATTTTATATCATCCTGTCATAGAAAATAAAT
TTGATAAGTTTGATATTGTAGTAATACGTGAAAATGAAGAGGACGTTTAC
ACCGGAATAGAGCATAGGCTCACTGGTGACTCGTACCAATGCACTAAAAT
TATTACTAGATCTGGTTCAGAAAAAATATGCAGGTACGCTTTTGAATATG
CGAAAAACACAACAGAAAGAAAGTAACTTGCCTGACTAAAGACAACATA
ATGAAAATGACTGACGGCGCTTTTTCATGCAGCGTTTGATCGTATTGCAA
AGAATACCAAGATATAAAGACAGAACATTATATAGTTGATATTGGAATGG
CACGTGTT

aspC

>wCphi_F01_F02_CONS_Culicoides_phlebotomus

TTTAGCTGCAGGAGAGCCGGATTTTGACACTCCAGATCGTATAAAAAAGG
CAGCTATTCAATCGATAAATGAAGGCCAAAATAAATACTGCTGTTGAT
GGAACGCGTGAGCTTAAAGAGGCGATAATCAATAAGTTAAAAAGGGATAA
CAATCTAGAATATACTGAATCAAATTTGTGTCGGCGCTGGCGCTAAGC
AGGTGTTATTCAACTTATTTATGGCAACAATTAACCCTGGAAATGAAGCT
ATAATACCAGCTCCTTATTGGGTTTCGTATGTTGATATGGTAAATCTTTT
TGGCGGACTGCCAGTTATTTAGAGTGCAAACAAAATAAAGCTGACAC
CGGAGTTACTGGAAAGCAATATACTGAGAAAATAAGTGGTTAATTCTT
AACTCACCAAATAATCCGGCAGGAATTGTCTATACATATGATGAATTGAA
AAGCATAGCGCAAGTATTGCTTGAATAT

dnaA

>wCphi_G01_G02_CONS_Culicoides_phlebotomus

ATAATAAAATCACGACTTGGTTGGGGATTAGTTGCAGATATCAATGAAAC
AACTTTTGAATTAAGACTTGGTATATTGCGGGCCAAAGTGGAGCGAATGA
ATATTTATGTTCCAAAAGATGTCCTAGAATTTTAGCAAGGAATATAAAA
TCCAATATAAGAGAACTAGAAGGAGCATTAAATAAGGTTGCTCATACTTC
GTTAATTGGAAGAAGTATGACAGTAGAATCAGCTAGCGAGACCCTAATAG
ATCTTCTTAGATCGAATCATAGGTCAATTACAATAGAAG

Wolb ATP

>wCleo_A01_A02_CONS_Culicoides_leopoldoi

GCTGGATCAGTCAAATCGTCTGCAGGAACATATATAGCCTGTACAGAAGT
AATAGAGCCAGAAGTAGTTGAGGCTATTCTTTCTTGCATAGCGCCCATAT
CAGTTGCAAGGGTTGGCTGATAACCAACAGCTGACGGTATTCTTCCAAGT
AAAGCAGAGATTTTCAAGCCAGCTTGAGTAAAACGGAAGATATTATCTAC
AAAAAATAGAACATCTTGGTTTTCACGGTCACGAAAATACTCTGCCATAG
TTAGCGCCGTTAAAGCAACTCTGGCTCTTGCCCCTGGAGGTTCAATCATC
TGACCATAAACCAAAACGGCTTGAGATTTTTTCGTGCTCATTTATATCTAT
TACATTCAAAGTAATCATCTCGTTATAAAGATCATTACCTTCA

coxA

>wCleo_H07_H08_CONS_Culicoides_leopoldoi

GTGACATTGGTGCTAATAAAAGTGAGCCAAAAGTGTATCTTTCCTAAACA
CTCGTTATATTGCTTACCTGACATTTTGCCTATCCAATAATAAAAACCGG
CGAAAGCTCCAAATAATGCAGCAAGCGACATGACATAGTGAAAGTGAGCA
ACGACATAATAGGTATCGTGCAAAGCTTATCTATTCCACCGTGAGAAAG

AATTATTCCGGTTATACCACCTCCAACAAACATGAAAATAAACCTAATG
CAAACAGCATTGGTGTCTTCAATTCAATCGCTCCACCCCACATAGTTGCA
ATCCAATAAGACTTTTACACCAGTTATAACACCAATGAAAATTGTGCT
AGTGCTAAAAAATATAGCAACATCCTCGCTAAGCCCAACAGTAAACATAT
GGTGAGCCCAAACCATGAAGCCAAACGTTGCTATTCTATCATGGCATAA
ACCATTCCCATATAACCAA

ftsZ

>wCpse_C03_C04_CONS_Culicoides_pseudodiabolicus

AAAGAAAAAAGATATTAACCGTTGGGGTTGTAACCAAGCCATTTGGCTT
TGAAGGCGTGCGCCGTATGCGCATTGCGGAACTCGGACTTGAAGAACTGC
AAAAATACGTAGATACGCTCATTGTTATTCCAAACCAGAATTTATTTAGA
ATTGCAAATGAAAAAACTACATTTTCTGATGCATTTAAGCTTGCTGATAA
TGTTCTACATATTGGTATCAGAGGGGTAAGTACTGACTTGATGGTCATGCCAG
GACTCATTAACTTGATTTTCTGATATAGAAACAGTAATGAGCGAAATG
GGTAAAGCGATGATCGGTACTGGAGAAGCGGAGGGGGG

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aitken, T.H.G.; Wirth, W.W.; Williams, R.W.; Davies, J.B. & Tikasingh, E.S. A review of the bloodsucking midges of Trinidad and Tobago, West Indies (Diptera: Ceratopogonidae). **J. Entomol.** **44**:101-144. 1975

Augot, D., Mathieu, B., Hadj-Henni, L., Barriel, V., Zapata Mena, S., Smolis, S., Slama, D., Randrianambinintsoa, FJ, Trueba, G., Kaltenbach, M., Rahola, N., & Depaquit, J. Filogenia molecular de 42 espécies de Culicoides (Diptera, Ceratopogonidae) de três continentes. Phylogénie moléculaire de 42 espèces de Culicoides (Diptera, Ceratopogonidae) de trois continents. *Parasite (Paris, França)*, **24**, 23. 2017

Bian, G.; Joshi, D.; Dong, Y. et al. *Wolbachia* Invades anopheles stephensi populations and induces refractoriness to Plasmodium infection. **science**, v. 340, p. 748-751, 2013.

Bermúdez, E. G. C. *Culicoides (Diptera : Ceratopogonidae) antropófilos na Reserva Florestal Ducke: abundância sazonal durante o dia*. Manaus, Tese de Doutorado em Entomologia, INPA/UFAM, p. 186. 1986

Bordenstein, S. R.; F. P. O'hara; J. H. Werren. *Wolbachia* induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. **Nature** **409**: 707–710. 2001.

Borkent, A. The Biting Midges, the Ceratopogonidae. *In*: Marquardt, W.C. (Eds). **Biology of Disease Vectors**. 2ª Ed. Elsevier Academic Press. Burlington, San Diego, London. p. 113-126. 2005.

- Borkent, A.; Spinelli, G.R. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). *In*:2003.
- Borkent A, Spinelli GR. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). In: Adis J, Arias JR, Rueda-Delgado G, Wantzen KM, editors. Aquatic Biodiversity in Latin America. Moscow: Pensoft Publishers; 2007. p. 198.
- Borkent, A; Dominiak, P. Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae). *In* 2020.
- Bordenstein Seth R. Et al. Parasitism and mutualism in wolbachia whats the phylogenomic trees can and cannot say_BIOMOL RV_2009.
- Bourtzis, K. *Wolbachia*-based Technologies for insect pest population control. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. New York, v. 627, p.104-113,2008.
- Bourtzis, K. Wolbachia-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol*, v. 627, p. 104-113, 2008.
- Caragata, E.P.; Dutra, H.L.C, Sucupira, P.H.F, Ferreira, A.G.A; Moreira, L.A. Trends Parasitol. Jul 21:S1471-4922(21)00164-1. 2021
- Castellón, E.G. & Ferreira, R.M. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) da Amazônia. III. Resultados de coletas noturnas, na Reserva Florestal Ducke, Estado do Amazonas, Brasil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.** 7:117-123. 1991
- Clark, T. L.; L. J. Meinke; S. R. Skoda; J. E. Foster. Occurrence of *Wolbachia* in selected diabroticite (Coleoptera: Chrysomelidae) beetles. *Annals of the Entomological Society of America* **94**: 877–885. 2001.
- Crainey JL; M.D. Wilson b, R.J. Post; Phylogenetically distinct Wolbachia gene and pseudogene sequences obtained from the African onchocerciasis vector *Simulium squamosum*. *International Journal for Parasitology* doi:10.1016/j.ijpara.2009.10.017. 2010.
- Correa, T.G, Ferreira, J.M, Riet-Correa, G, Ruas, J.L, Schild, A.L, Guimarães, A, et al. Seasonal allergic dermatitis in sheep in southern Brazil caused by *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Vet Parasitol.* 145(1-2):181-5.2007
- Covey H, Hall RH, Krafur A, Matthews ML, Shults PT, Brelsfoard CL. Cryptic Wolbachia (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Detection and Prevalence in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Midge Populations in the United States. *J Med Entomol.* 2020 Jul 4;57(4):1262-1269.
- Dobson, S.L.; Marsland, E.J.; Veneti, Z.; Bourtzis, K.; O'Neill, S.L. Caracterização da gama de células hospedeiras de *Wolbachia* através do estabelecimento de infecções *in vitro* . **Appl Environ Microbiol.** 68 : 656-660. 2002.
- Dutra, H.L.; Rocha, M.N.; Dias, F.B; Mansur, S.B; Caragata, E.P; Moreira, L.A. *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti*

Mosquitoes. **Cell Host Microbe**. 2016 Jun 8;19(6):771-4. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.021. Epub 2016 May 4.

Downes, J.A.; Wirth, W.W. Ceratopogonidae. *In*: McAlpine, J.F.; Peterson, B.V.; Shewell, G.E.; Teskey, H.J.; Vockeroth, J.R.; Wood, D.M. (Eds). Manual of Nearctic Diptera, Vol. 1. **Research Branch Monograph** nº 27. P. 393-421.1981.

Driscoll TP, Verhoeve VI, Gillespie JJ, Johnston JS, Guillotte ML et al. A chromosome-level assembly of the cat flea genome uncovers rampant gene duplication and genome size plasticity. *BMC Biol*;18:70. 2020

Hilgenboecker, K.; Hammerstein, P.; Schlattmann, P.; Telschow, A.; Werren, J.H. Quantas espécies estão infectadas com *Wolbachia*? - uma análise estatística dos dados atuais. *FEMS Microbiol Lett*. 281 : 215-220. 2008.

Farias, E.S. Efeito antrópico na diversidade de maruins (*Diptera: Ceratopogonidae*) em uma área de Assentamento rural na Amazônia. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas/Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz, Manaus, Amazonas. 75pp. 2014.

Farias, E.S.; Júnior, A.M.P.; Almeida, J.F.; Pessoa, F.A.C.; Medeiros, J.F. *Hematophagous* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from Tefé municipality, Amazonas state, Brazil. **Checklist**, 11(4): 1-5.2015.

Felippe-Bauer, M.L., A.G. Cáceres, C. S. Silva, W. Valderrama-Bazan, A. Gonzales-Perez and J.M. Costa. 2008. Description of *Culicoides pseudoheliconiae* sp. n. from Peruvian Amazon and revalidation of *Culicoides contubernalis* Ortíz & Leon (Diptera: Ceratopogonidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103: 259–262.

Funke, B. R. *et al.* *Microbiologia*. Artmed, 2005.

Gomes FM, Hixson BL, Tyner MDW, Ramirez JL, Canepa GE, Alves E Silva TL, Molina-Cruz A, Keita M, Kane F, Traoré B, Sogoba N, Barillas-Mury C. Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Nov 21;114(47):12566-12571.

Ghosh, A., Jaspersen, D., Cohnstaedt, L. W.; Brelsfoard, C. L. *Transfection of Culicoides sonorensis biting midge cell lines with Wolbachia pipientis*. *Parasites & Vectors*, 12(1).2019..

Leles, L. F. O. Avaliação da Diversidade Genética Populacional e Prevalência de Infecção por *Wolbachia* em *Mansonella ozzardi* no Estado do Amazonas, Brasil. Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno- Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Lefoulon, E. et al., Diminutive, degraded but dissimilar *Wolbachia* genomes from filarial nematodes do not conform to a single paradigm *Microbial genomics* 2020.

Lewis, S.E.; Rice, A.; Hurst, G.D.D.; Baylis, M. Primeira detecção de bactérias

endossimbióticas em mosquitos cortantes *Culicoides pulicaris* e *Culicoides punctatus*, importantes vetores paleo-cíticos do vírus da língua azul . **Med Vet Entomol** 28 : 453–456. Doi: 10.1111 / mve.12055. 2014.

Mee, P.T.; Weeks, A.R.; Walker, P.J.; Hoffmann, A.A.; Duchemin, J.B. Detecção de infecções de baixo nível por *Cardinium* e *Wolbachia* em *Culicoides* . **Appl Environ Microb.** 81 : 6177–6188. 2015.

Mellor, P.S.; Boorman, J.; Baylis, M. *Culicoides* Biting Midges: Their Role as Arbovirus Vectors. **Annual Review of Entomology**, 45: 307-340.2000.

Mellor, P.S.; Boned, J.; Hamblin, C.; Graham, S. Isolations of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. **Epidemiology and Infection**, 105: 447-454. 1990.

Meiswinkel R, Nevill EM, Venter GJ. 1994. Vetores: *Culicoides* spp. Veja Ref. 36, pp. 68-89

Mcmeniman, C.J.; Lane, A.M.; Fong, A.W.; Voronin, D.A.; Iturbe-Ormaetxe, I.; Yamada, R. et al. Adaptação do hospedeiro de uma linhagem de *Wolbachia* após passagem em série a longo prazo em linhagens celulares de mosquitos. **Appl Env Microbiol.** 74 : 6963-6969. 2008.

Nakamura Y, Kawai S, Yukuhiro F, Ito S, Gotoh T, Kisimoto R, et al. Prevalence of *Cardinium* bacteria in planthoppers and spider mites and taxonomic revision of “*Candidatus Cardinium hertigii*” based on detection of a new *Cardinium* group from biting midges. **Appl Environ Microbiol.**75:6757–63. 2009.

Nunes, M.R.T.; Vasconcelos, H.B.; Medeiros, D.B.A.; Rodrigues, S.G.; Azevedo, R.S.S.; Chiang, J.O.; Martins, L.C.; Vasconcelos, P.F.C. Oropouche fever: an overview of the epidemiological and molecular aspects in the Brazilian Amazon region. **Caderno de saúde coletiva**, 15(3): 303-317. 2007.

Pereira, T.N.; Rocha, M.N.; Sucupira, P.H.F.; Carvalho, F.D.; Moreira, L.A. *Wolbachia* significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for Mayaro virus. **Sci Rep**, v.8, n. 1:6889, 2018.

Pessoa, F.A.C.; Castellón, E.G.; Medeiros, J.F.; Camargo, L.M.A. First occurrence of the human biting midge *Leptoconops brasiliensis* (Lutz) (Diptera: Ceratopogonidae) in the triple border of Brazil, Peru, and Bolivia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 45(1): 138–139.2012.

Pinheiro FP, Hoch AL, Gomes ML, Roberts DR. Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. **Am J Trop Med Hyg.** 1981 Jan;30(1):172-6. PMID: 7212164.

Prezotto, L.F. Análise do ITS1 do DNA ribossômico em espécies do completo *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). 66p. Dissertação Mestrado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2008.

Rebelo, J.M.M, Rodrigues, B.L, Bandeira, M.C.A, Moraes, J.L.P, Fonteles, R.S, Pereira,S.R.F. Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an Endemic Area of Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazonia. **Journal of Vector Ecology**, 41(2):303-308. 2016.

Ronderos, M.M.; Greco, N.M.; Spinelli, G.R. Diversity of Biting Midges of the Genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in the Area of the Yacyretá Dam Lake between Argentina and Paraguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98(1): 19-24. 2003.

Seblova V, Sadlova J, Carpenter S, Volf P. Development of *Leishmania* parasites in *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae) and implications for screening vector competence. *J Med Entomol*. 2012 Sep;49(5):967-70.

Seblova, V., J. Sadlova, B. Vojtkova, J. Votypka, S. Carpenter, P. A. Bates, and P. Volf. The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: 1–15 2015.

Shelley, A.J, Coscarón, S. Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and Ceratopogonid midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in Northern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 451-458. 2001.

Slama, D., N. Haouas, L. Remadi, H. Mezhoud, H. Babba, and E. Chaker. First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp.(Diptera: Ceratopogonidae). *Parasite Vectors* 7: 51. 2014.

Spinelli, G.R.; Ronderos, M.M.; Marino, P.I.; Carrasco, D.S.; Ferreira, R.L.M..Description of *Culicoides (Mataemyia) felippebaueri* sp. N., *Forcipomyia musae* immatures, and occurrence of *F. Genualis*, breeding in banana stems in Brazilian Amazonia (Diptera: Ceratopogonidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102(6): 659-669. 2007.

Stevens, L.R.; Giordano, R. F. Fialho. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 519–545.2001.

Torreias, S.R.S.; Ferreira-Keppler, R.L. Macroinvertebrates inhabiting the tank leaf terrestrial and epiphyte bromeliads at Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 54(6): 1193-1202. 2011.

Trindade, R.L.; Gorayeb, I.D.S. Maruins (Ceratopogonidae: Diptera) do estuário do rio Pará e do litoral do estado do Pará, Brasil. **Entomología y Vectors**, 12(1): 61-74. 2005.

Trindade, R. L; Gorayeb, I. S. Maruins (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*), após a estação chuvosa, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Itatupã-Baquiá, Gurupá, Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*. Jun;1(2):121-30. 2010

Werren, J.H.; Windsor, D.W.; Guo,L. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods. Royal Society of London.Proceedings B. Biological **Sciences**. London. V.262,p.147-204,1995.

Werren, J. H. Biology of *Wolbachia*. Annual Review of Entomology **42**: 587–609.—
—, D. WINDSOR, AND L. GUO. 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proceedings of the Royal Society of London, Series B **262**: 197–204. 1997.

Werren, J. H. et al. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nat Rev Microbiol, v. 6, n. 10, p. 741-751, Oct 2008.

WIRTH, W.W.; HUBERT, A.A. The *Culicoides* of Southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, .Washington, DC, USA 1989.