

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD  
INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
FioCruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA  
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO**

**KELLY NATALIA ROMERO VESGA**

**BIOPROSPECÇÃO DE GENES *SPVB* DE FAGOS WO EM ARTRÓPODES  
COLETADOS NOS MUNICÍPIOS DE MANAUS E PRESIDENTE  
FIGUEIREDO NO ESTADO DO AMAZONAS-BRASIL**

**MANAUS – AM**

**2023**



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA  
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO**

**KELLY NATALIA ROMERO VESGA**

**BIOPROSPECÇÃO DE GENES *SPVB* DE FAGOS WO EM ARTRÓPODES  
COLETADOS NOS MUNICÍPIOS DE MANAUS E PRESIDENTE  
FIGUEIREDO NO ESTADO DO AMAZONAS-BRASIL**

**MANAUS – AM**

**2023**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA**  
**INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO**

**KELLY NATALIA ROMERO VESGA**

**BIOPROSPECÇÃO DE GENES *SPVB* DE FAGOS WO EM ARTRÓPODES**  
**COLETADOS NOS MUNICÍPIOS DE MANAUS E PRESIDENTE**  
**FIGUEIREDO NO ESTADO DO AMAZONAS-BRASIL**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, com área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. James Lee Crainey**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Jose Joaquin Carvajal Cortes**

**MANAUS – AM**

**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

V576b

Vesga, Kelly Natalia Romero

Bioprospecção de genes SpvB de fagos WO em artrópodes coletados nos municípios de Manaus e Presidente Figueiredo no estado Amazonas, Brasil. / Kelly Natalia Romero Vesga. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2023.

74 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2023.

Orientador: Prof. Dr. James Lee Crainey.

Co-orientador: Prof. Dr. Jose Joaquim Carvajal Cortes.

1. Wolbachia 2. Proteínas SpvB I. Título

CDU 595.77(813.3) (043.3)

CDD 595.772

22. ed.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**KELLY NATALIA ROMERO VESGA**

**BIOPROSPECÇÃO DE GENES *SPVB* DE FAGOS WO EM ARTRÓPODES  
COLETADOS NOS MUNICÍPIOS DE MANAUS E PRESIDENTE  
FIGUEIREDO NO ESTADO DO AMAZONAS-BRASIL**

**Aprovada em:** 04/07/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. James Lee Crainey

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/ Fiocruz Amazônia

Prof. Dr. Eric Pearce Caragata

University of Florida – UF

Prof. Dr. Francisco Augusto Da Silva Ferreira-

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD – Fiocruz Amazônia

Dedico este trabalho à minha família, meu apoio, minha inspiração de vida. Em memória da minha avó Oliva Vesga, sua ausência dói, obrigado por seu imenso amor, sempre a levarei em meu coração.

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a minha mãe e meu pai, pôr a confiança que depositaram em mim, por minha educação, por ajudar a forjar meu caráter e especialmente por me ensinar que o céu e o limite. A minha irmã e meus sobrinhos com quem estamos aprendendo que depois da tempestade vem a bonança e no final veremos juntos o arco-íris.

A minha família multiespécie, meu bem Camilo e meus filhos, obrigada por estar presente em todos os momentos, vocês foram luz e conforto nas crises e são alegria e motivação para a vida que continua.

Agradeço a compreensão de meus tios Sonia, Álvaro e Fabio, a partida da avó ainda dói, e o conforto é saber que conto com a melhor família do mundo. Obrigada por todo o que vocês fazem com minha mãe e pai.

A meu orientador Dr. Prof. James Lee Crainey por oferecer a oportunidade de fazer pesquisa, de ensinar o mundo da investigação e proporcionar conhecimentos.

Agradeço especialmente a meu Coorientador, Dr. Prof. Jose Joaquin Carvajal Cortes, por todo o que ainda faz por mim, obrigada pelo carinho e atenção com que fui recebida e pelos conhecimentos que sempre comparte. Sou muito grato com a vida por colocar você no meu caminho.

Agradeço ao Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ/ILMD) por todo o auxílio e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao programa PPG-BIO-ILMD, professores e companheiros pela colaboração e paciência no aprendizado.

A todos e cada um dos funcionários do ILMD, especialmente Sra. Yura, Rejane, Maju, infinitamente grata com vocês por todas as ajudas.

Agradeço a minha colega Danielle Valerio, só tenho para dizer que juntas foi mais fácil, você é incrível uma pesquisadora de excelência, admiro muito você. E a Carolina Ferreira por me ensinar tudo o que precisava para iniciar com o trabalho e pôr os esforços que fizeram juntas para me compreender o portunhol.

Agradeço a Dra. Luz Mila, Sonia, Vanessa, Melissa, Marcela, Albita e toda minha família LSPDA, por a amizade, a confiança e o impulso que me deram para sair da zona de conforto e iniciar nessa aventura.

As minhas novas amizades, Matty, Deja, por abrir as portas de suas casas e ofereces amizade sincera. A todos os colegas do núcleo PreV- Amazônia, que fizeram mais fácil o processo de adaptação.

A minha família colombiana em Brasil, Lini Maria, minha admiração, respeito e carinho com você. Obrigada sempre.

Obrigada a todas e cada uma das pessoas com quem me cruze neste tempo do mestrado.

O sorriso em meu rosto não significa que minha vida é perfeita, significa que agradeço a Deus pelo que tenho, pelo que sou e pelo que conquistei.

## **EPÍGRAFE**

"Que ninguém se engane, só se consegue a simplicidade através de muito trabalho."

**Clarice Lispector.**

## RESUMO

Recentemente, sequências com homologia a proteínas inseticidas (*SpvB*) foram encontrados ocorrendo nos genomas de alguns fagos (WO) de *Wolbachia*, infectando artrópodes. A identificação dessas proteínas com esse potencial desperta o interesse na procura de fontes naturais de novos compostos para o controle de vetores e pragas agrícolas com a possibilidade de bioprospecção de moléculas com propriedades de toxinas inseticidas. Diante disso este estudo visa a Amazonia como um “hotspots” de biodiversidade do mundo, com o objetivo da obtenção e caracterização de sequências *SpvB* de origem WO em uma variedade artrópodes, dos municípios de Manaus e Presidente Figueiredo no estado do Amazonas – Brasil, por meio de um estudo ecológico exploratório. Como resultado foi isolado e caracterizado de um inseto do gênero *Crisoperla* sp., o gene do domínio *SpvB* pertencentes a um fago WO\_Sr1 integrado no genoma de uma *Wolbachia* do supergrupo B e foram analisadas sequências de fagos de *Wolbachia* contendo genes *SpvB*\_WO como pertencentes a família de fagos Sr1\_WO de depósitos do GenBank. Com este estudo foi desenvolvida uma metodologia para a detecção molecular de genes *SpvB* de fagos WO, além de comprovar que os genes *SpvB* detectada no inseto do gênero *Crisoperla* sp., e as sequências identificadas nos bancos de dados são associados exclusivamente a fagos contendo o segmento de serina recombinase 1 (Sr1), inserido nos genomas de *Wolbachia*. Este estudo abre a possibilidade para que novas pesquisas possam explorar as propriedades bioquímicas e biológicas, assim como a maneira em como esses genes *SpvB* podem afetar seus hospedeiros.

**Palavras-Chave:** Proteínas *SpvB*, fagos WO, *Wolbachia*, serina recombinase 1 (Sr1).

## ABSTRACT

Recently, sequences with homology to insecticidal proteins (SpvB) were found to occur in the genomes of some *Wolbachia* (WO) phages, infecting arthropods. The identification of these proteins with this potential raises the interest in the search for natural sources of new compounds for the control of vectors and agricultural pests with the possibility of bioprospecting molecules with properties of insecticidal toxins. In view of this, this study aims at the Amazon as a "hotspot" of biodiversity in the world, with the objective of obtaining and characterizing SpvB sequences of WO origin in a variety of arthropods, from the municipalities of Manaus and Presidente Figueiredo in the state of Amazonas - Brazil, by average of an exploratory ecological study. As a result, the SpvB domain gene belonging to a WO\_Sr1 phage integrated into the genome of a *Wolbachia* supergroup B was isolated and characterized from an insect of the genus *Crisoperla* sp., and *Wolbachia* phage sequences containing SpvB\_WO genes as belonging to the family of Sr1\_WO phages from GenBank deposits. With this study, a methodology was developed for the molecular detection of SpvB genes from WO phages, in addition to proving that the SpvB genes detected in the insect of the genus *Crisoperla* sp., and the sequences identified in the databases are exclusively associated with phages containing the segment serine reassortant 1 (Sr1), inserted into *Wolbachia* genomes. This study opens the possibility for further research to explore the biochemical and biological properties, as well as the way in which these SpvB genes can affect their hosts.

**Keywords:** SpvB proteins, WO phage, *Wolbachia*, serine recombination 1 (Sr1).

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
Bti	Bacillus thuringiensis israelensis
BOLDSYSTEM	Barcode of Life Data
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CO1	Citocromo Oxidase 1
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<i>SpvB</i>	Gene B do plasmídeo de virulência de Salmonella
°C	Grau Celsius
IC	Incompatibilidade citoplasmática
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
ITS	Internal Transcribed spacer
ML	<i>Maximum likelihood</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
NCBI	National Center for Biotechnology Information of the United States
OMS	Organização mundial da saúde
pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
PPGBIO	Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro
GP	Proteínas Gênicas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rpm	Rotações por minuto
SR1	Serina Recombinase 1

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Uma imagem da microscopia eletrônica de uma célula de <i>Aedes albopictus</i> infectada com <i>Wolbachia</i> em azul (Scott O’Neill). . . . .	24
<b>Figura 2.</b> Análises filogenético de <i>Wolbachia</i> , baseado em 365 ortogrupos de cópia única, com 25 genomas de representantes de cada supergrupo (A-J).....	25
<b>Figura 3.</b> Fenótipos induzidos por <i>Wolbachia</i> . . . . .	26
<b>Figura 4.</b> Arvore filogenética dos principais supergrupos de <i>Wolbachia</i> infectados com fagos WO.....	28
<b>Figura 5.</b> Transferência horizontal de bacteriófago WO. (a) transferência entre múltiplas infecções por <i>Wolbachia</i> em um único hospedeiro, (b) transferência horizontal dada pela transmissão paterna. . . . .	29
<b>Figura 6.</b> Sequências completas de profagos WO disponíveis,.....	30
<b>Figura 7.</b> Pontos de coleta nas áreas de estudo, zona urbana e rural dos Municípios de Manaus e Presidente Figueredo. . . . .	33
<b>Figura 8.</b> Coleta de amostras de artrópodes.....	35
<b>Figura 9.</b> Seleção de amostras e registro fotográfico dos Hexápodes. . . . .	36
<b>Figura 10.</b> Procedimento de Extração de DNA de acetato de potássio de inseto único.. . . .	37
<b>Figura 11.</b> Arvore representativo de distância de maximumlikelihood (ML), utilizando 1000 réplicas para o alvo de MLST de <i>SpvB</i> . Os agrupamentos das sequências de <i>SpvB</i> de WO, foram confirmadas com apoio de Bootstrap >50%; em destaque (vermelho) a sequência <i>SpvB_Cris</i> , junto com os valores de Bootstrap.....	46
<b>Figura 12.</b> Arquitetura genômico de fagos WO. As setas são usadas para indicar a direção na qual as sequências de genes previstas são codificadas, é destacado com uma caixa rosa o segmento de serina recombinasse Sr1, na caixa azul o gene GP27_28 e na caixa amarela a proteína <i>SpvB</i> .....	48
<b>Figura 13.</b> Arvore representativo de distância de <i>Maximum likelihood</i> (ML), utilizando 1000 réplicas para o alvo de MLST com valores de Bootstrap, para o ALVO Gp1_Cris_sp (Os agrupamentos das sequências, junto com os nomes dos alvos em destaque (vermelho). . . . .	50
<b>Figura 14.</b> Arvore representativo de distância de <i>Maximum likelihood</i> (ML), utilizando 1000 réplicas para o alvo de MLST com valores de Bootstrap, para o	

ALVO Gp1_Cris_sp (Os agrupamentos das sequências, junto com os nomes dos alvos em destaque (vermelho). .....	51
<b>Figura 15.</b> Arvore representativo de distância de <i>Maximum likelihood</i> (ML), utilizando 1000 réplicas para o alvo de MLST com valores de Bootstrap, para o ALVO Gp27_28_Cris_sp (Os agrupamentos das sequências, junto com os nomes dos alvos em destaque (vermelho).....	53
<b>Figura 16.</b> Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de bootstrap >50% para o consenso das sequência-alvos. Em vermelho: agrupamento da cepa de <i>Wolbachia</i> do hexápode da Amazônia.....	55
<b>Figura 17.</b> Fotografia de <i>Crisoperla</i> sp. Figura A: amostra coletada na área urbana de Manaus, figura B: imagem obtida do resultado no banco de dados BIOUG00864-F04 .....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> <i>Primers</i> desenhados para a detecção do gene do domínio <i>SpvB</i> . .....	38
<b>Tabela 2.</b> Protocolo de ciclagem para a detecção do gene <i>SpvB-WO</i> .....	39
<b>Tabela 3.</b> Protocolo de ciclagem para a taxonomia molecular .....	40
<b>Tabela 4.</b> Protocolo de ciclagem para caracterização de <i>Wolbachia</i> .....	41
<b>Tabela 5.</b> Protocolo de ciclagem para caracterização do fago <i>WO</i> . .....	41
<b>Tabela 6.</b> Total de amostras obtidas por local de coleta nos municípios de Manaus e Presidente Figueredo. ....	43
<b>Tabela 7.</b> Ensaio padronizado PCR “ <i>Touchdown nested</i> ” para o diagnóstico de proteínas <i>SpvB-WO</i> . ....	47
<b>Tabela 8.</b> Taxonomia molecular de hexápodes .....	58

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral .....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
4.1 Busca de novas moléculas ou compostos para o controle vetorial.....	21
4.2 <i>Wolbachia</i> endossimbionte.....	23
4.2.1 Diversidade de <i>Wolbachia</i> .....	24
4.2.2 Interações <i>Wolbachia</i> -hospedeiro artrópode.....	25
4.2.3 Usos e aplicações práticas de <i>Wolbachia</i> .....	27
4.3 Bacteriófagos WO de <i>Wolbachia</i> .....	28
4.4 Genes do motivo <i>SpvB</i> – WO.....	31
5. ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS .....	32
5.1 Tipo de pesquisa e aspectos legais .....	32
5.2 Desenho amostral .....	32
5.3 Local de realização da pesquisa.....	32
5.4 Coleta de amostras.....	34
5.5. Extração de DNA.....	36
5.6. Desenho de <i>primers</i> para detecção molecular de <i>SpvB</i> -WO.....	37
5.7. Otimização e Validação do protocolo de PCR para alvos <i>SpvB</i> -WO.....	38
5.8. Otimização e Validação do protocolo de PCR modificado para taxonomia molecular Barcoding.....	40
5.9. Caracterização de <i>Wolbachia</i> e o Fago WO.....	40
5.10 Análise filogenéticos .....	42
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
6.1 Amostras entomológicas .....	43
6.2 Desenvolvimento de uma ferramenta para identificação e caracterização de sequencias <i>SpvB</i> de origem WO.....	44
6.3 Caracterização de fagos de <i>Wolbachia</i> Sr1_WO de depósitos de GenBank.....	47
6.4 Detecção e caracterização de elemento de fago WO, classificação Sr1, a partir de um extrato de DNA hexápode .....	49
6.5 Caracterizações e isolamento de genes de <i>Wolbachia</i> de um hexápode, contendo <i>SpvB</i> _WO. ....	54
6.6 Taxonomia molecular para a identificação do artrópode hospedeiro.....	56

7. CONCLUSÕES.....	59
8. REFERÊNCIAS .....	60
9. ANEXOS.....	66
Anexo 1. Mapa de ensaios Diagnostico de Proteínas SpvB .....	66
Anexo 2. Arvore filogenético caracterização <i>Wolbachia</i> gene CoxA.....	67
Anexo 3. Arvore filogenético caracterização <i>Wolbachia</i> gene FabK .....	68
Anexo 4. Arvore filogenético caracterização <i>Wolbachia</i> gene WD0183.....	69
Anexo 5. Arvore filogenético da identificação taxonômica de <i>Crisoperla sp.</i> BOLD TaxonID Tree, Fonte: (BOLDSYSTEM).....	70
Anexo 6. Sequencias obtidas no trabalho .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade de novas estratégias para o controle vetorial que transmitem patógenos ou pragas agrícolas, centra a atenção aos inseticidas que desempenham um papel fundamental nesses programas de saúde pública como de sustentabilidade alimentar onde a procura de novos compostos e de alternativas biodegradáveis, amigáveis com o médio ambiente e a saúde humana, envolve a busca por substâncias químicas naturais ou derivados de organismos vivos que possam ser usados. De forma inovadora a utilização de bactérias endossimbiontes do gênero *Wolbachia*, amplamente difundida, estima-se que infecta mais da metade das espécies de insetos no planeta (WERREN *et al.*, 2008), chama a atenção por ter a capacidade de manipular seus hospedeiros de várias maneiras epidemiologicamente importantes (MCMENIMAN *et al.*, 2009), sendo atualmente utilizada no controle da transmissão de patógenos (BOURTZIS *et al.*, 2014).

*Wolbachia* comumente manipula seus hospedeiros para promover sua disseminação através de populações de insetos, uma maneira de fazer isso é causando o fenômeno conhecido como “matança de macho”; como a *Wolbachia* é herdada através da linha materna (da mesma forma que as mitocôndrias), os machos são um beco sem saída evolutivo para a *Wolbachia* e, portanto, a matança de machos garante que todos os descendentes de uma fêmea infectada passarão sua *Wolbachia* para a próxima geração (WERREN *et al.*, 2008), o mesmo autor sinala que *Wolbachia* também pode promover sua disseminação de maneiras mais sutis, por meio da incompatibilidade citoplasmática (IC), quando machos infectados são incapazes de produzir descendentes viáveis com fêmeas não infectadas.

As espécies de *Wolbachia* albergam um bacteriófago denominado o fago WO que infecta e se integra ao genoma da bactéria e se suspeita que o fago pode desempenhar um papel fundamental na condução dessa interação inseto-hospedeiro (METCALF *et al.*, 2012; LEPAGE *et al.*, 2013), até agora só foi demonstrado para incompatibilidade citoplasmática (LEPAGE *et al.*, 2017). Ao ser o genoma do fago WO ativo e integrado no genoma da *Wolbachia* podem codificar sequências de genes que sintetizam proteínas de amplo interesse como o caso das proteínas SpvB de origem WO (que compartilham homologia com proteínas de toxicidade e inseticidas conhecidas) e que podem ter um papel no fenótipo de matança de machos induzido

por *Wolbachia*, mas isso ainda não foi comprovado (METCALF *et al.*, 2012; LEPAGE *et al.*, 2013; CRAINEY *et al.*, 2017.). Até o momento os genes SpvB só foram descritas em genomas de fagos WO contendo o segmento denominado Serina Recombinase SR1 localizado no modulo de replicação e recombinação, e no extremo terminal da cauda do genoma de fagos WO contendo esse modulo SR1 foi descrito o homologo das proteínas SpvB-WO.

Embora relativamente poucas proteínas semelhantes a SpvB de origem WO tenham sido relatadas, mais dada a frequência com que *Wolbachia* é encontrada nos artrópodes e a frequência com que é infectada por bacteriófagos de WO, é muito provável que proteínas SpvB - WO sejam muito abundantes na natureza (KENT *et al.*, 2011; BORDENSTEIN, 2021) o que alberga a possibilidade para a bioprospecção de moléculas que possam ter um potencial inseticidas.

## 2. JUSTIFICATIVA

O controle e mitigação das doenças transmitidas por artrópodes representam um desafio contínuo à saúde pública no mundo, nesse contexto os inseticidas têm se mostrado uma ferramenta extremamente útil na luta contra essas doenças. No entanto, há uma crescente preocupação com o impacto ambiental de algumas estratégias de controle baseadas no uso de inseticidas sintéticos que relata diminuição da eficácia ao longo do tempo, bem como o uso contínuo pode causar danos à saúde humana e ao meio ambiente.

Novas moléculas baseadas em proteínas naturais com propriedades inseticidas biodegradáveis podem representar uma solução para este problema, mas relativamente poucas foram relatadas até agora. Recentemente, proteínas com homologia com proteínas inseticidas (SpvB) foram encontrados ocorrendo nos genomas de vários fagos (WO) de *Wolbachia*, onde as infecções naturais de artrópodes com *Wolbachia* são muito comuns na natureza e as integrações de fagos WO nos genomas de *Wolbachia* também são, portanto existe a possibilidade de que essas proteínas também possam ocorrer com frequência no ambiente natural, mais até o momento, não houve pesquisas dedicadas avaliando a frequência e a diversidade desses genes que sintetizam essas proteínas SpvB de origem WO.

É improvável que por serem proteínas de bacteriófagos requeiram modificações pós-traducionais complexas para manter sua funcionalidade e, portanto, provavelmente podem ser produzidas em massa e testadas para comprovar as propriedades de toxicidade, o que resultaria em inseticidas biodegradáveis, eficazes e econômicos, disponíveis em quantidades onde são necessárias.

Apesar do possível potencial dessas proteínas, no entanto, esta é a primeira pesquisa investigando especificamente a ocorrência e diversidade dessas sequências *SpvB* de origem WO. Como primeiro passo, este trabalho visará a Amazônia Brasileira um dos “hotspots” de biodiversidade mais famosos do mundo em busca de novas sequências de proteínas SpvB ocorrendo de maneira natural em uma ampla variedade de artrópodes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar sequencias *SpvB* de origem WO em uma variedade de Artrópodes, dos municípios de Manaus e Presidente Figueiredo no estado do Amazonas - Brasil.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar sequencias de gene *SpvB* de origem WO, em artrópodes dos municípios de Manaus e Presidente Figueiredo no estado do Amazonas.
- Caracterizar a *Wolbachia* e sequencias de fago WO dos artrópodes contendo o gene *SpvB*-WO.
- Identificar retrospectivamente os artrópodes positivos para genes *SpvB* usando CO1 Barcoding.

## 4. REVISÃO DA LITERATURA

Há grande interesse no estudo da interação entre artrópodes, *Wolbachia* e os fagos WO, devido às propriedades já reconhecidas que podem exercer através da transmissão. De forma inovadora *Wolbachia* está sendo usada como agente de biocontrole para diminuir a transmissão de doenças vetoriais, atualmente utilizado para reduzir a transmissão da dengue, vírus Zika (DUTRA *et al.*, 2015, 2016) e outro patógenos (BOURTZIS *et al.*, 2014). Estudos recentes fornecem informações relacionadas aos elementos móveis (fagos) que estão integrados ao genoma de *Wolbachia* e que podem conferir propriedades em seus hospedeiros, como a ocorrência de proteínas SpvB de origem WO, que abre a possibilidade de obter ferramentas de controle inovadoras que possam contribuir na problemática de saúde pública global.

### 4.1 Busca de novas moléculas ou compostos para o controle vetorial

Segundo a Organização mundial da saúde (OMS) vários são os fatores que têm aumentado o risco de propagação de patógenos transmitidos por vetores como à urbanização não planejada, aumento na mobilização de pessoas, migrações e mercadorias, mudanças ambientais e desafios biológicos, como vetores resistentes aos inseticidas comumente utilizados e cepas de patógenos em evolução (WHO, 2017). O combate de vetores centra a atenção ao abordagens das intervenções inovadoras necessária para avançar no desenvolvimento de novas ferramentas para o controle de vetores.

Uma das principais estratégias para o controle vetorial, é o uso de inseticidas que desempenham um papel fundamental na gestão eficaz dos programas de doenças transmitidas por artrópodes, mas o surgimento de populações de vetores resistentes a inseticidas representando um desafio contínuo para todos esses programas e cria uma necessidade contínua de procurar novas moléculas susceptíveis (HEMINGWAY *et al.*, 2000). No entanto, o uso contínuo de produtos químicos também apresenta riscos na saúde humana e ao meio ambiente que pode levar à resistência a inseticidas, principalmente em países endêmicos (VAN DEN BERG *et al.*, 2021). Nesse contexto Hemingway e

colaboradores (2000), manifestam que a criação de novas moléculas de inseticidas sintéticas é uma maneira de enfrentar esse desafio, mas há uma preocupação crescente pôr os danos que possam causar aos ambientes em que são usados, isso é devido a que muitos dos inseticidas podem persistir por muito tempo no ambiente e, portanto, podem representar riscos ecológicos e/ou ambientais de longo prazo. Embora esses inseticidas como os piretróides que são os mais utilizados, sejam geralmente considerados menos perigosos em comparação com os inseticidas organoclorados ou organofosforados; não tem sido comprovado que qualquer um deles seja ecologicamente menos tóxico (DEVINE *et al.*, 2007).

Alternativas como os larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), representam soluções ecológicas a diferença dos inseticidas químicos conhecidos; no entanto, as evidências não recomendam o uso de (Bti) como agente único no controle o que faz necessário a combinação com outros agentes químicos (BOYCE *et al.*, 2013). Uma nova fonte de inseticidas biodegradáveis ecologicamente amigável poderia, assim, fornecer uma ferramenta bem-vinda tanto para o controle de doenças transmitidas por vetores quanto para a sustentabilidade alimentar, isso apoiado com as legislações para o combate dos efeitos noivos dos resíduos no meio ambiente, enfatizando a necessidade de avaliar uma variedade de alternativas biológicas (CRAMPTON, 1994).

Assim, baseados no fato que a natureza abriga uma grande diversidade de organismos e de compostos químicos com propriedades biológicas atraentes, (JOSHI *et al.*, 2014), os investigadores e as indústrias buscam identificar e avaliar o potencial desses achados, sendo muitos os estudos da exploração de compostos para uso humano, assim como há demanda das indústrias farmacêutica, agro e alimentícia tem ido em aumento com o passar dos anos (MÜLLER; OBERMEIER; BERG, 2016).

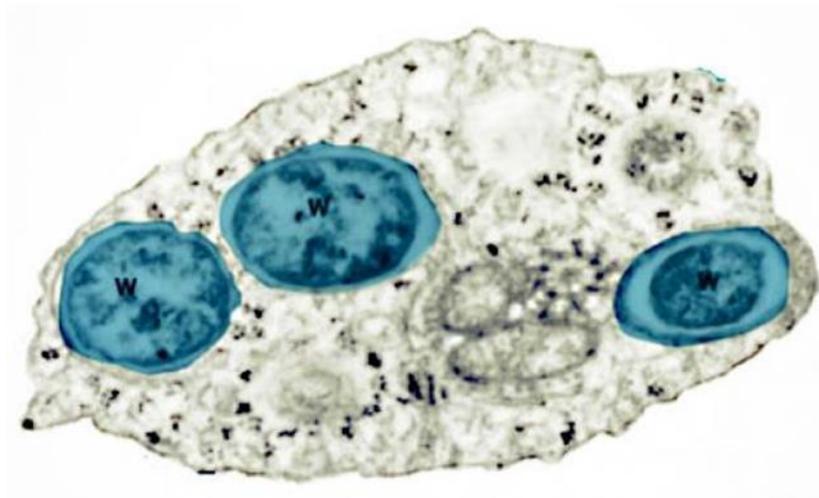
Novas alternativas estão sendo desenvolvidas, por exemplo a utilização de bactérias do gênero *Wolbachia*, que atualmente são objeto de interesse, pela capacidade que tem de manipular seus hospedeiros que pode estar associado diretamente as funções da *Wolbachia* ou dos bacteriófagos WO que tem inserido no genoma da bactéria e proporcionam certas propriedades na interação com os hospedeiro artrópodes, além de codificar sequências de genes que sintetizam

proteínas de amplo interesse por compartilhar homologia com proteínas inseticidas conhecidas (CRAINEY *et al.*, 2017a). Na atualidade o uso de *Wolbachia* tem se tornado cada vez mais importante, para o enfrentamento de doenças, diversos estudos têm demonstrado a capacidade de *Wolbachia* ao serem usada nos programas de controle de doenças transmitidas por vetores como a malária e dengue e outro patógenos.

#### 4.2 *Wolbachia* endossimbionte

*Wolbachia* são bactérias endossimbiontes, pertencentes às Alfabroteobactérias (JOHN H. WERREN, 1995), que infectam uma ampla variedade de artrópodes, com uma estimativa de cerca do 40% no mundo, incluindo 52% dos artrópodes aquáticos, mais do 60% das espécies de insetos terrestre e voadores, incluindo vetores de importância clínica e alguns nematoides filares (TANAKA *et al.*, 2009; ZUG; *et al.*, 2012; BOURTZIS *et al.*, 2014; CRAINEY *et al.*, 2017; SAZAMA *et al.*, 2017).

O gênero *Wolbachia* (Figura 1) são organismos procariotos, gram-negativos, intracelulares obrigatórios, pertencentes à ordem Rickettsiales, foram relatadas pela primeira em mosquito da espécie *Culex pipiens*, especificamente dentro do tecido reprodutivo (HERTIG; WOLBACH, 1924). Na atualidade o interesse por bactérias do gênero *Wolbachia* é dado principalmente por abundância e ampla distribuição das cepas e pelos efeitos que exerce sobre os hospedeiros (WERREN; *et al.*, 2008). Outros autores sinalam que *Wolbachia* pode impactar aspectos epidemiológicos em vetores de interesse em saúde pública e aspectos da biologia de insetos, como a longevidade, refratariedade a infecções tornando-se objeto de pesquisadores e de programas de controle vetorial (CRAINEY *et al.*, 2017a).

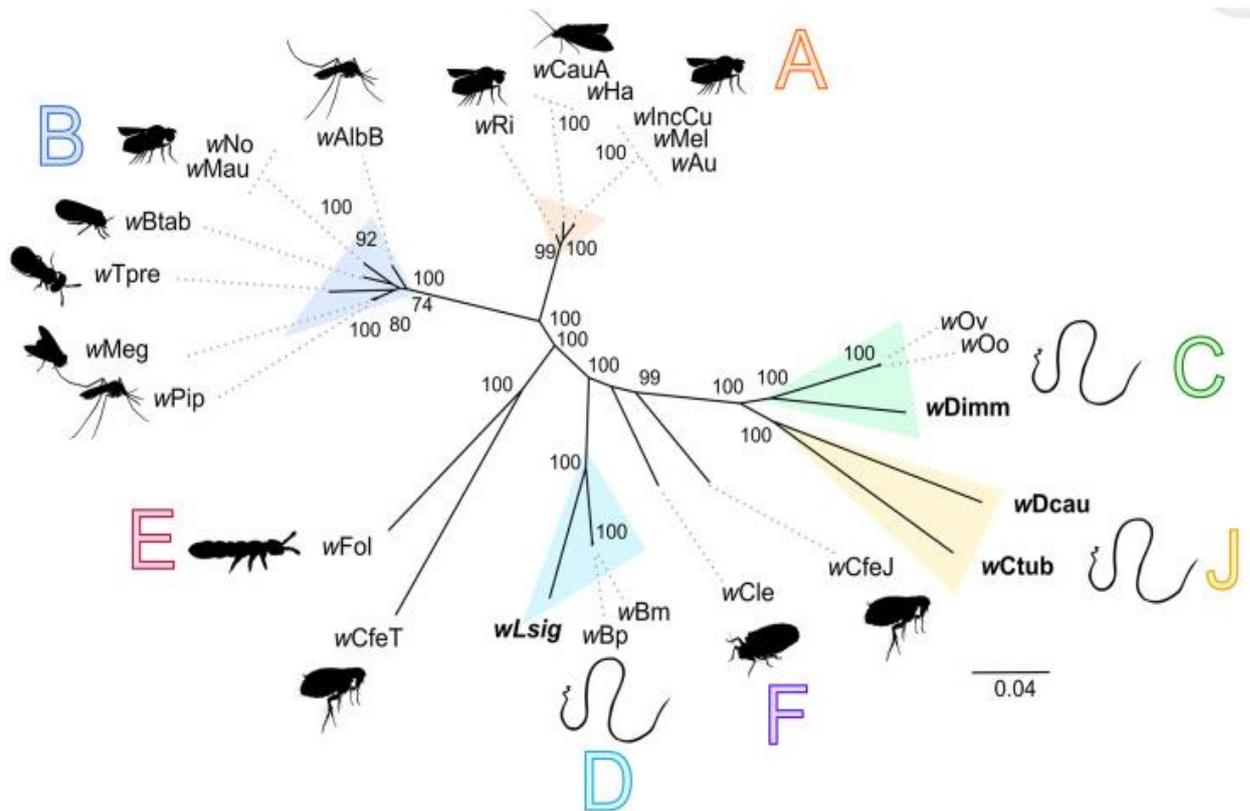


**Figura 1.** Uma imagem da microscopia eletrônica de uma célula de *Aedes albopictus* infectada com *Wolbachia* em azul (Scott O'Neill).

O endossimbionte pode se alojar principalmente dentro dos tecidos reprodutivos dos artrópodes, glândulas salivares, cérebro, músculo de seu hospedeiro e a transmissão pode ocorrer verticalmente através da linha materna (ZUG; HAMMERSTEIN, 2012a), mas ocasionalmente pode ocorrer a transmissão horizontal entre algumas espécies (LI *et al.*, 2017)

#### **4.2.1 Diversidade de *Wolbachia***

Diversos estudos têm permitido descrever a diversidade de cepas de *Wolbachia* (Figura 2.), essa classificação foi baseada nas análises filogenéticas de diversas regiões do genoma, categorizando as cepas em vários supergrupos infectando a distintos hospedeiros (BORDENSTEIN *et al.*, 2008) o mesmo autor sugere que existência ao menos 7 supergrupos (A-F, H), mais recentemente foram descritos até 13 supergrupos, algum deles exclusivos de certos hospedeiros, (LEFOULON *et al.*, 2020; KAUR *et al.*, 2021;).



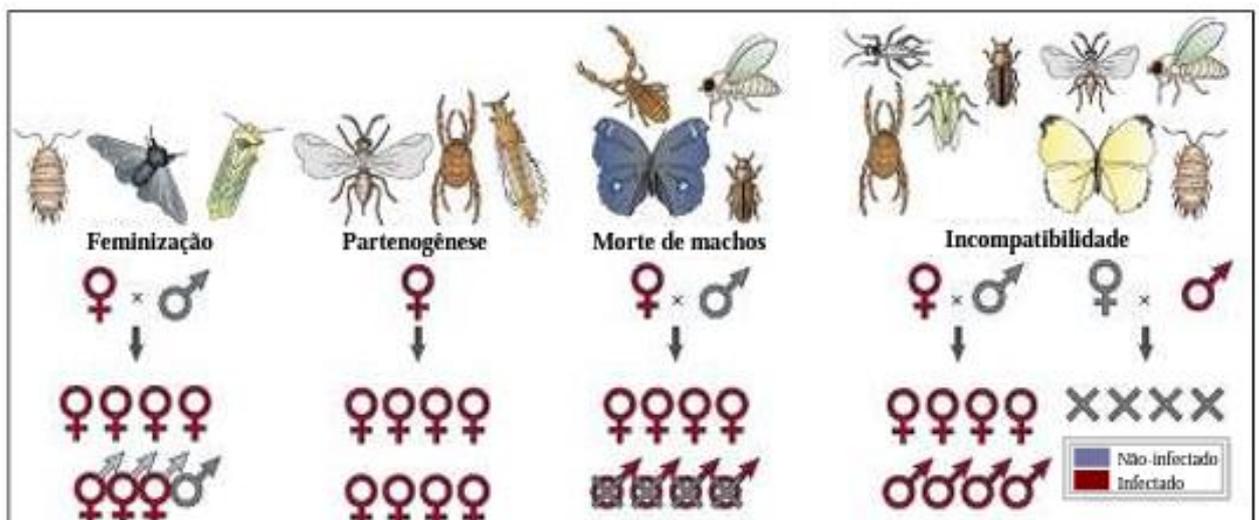
**Figura 2.** Análises filogenético de *Wolbachia*, baseado em 365 ortogrupos de cópia única, com 25 genomas de representantes de cada supergrupo (A-J). Fonte: (LEFOULON *et al.*, 2020)

A grande maioria de cepas de *Wolbachia*, descritas até o momento, se encontram nos supergrupos A e B, que são amplamente distribuídos em muitos táxons de artrópodes, os subgrupos C e D são exclusivos e benéficos de alguns nematoides filaríeis, as cepas de *Wolbachia* do supergrupo F podem infectar artrópodes e nematoides filaríeis (LEPAGE; BORDENSTEIN, 2013), e outros supergrupos parecem ser específicos para certos hospedeiros (GLOWSKA *et al.*, 2015).

#### 4.2.2 Interações *Wolbachia* -hospedeiro artrópode

As cepas de *Wolbachia* tem a capacidade de manipular a biologia reprodutiva de seus hospedeiros para garantir que seja passado as próximas gerações em altas frequências, mas uma vez infectado o hospedeiro ele pode sofrer certas alterações (figura 3). A primeira vez que foi detectado, foi realizando umas

teste de cruzamento de espécies de *Culex pipiens*, no ano 1950, e foi observado que eram poucos os nascimentos ou nenhum nascido (GHELELOVITCH, 1952), isso gerado por certo grau de incompatibilidade, que posteriormente foi denominado Incompatibilidade Citoplasmática (IC) (LAVEN, 1951), atualmente a IC gerada por *Wolbachia* foi demonstrada em muitos táxons de insetos (YEN; BARR, 1971; WERREN *et al.*, 2008) e é definida como um defeito entre os cruzamentos de cepas de machos infectados como *Wolbachia* e fêmeas não infectadas ou infetadas com uma cepa diferente do macho, isso resulta em níveis de morte embrionária elevada (LEPAGE; BORDENSTEIN, 2013). Entre as outras alterações exercidas por *Wolbachia* no hospedeiro se encontra a Feminização, que consiste na transformação das gerações de machos em fêmeas funcionais; a Partenogênese é a reprodução assexuada onde os embriões se desenvolvem a partir de óvulos não fertilizados, e por último a Matança de machos que consiste na morte de embriões masculinos (KENT; BORDENSTEIN, 2010; LEPAGE; BORDENSTEIN, 2013).



**Figura 3.** Fenótipos induzidos por *Wolbachia*. (Fonte: Werren, 2008).

Muitas ordens de artrópodes que são afetadas por os diferentes fenótipos reprodutivos da *Wolbachia*, entre elas temos que a feminização afeta principalmente a as ordens de Hemíptera, Isópode e Lepidoptera; a partenogênese é dada nas ordens Acari, Himenóptera e Thysanoptera; a matança de machos pode afetar as ordens Coleóptera, Díptera Lepidoptera e Pseudoscorpídeos e a IC em

Acari, Coleóptera, Díptera, Himenóptera, Hemíptera, Isópode, Lepidoptera e Ortóptera (WERREN *et al.*, 2008).

#### 4.2.3 Usos e aplicações práticas de *Wolbachia*

Atualmente o potencial das bactérias do gênero *Wolbachia* está sendo amplamente utilizado como agente de bio- controle em diversos programa que tentam diminuir a transmissão das doenças vetoriais e para o controle de pragas de insetos (TANAKA *et al.*, 2009). Um dos principais programas que utiliza a *Wolbachia* é o “*World Mosquito Program*” implementado desde o ano 2011 em vários países, incluído Brasil, e consiste na liberação de mosquitos *Aedes aegypti* inoculados artificialmente com *Wolbachia*, para a expansão da população de mosquitos infectados, o que reduz o risco de propagação do vírus da dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela (DUTRA *et al.*, 2015, 2016; O’NEILL, 2018).

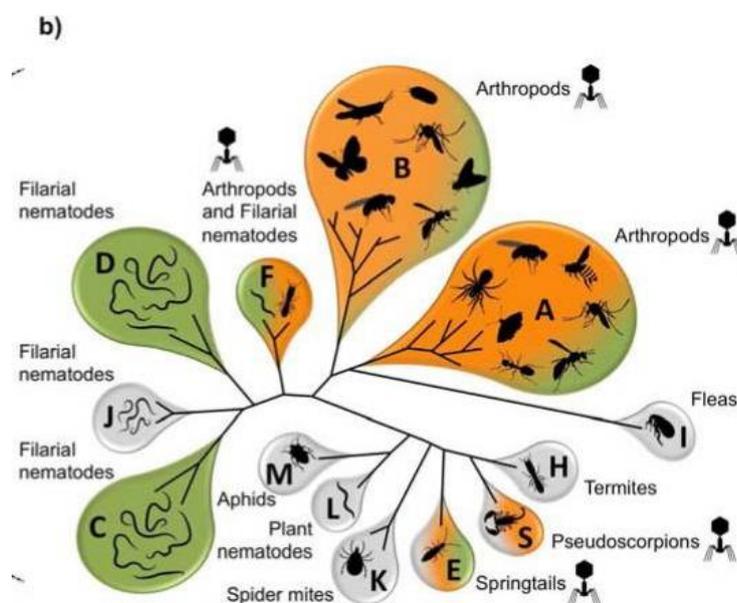
Recentemente, outro estudo logro a infecção artificial de ovos de mosquitos *Anopheles gambiae*, com cepas de *Wolbachia*, induzindo a altos níveis de transmissão materna, como resultado nos mosquitos mostram IC e refratariedade à infecção por *Plasmodium* sp. (BIAN *et al.*, 2013; LEPAGE; BORDENSTEIN, 2013). Além disso, alternativas para o uso de *Wolbachia* no combate de doenças filarias, como terapias antimicrobianas dirigidas a *Wolbachia* o que pode afetar diretamente os parasitas (TAYLOR *et al.*, 2005; JOHNSTON *et al.*, 2017).

O endossimbionte de *Wolbachia* e infetado por bacteriófagos da família de fagos WO e muito se suspeite que poderia desempenhar um papel importante nessa interação ou manipulação inseto-hospedeiro (LEPAGE *et al.*, 2017), por meio dos elementos moveis, capazes de produzir partículas proteicas que podem fornecer ferramentas para a manipulação genética da bactéria e de alguma forma afetar seu hospedeiro (TANAKA *et al.*, 2009).

### 4.3 Bacteriófagos WO de *Wolbachia*

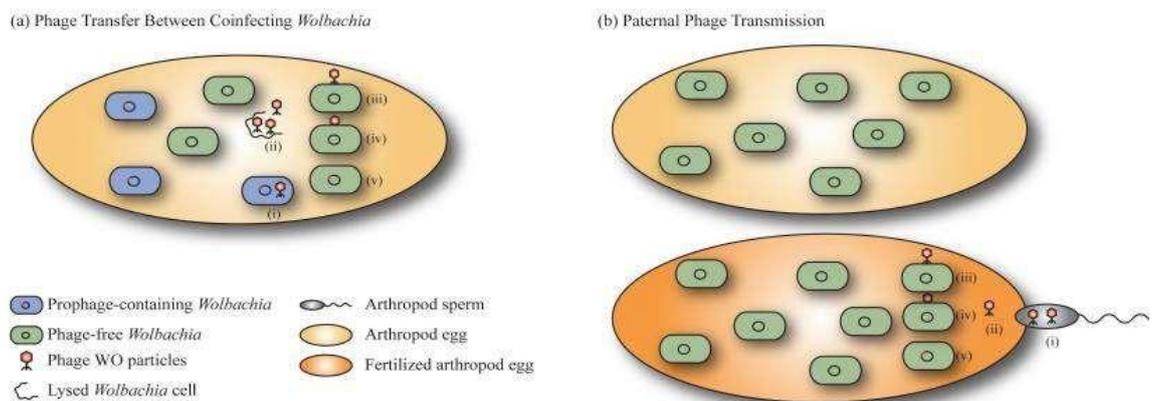
Os fagos são vírus amplamente difundidos que infectam e se integram nos genomas das bactérias para poder replicar seu próprio ácido nucleico e sintetizar proteínas (GAVOTTE *et al.*, 2006). Muitas bactérias que mudam de hospedeiro frequentemente, hospedam elementos móveis (DNA móvel), permitindo transmissão de material genético de um organismo para outro (KENT *et al.*, 2011b), isso é mais comum em bactérias de vida livre, ao contrário das bactérias intracelulares obrigatórias, porém *Wolbachia* é um alvo de transferência de genes ou elementos móveis mais estudado (KENT *et al.*, 2011a; KLASSON *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2004).

Os fagos WO são conhecidos como a família de bacteriófagos que infectam a *Wolbachia*, sendo dos raros casos de infecção de fagos em uma bactéria intracelular obrigatória (STOREY *et al.*, 1989), e é atribuído que WO pode contribuir em certos fatores importantes das alterações reprodutivas que induzem em seus hospedeiros (GAVOTTE *et al.*, 2006). Esses fagos WO são amplamente difundidos, ocorrendo pelo menos em diferentes cepas de 5 supergrupos de *Wolbachia*: A, B, E, F e S, figura 4, (BORDENSTEIN, 2004; KAUR *et al.*, 2021; LEFOULON *et al.*, 2020).



**Figura 4.** Arvore filogenética dos principais supergrupos de *Wolbachia* infectados como fagos WO. Fonte (KAUR *et al.*, 2021).

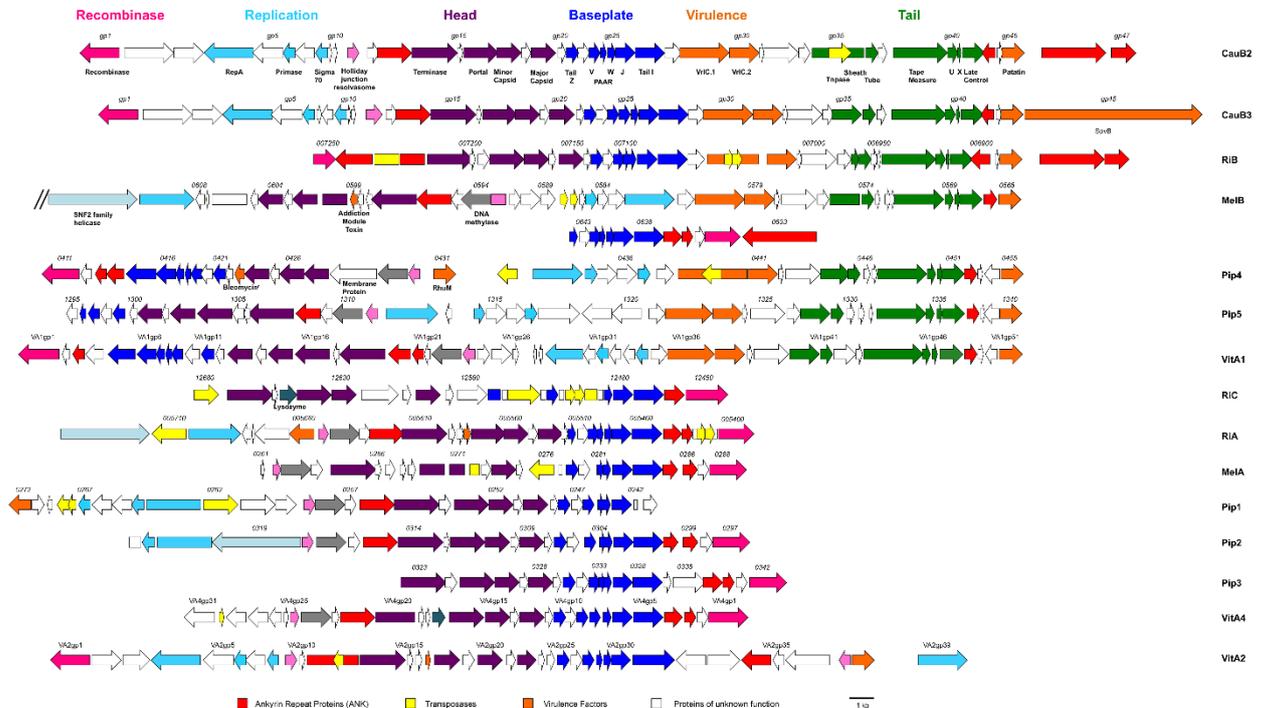
WO são fagos temperado com dois estados, um estado lítico onde a produção de partículas de fago levam a lises e morte da *Wolbachia* (BORDENSTEIN *et al.*, 2006), e um estado lisogênico que pode envolver transmissão vertical e transferência horizontal (KAUR *et al.*, 2021), essa transferência horizontal pode ocorrer de duas maneiras (figura 5), a primeira e dada por múltiplas infecções por diferentes cepas de *Wolbachia* em um único hospedeiro, o fago WO lisa a bactéria e as partículas soltas se liga a uma *Wolbachia* livre, o outro mecanismo de transferência horizontal é a transmissão paterna de um macho infectado para uma fêmea carregando uma *Wolbachia*, onde o fago transportado pelo macho é liberado e pode infectar *Wolbachia*. (KENT; BORDENSTEIN, 2010).



**Figura 5.** Transferência horizontal de bacteriófago WO. (a) transferência entre múltiplas infecções por *Wolbachia* em um único hospedeiro, (b) transferência horizontal dada pela transmissão paterna. Fonte: (KENT; BORDENSTEIN, 2010)

Existem cepas de *Wolbachia* contendo fagos com a estrutura completa, composta de cabeça, placa de base e cauda, que são os módulos essenciais para seu funcionamento, mas também podem existir outras que abrigam um fago WO completo e profagos WO adicionais que são degenerados e inativos denominados pseudofagos (figura 6) (METCALF; BORDENSTEIN, 2012), esses fagos ativos são considerados como partículas efectoras que codificam suas próprias proteínas (TANAKA *et al.*, 2009), e os profagos parciais, aqueles que carecem de um desses

módulos são inativos por si mesmos mais poderiam usar as proteínas codificadas por um fago funcional e completar sua montagem (KENT *et al.*, 2011b)



**Figura 6.** Sequências completas de profagos WO disponíveis, fonte: (KENT *et al.*, 2011b)

Foi descrito que os fagos WO podem fornecer genes e proteínas envolvidas diretamente na biologia tanto da *Wolbachia* como do hospedeiro artrópode, comprovado com os genes *cifA* e *cifB*, que são genes transcritos no módulo do fago WO, da cepa de *Wolbachia* w Mel, que recapitulam e aumentam a incompatibilidade citoplasmática IC (LEPAGE *et al.*, 2017), desse modo outros achados sugerem que a diversidade de genes e proteínas podem estar envolvida em muitos aspectos importantes da interação (KENT; BORDENSTEIN, 2010). Um desses genes que foram encontrados dentro do genoma de WO, localizado no módulo da cauda, na extremidade 3', identificados como *SpvB*, descrito na cepa de WOCauB3 (TANAKA *et al.*, 2009), posteriormente relatada na cepa WODamA (Crainey *et al.*, 2017), o interesse nessa descoberta é baseado na homologia do gene *SpvB* com sequências de proteínas bacterianas de uma família

de toxinas inseticidas em *Salmonella* entérica, o último autor sugere que poderiam ser moléculas funcionais em diferentes cepas de *Wolbachia* e que poderiam afetar processos celulares e funções da bactéria e seu hospedeira inseto.

#### 4.4 Genes do motivo *SpvB* – WO

Como foi descrito anteriormente no segmento da cauda, de alguns genomas de fago WO, foram identificados genes com motivos de sequência relacionados à virulência bacteriana, o gene B do plasmídeo de virulência de *Salmonella* (*SpvB*). Crainey e colaboradores (2017), relataram a ocorrência dessa proteína na cepa WOWDamA com um 85% de correspondência com sequências dos genes *Spv* em *Salmonella* e outras semelhanças, todas com proteínas de toxicidade bacterianas.

O gene *SpvB* em *Salmonella*, tem sido implicado na sobrevivência e crescimento intracelular, presentes em uma região conservada da bactéria (SUN *et al.*, 2020), entre as atividades bioquímicas relatadas indicam que possui um domínio N-terminal, pertencente à família de proteínas bacterianas descritas como toxinas e um domínio é o C-terminal, requerido para a produção da F-actina, essencial para o funcionamento celular (GUINEY; FIERER, 2011).

Neste contexto, as evidências recentes sugerem que os genes que codificam toxinas proteicas secretadas pelos endossimbiontes desempenham algum papel como acontece com os genes *cifA* e *cifB*, e que os benefícios dos genes *SpvB* reportados em *Salmonella* poderiam ter efeitos na interação do fago WO- *Wolbachia* - artrópode. Uma hipótese planteada por Massey e colaboradores (2022) é que *Wolbachia* também dependem da ação de toxinas e proteínas como um mecanismo para infectar seus hospedeiros.

A identificação dessas proteínas com esse potencial, que contém significativa homologia com toxinas conhecidas em outros sistemas modelo, desperta o interesse na procura de fontes naturais que possam ser caracterizadas e estudadas com a possibilidade de futura bioprospecção de novas moléculas com propriedades de toxicidade ou inseticidas.

## 5. ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS

### 5.1 Tipo de pesquisa e aspectos legais

Este é um estudo ecológico exploratório que visa identificar a presença de genes do domínio *SpvB* de origem WO em uma ampla variedade de artrópodes dos municípios de Manaus e Presidente Figueiredo no estado do Amazonas do Brasil.

O projeto é vinculado na linha 2 de pesquisa do programa PPGGIO: Bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores, na área temática de bioprospecção da biodiversidade amazônica para novos compostos antimicrobianos

### 5.2 Desenho amostral

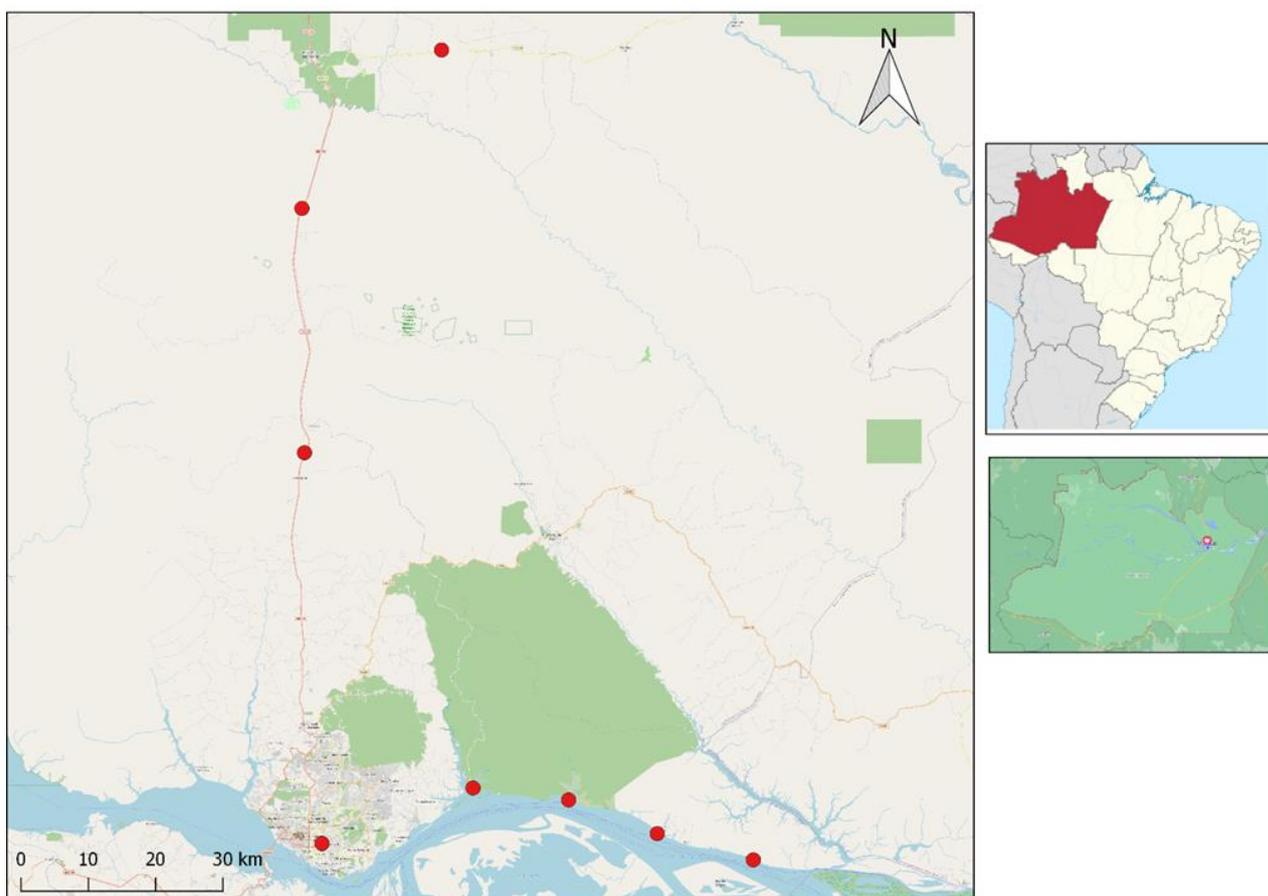
Baseados na literatura onde ao início do presente projeto haviam sido relatadas três sequências de *SpvB*\_WO, (WOcauB3, Sr1WOSdam e wNo) CRAINEY *et al.* (2017), e apenas uma sequência de *SpvB* dentro dos 25 genomas completos de *Wolbachia* relatados por LEFOULON *et al.* (2020), o cálculo amostral foi fundamentado em que cerca do 4% dos insetos infectados com *Wolbachia* poderiam conter genes *SpvB*, além disso cerca do 40% dos artrópodes tem *Wolbachia* (ZUG; HAMMERSTEIN, 2012) o que reduz perto do 1.6% de possibilidade de identificar artrópodes aleatoriamente contendo genes de *SpvB*. A estimativa para o número de amostras de acordo como os dados recolhidos foi de 1000 artrópodes para obter mais de 10 amostras positivas por *SpvB*. A metodologia de amostragem foi realizar uma coleta rápida de artrópodes da região amazônica

### 5.3. Local de realização da pesquisa

A fim de coletar um grande variedade de artrópodes de diferentes espécies, as áreas de coleta selecionada foram os município de Manaus localizado às margens do Rio Negro, 3°06'00"S 60°01'00"W, capital do extenso estado do

Amazonas, com área de 11.401 km<sup>2</sup> (IBGE, 2021), e o município de Presidente Figueredo, localizado ao interior do estado do Amazonas, - 2°01'02"S 60°01'30"W, com área de 25.422.235 km<sup>2</sup> segundo dados do IBGE, municípios do estado de Amazonas-Brasil, localizado na região Norte do país.

Os pontos de amostragem foram distribuídos nesses dois municípios (figura 7), têm sido considerados áreas de estudo tanto na zona urbana como na zona rural por possuírem uma diversidade de ecossistemas como áreas ecológicas e de extensa vegetação, fontes hídricas, assentamentos humanos, com uma grande biodiversidade de espécies de artrópodes, alguns de importância em saúde pública. Além de isso, são locais de fácil acesso com facilidade no apoio logístico e técnico para realização das coletas.



**Figura 7.** Pontos de coleta nas áreas de estudo, zona urbana e rural dos Municípios de Manaus e Presidente Figueredo. Fonte: (“OpenStreetMap”, 2022).

#### 5.4. Coleta de amostras

Para a coleta de artrópodes, foram utilizadas duas metodologias de amostragem:

- Amostras por conveniência: amostras coletadas no marco de projetos de pesquisa do laboratório EDTA do ILMD/Fiocruz Amazônia, principalmente artrópodes de interesse em saúde pública dos municípios de Manaus e Presidente Figueredo.
- Amostra aleatória simples: por meio de busca ativa de artrópodes de vida livre, terrestres e aquáticos nos municípios de Manaus e Presidente Figueiredo

Para a coleta de artrópodes de vida livre (figura 8), foram utilizados diferentes métodos de coleta simples como: capturadores manuais, que consistem em um tubo de acrílico transparente provido de uma tela fina em uma das extremidades, a qual se liga a uma mangueira para a sucção, é usado principalmente para capturar artrópodes em estado de repouso em diversas superfícies. Para capturar artrópodes durante o voo, se utiliza rede entomológica, formada por um puçá de tule, sustentado por um aro de metal, preso a um cabo de alumínio; os indivíduos terrestres foram capturados e transferidos para tubos de preservação por meio de pinças entomológicas reta de aço inoxidável, os artrópodes aquáticos, foram capturados com armadilha tipo *surber*, que consiste em um suporte de plástico rígido e tecido de nylon e para a coleta de artrópodes adultos, armadilhas luminosas tipo CDC, consiste em um ventilador invertido preso a uma bolsa de malha fina e alimentado por uma bateria de 12 volts, na parte superior possui uma fonte de luz amarela, para que os insetos sejam atraídos pela luz e ao se aproximarem são sugados pelo ventilador e empurrados para dentro do saco ou gaiola.



**Figura 8.** Coleta de amostras de artrópodes. Fonte: Arquivo pessoal.

As amostras coletadas, foram depositadas em tubo Falcon de 50 ml contendo álcool etílico 99,5% e levadas ao laboratório do Instituto Leônidas e Maria Deane ILMD.

Para a seleção das amostras e baseado no cálculo amostral, o critério de inclusão para o estudo ficou restrito a artrópodes pertencentes ao subfilo Hexápoda, sendo este um agrupamento taxonômico amplo mais que compreende todos os insetos (MICHAEL ALLABY, 2023). Considerando que a identificação dos hexápodes é muito simples para nossa equipe que não tinha pessoal capacitado para taxonomia clássica, foi possível separar rapidamente e individualizar as amostras, além disso, para ter representatividade na diversidade de espécies, foram selecionadas um máximo de 2 indivíduos com características morfológicas macroscópicas semelhantes por ponto de coleta, não obstante uma mesma espécie poderia ser repetida devido ao número de localidades de amostragem.

Após a triagem para a seleção e individualização dos hexápodes coletados, foi realizada a descrição das características morfológicas e registro fotográfico de cada espécimen (figura 9), para fornecer suporte para as identificações moleculares retrospectivas.



**Figura 9.** Seleção de amostras e registro fotográfico dos Hexápodes Fonte: Arquivo pessoal.

### 5.5. Extração de DNA

Com a finalidade de avaliar uma ampla variedade de espécies de Hexápodes, foi feita a extração de DNA “*in house*”, proposto por (COCKBURN *et al.*, 1988; CRAINEY *et al.*, 2005), usando a técnicas de maceração com pistilos e o protocolo modificado de extração de DNA de acetato de potássio de inseto único, trocando o acetato de potássio por acetato de sódio. Devido à diversidade de espécies coletadas, o procedimento de extração foi padronizado para usar até uma grama de cada amostras, usando principalmente da região do abdômen onde se localiza os órgãos reprodutivos que abrigam a *Wolbachia* em maior abundância, as amostras com peso inferior a 1 grama, foi extraído o indivíduo completo, as amostras foram acondicionadas em microtubos individuais, maceradas com pistilos junto com 200 $\mu$ l tampão de lises (SDS 1%), levadas a incubação a 68 °C por 12 minutos, após, foi adicionado 100 $\mu$ L de acetato de sódio 3M (pH 5,2) por 15 minutos em gelo, duas rodadas de centrifugação (14000rpm por 3 minutos) foi feita removendo o pellet entre cada uma rodada, foi adicionado três volumes de

Etanol Absoluto gelado e posteriormente refrigerado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  *overnight*. Após a incubação o homogenato foi centrifugado a alta revolução por 10 minutos, descartando sobrenadante. O *pellet* foi lavado com  $100\mu\text{L}$  de Etanol ao 70% com duas rodadas de centrifugação, descartando cuidadosamente o sobrenadante. Para finalizar foi adicionado  $100\mu\text{L}$  de Etanol absoluto e centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos o excesso de álcool foi removido deixando o *pellet* secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensão em  $35\mu\text{L}$  de água destilada e armazenado  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o processamento.



**Figura 10.** Procedimento de Extração de DNA de acetato de potássio de inseto único.  
Fonte: Arquivo pessoal.

### 5.6. Desenho de *primers* para detecção molecular de *SpvB-WO*

Sendo este o primeiro estudo dedicado à identificação do gene do domínio *SpvB* - WO, foi necessário desenhar os *primer* (tabela 1), por meio de pesquisas BLAST usando sequências de genes semelhantes a *SpvB* de origem WO já caracterizadas no banco de dados público do *National Center for Biotechnology Information of the United States* (NCBI), as sequências de genes *SpvB-WO* conhecidas, foram alinhadas com genes semelhantes a *SpvB-WO* identificadas pelo GenBank, e usando o programa Primer3web foram projetados os *primers* usados para os processos de detecção molecular. A seleção de *primer* e pequenos ajustes manuais foram feitos usando alinhamento por meio do programa ClustalX.

**Tabela 1.** *Primers* desenhados para a detecção do gene do domínio *SpvB*.

Alvo Proteína única do domínio SpvB	<i>Primers</i>	Sequências de Referência
F1-SvpB_fi_529: 53,480	5' CCAAAGGTGGTGGTGCTATT 3'	<i>SpvB</i> : KY695241
F2-SvpB_fi_int_291 54,100	5' TCGTTCACTGGCACAGGTAG 3'	
R1-SvpB_ri_int_291: 54,423	5' AAATAAACCTTCAACTCGTGG 3'	
R2-SvpB_Ri_529 54,526	5' AAATTTGTGCTTGYTYATTCTTACCA 3'	<i>SpvB</i> : AB478516
F3-SvpB_fii_870: 54,801	5' GCACAYTACAGGATTTGCAGT 3'	
R3 SvpB_R_RC_fii 54,801	5' ACTGCAAATCCTGTARTGTGC 3'	
F4-SvpB_Fii_int_537: 54,936	5' AAGAGCGGTAAARCARGTTG 3'	
R4-SvpB_Rii_int_537: 55,271	5' GTACCCAGCAAACCTTGAA 3'	
R5_SvpB_Rii_870: 55,398	5' TCCATCACCATTTGGTCTGA 3'	

Os genomas de W<sup>O</sup>W<sup>D</sup>amA com acesso nos bancos de dados (KY695241) e o genoma de W<sup>O</sup>cauB3 com acesso (AB478516) foram usadas para desenhar 9 *primers* diferentes que foram avaliados com uma variedade de combinações para a reação em cadeia da polimerase PCR “*nested*” na detecção do gene *SpvB*-W<sup>O</sup>.

### 5.7. Otimização e Validação do protocolo de PCR para alvos *SpvB*-W<sup>O</sup>

Um conjunto de 14 ensaios de PCR “*nested*” com os 9 *primers* foram desenhados para a detecção dos genes *SpvB*-W<sup>O</sup> com diferentes tamanhos de pares de bases (pb). Frente a isto, 100 amostras foram testadas com cada uma das combinações (anexo 1), com diferentes protocolos de PCR para padronização dos ciclos e temperaturas de reação tabela 2, a seleção final do protocolo foi uma PCR “*Touchdown nested*”.

**Tabela 2.** Protocolo de ciclagem para a detecção do gene *SpvB*-WO

<i>Etapa</i>	<i>Protocolo</i>	<i>Ciclos</i>
<i>Primeira reação</i>	94°C–1 minuto	10 x
	60°C–1 minutos	
	72°C–2 minutos	
	94°C–1 minuto	35 x
<i>Segunda reação</i>	55°C–1 minutos	1 x
	72°C–1 minutos	
	72°C–10 minutos	55 x
	94°C–1 minuto	1 x
	53°C–1 minutos	
72°C–2 minutos	1 x	
	72°C–10 minutos	

Todas os ensaios de PCRs foram realizadas para um volume de reação de 25 µl, utilizando o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega, EUA), segundo as instruções do fabricante: 5µl de Tampão para PCR [5X]; 0,1µl de cada um dos *primers* em concentração de 100µM; 2µl de MgCl<sub>2</sub> em concentração de 25mM; 0,5µl de DNTPs em concentração de 10mM; 0,1µl de GoTaq Polimerase em concentração de 5U/uL; 2,5µl de DNA da amostra e 14,7µl de água destilada estéril. Com os produtos das PCR foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5% baseado no protocolo de (SAMBROOK; RUSSELL, 2011), utilizando como amostra o amplicon da segunda reação, com um marcador de peso molecular *Ludwig Biotec ladder* 100 pb (0,1 µg/µL). O resultado foi visualizado em o sistema de imagem *Invitrogen iBright* com câmera 9,1 MP de alta resolução.

As PCRs que apresentaram banda única e tamanho de fragmento esperado, foram purificadas utilizando o kit QIAquick PCR Purification (250), conforme instruções do fabricante e sequenciadas na plataforma de genômica RPT01H do ILMD Fiocruz, e algumas outras na plataforma de sequenciamento Fiocruz Rondônia, utilizando o Kit BigDye® Terminator v3.1. As sequências obtidas foram alinhadas e editadas através do programa GeneDoc MFC (versão 2.7.0.0); as sequências-consenso foram comparadas com bancos de dados Genbank através da ferramenta BLASTn.

### 5.8. Otimização e Validação do protocolo de PCR modificado para taxonomia molecular Barcoding do hexápode.

Após a confirmação dos resultados do diagnóstico do gene *SpvB*, as amostras positivas foram submetidas a PCR para taxonomia molecular e identificação do inseto (Barcoding), baseado em sequências de DNA mitocondrial do gene Citocromo Oxidase I (COI) (HEBERT *et al.*, 2003). Foi realizada uma modificação ao protocolo, utilizando uma combinação de *primers* LCO1490 e HCO2198 (FOLMER *et al.*, 1994), e os *primers* LUNT1996F e LUNT1996R (LUNT *et al.*, 1996), para uma reação de PCR “*nested*”.

**Tabela 3.** Protocolo de ciclagem para a taxonomia molecular

ALVO	PRIMERS	TAMANHO PB	CICLAGEM	CICLOS
COI + LUNT	LCO1490_F1: GTCAACAAATCATAAAGATATTGG LUNT1996_R1: TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	1º Ciclo: 1500 pb	94°C–1’ 45°C–2’ 72°C–2’ 72°C–10’	40X
COI	LCO1490_F1: GTCAACAAATCATAAAGATATTGG HCO2198_R2: TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	2º Ciclo: 658 pb	94°C–1’ 53°C–1’ 72°C–1’ 72°C–10’	45X

Os produtos das PCRs foram purificados e sequenciados como foi descrito anteriormente. As sequências obtidas foram alinhadas através do programa GeneDoc MFC (versão 2.7.0.0); as sequências-consenso foram comparadas com o banco de dados *Barcode of Life Data System (Bold System)*.

### 5.9. Caracterização de *Wolbachia* e o Fago WO.

Após a identificação de uma amostra contendo as sequências *SpvB*, foi realizada a detecção e caracterização molecular de *Wolbachia* e do Fago WO.

A partir de um protocolo de PCR “*Touchdown nested*”, para alvos já determinados para *Wolbachia* (tabela4), um total de 5 alvos foram selecionados e testados.

**Tabela 4.** Protocolo de ciclagem para caracterização de *Wolbachia*.

ALVO	PRIMERS	TAMANHO DO FRAGMENTO	CICLAGEM	CICLO
<b>FTSZ</b>	Ftsz_UNI_F1: GGAGCATATAAAAGATAGTCAT	1° Ciclo:		
	FtsZ_UNI_R1: ATCRATRCCAGTTGCAAG	700 pb		
	FtsZ_int_F2: CTTTTCATCACGGCAGGAAT	2° Ciclo:		
	FtsZ_int_R2: ATCTTCTCCCTCCGTTCTC	430 pb		
<b>WD0183</b>	Wd0183_F1: C(R)AGGCTGGAGTTAGTCAGG	1° Ciclo:		
	Wd0183_R1:T(KS)(Y)ACC(M)ATTGCAAATTCA	750 pb	94°C–50''	
	Wd0183_INT_F2TTTTTGCTTGG(Y)GGAGTAGT	2° Ciclo:	50°C–50''	5 x
	Wd0183_INT_R2GACGTCA®TTCCGTT(C)TGT	500 pb	72°C–1':10''	
<b>COXA</b>	CoxA_F1: GCCCCATTTGAAGAGGTGTA	1° Ciclo:		
	CoxA_R1: TCGCTTTAGCGGTRCT(T/G)GCT	850 pb	94°C–50''	35 x
	CoxA INT_F2GTGCGGTATACGCCTT(A/G)GCA	2° Ciclo:	45°C–50''	
	CoxA INTR2:TTGGTCA(T/G)CC(T/G)GAAGTTTAC	650 pb	72°C–1':10''	
<b>DNAA</b>	DnaA_F1: TCCAATACCAGG(A/C)AGCAACC	1° Ciclo:		
	DnaA_R1: TTACAAGACC(A/G)CGAAGCCT	730 pb	72°C–10'	1 x
	DnaA_F2:TCTCCTAG(C/T)GATCTTGATGGA	2° Ciclo:		
	DnaA_R2: CTCCTAG(C/T)GATCTTGATGGA	375 pb		
<b>FABK</b>	FabK_F1:TTGGC(A/G)TAATTGCATGT(T/G)GT	1° Ciclo:		
	FabK_R1: CTTTGGCCTGCCATTAAGA	780 pb		
	FabK_F2:GG(T/C)GG(A/G)(T/C)TACCGACAAAACC	2° Ciclo:		
	FabK_R2: TGGAATTACAGGAAAATCAG(C/A)A	420 pb		

Para a caracterização do fago WO, 7 alvos específicos foram testados, usado o protocolo padrão de Crainey (2017), em uma reação de PCR *Touchdown* de ciclo único.

**Tabela 5.** Protocolo de ciclagem para caracterização do fago WO.

ALVO	PRIMER	CICLAGEM	CICLO
<b>FAGO WO GP1</b>	GP1_int_F1: GGCCGTATAAGCGTAATGAG GP1_int_R1: GCCAGAACAACGGTAGTAAG		
<b>FAGO WO GP3</b>	GP3_int_F1: CTTTCACGAGCAAATTGCTG GP3_int_R1: GTTCTGCCATTCGCACTAC		
<b>FAGO WO GP16-GP18</b>	GP16-Gp18_F1: TGGAGGAGAGGGTCAATGGAG GP16-Gp18_R1: CCTATCGCTGTTGTGTGTC	94°C–50'' 50°C–50'' 72°C–1':10''	5 x
<b>FAGO WO GP19-GP21</b>	GP19-Gp21_F2: TTGCCCTAAACATCAGCAAATC GP19-Gp21_R2: GCTCTTACTGCTGCCAGTTC	94°C–50'' 45°C–50'' 72°C–1':10''	35 x
<b>FAGO WO GP27-GP28</b>	GP27-Gp28_F1: GGGATATCAATGCTTGTGTTTGC GP27-Gp28_R1: CTACACGCTCAATAGTGCC	72°C–10'	1 x
<b>FAGO WO GP16-GP21</b>	GP16-Gp18_F1: TGGAGGAGAGGGTCAATGGAG GP19-Gp21_R2: GCTCTTACTGCTGCCAGTTC		
<b>FAGO WO ORF7</b>	ORF7_F: GAAATGCTTGTTCAGCTAATAGC ORF7_R: ATAAATTCTCTATTTTTCTGG		

Os produtos de PCR de tamanho esperado foram purificados e sequenciados como foi descrito no item 5,7.

### **5.10 Análise filogenéticos**

Após a obtenção das sequencias, foi realizada pesquisas BLAST®, para a confirmação dos alvos. As sequencias foram alinhadas utilizando o programa ClustaX (versão 2.1), e para a construção da sequência consenso foi usado o programa Genedoc.

Todas as sequencias consenso de cada um dos genes alvo, foram alinhadas com sequencias de referência disponíveis no banco de dados GenBank.

Para a construção das arvores filogenéticas foram utilizados os programas incluídos dentro do pacote de PHYLIP (versão 3.698). Arvore de MLST de máxima verossimilhança foram construídos utilizando o programa DNAm1, visualizados no programa Figtree (versão 1.4.4). Para a obtenção dos valores de *Bootstrap*, foi utilizado o programa SEQBOOT E CONSESNE. Todas as árvores de consenso utilizadas para este estudo foram feitas a partir de 1000 pseudoreplicações e visualizadas em Tree View (versão 1.4.4). Agrupamentos filogenéticos importantes com apoio de *Bootstrap* >50% foram destacados na árvore geradas.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Amostras entomológicas

Um total de 1000 amostras de artrópodes classificadas dentro do subfilo Hexápoda, provenientes dos 8 pontos de coleta (figura 6) dos municípios de Manaus e Presidente Figueredo, foram coletadas neste estudo. A distribuição das amostras por localidade de coleta é descrita na Tabela 6.

**Tabela 6.** Total de amostras obtidas por local de coleta nos municípios de Manaus e Presidente Figueredo.

Localidade	Ponto	N. amostras	%
Manaus urbano	Área urbana	107	10,7%
	Fragmento florestal dentro de área urbana central Park	134	13,4%
<b>Subtotal</b>		<b>241</b>	<b>24,1%</b>
Manaus rural	Comunidade São Francisco de Mainá	73	7,3%
	Comunidade Jatuarana	82	8,2%
	Comunidade Assentamento Nazaré	115	11,5%
	Comunidade Bom Sucesso	110	11%
<b>Subtotal</b>		<b>380</b>	<b>38%</b>
Presidente Figueredo	Igarapé Cabeça Branca	110	11%
	Igarapé ponte do rio preto	127	12,7%
	Igarapé Sossego da Pantera	142	14,2%
<b>Subtotal</b>		<b>379</b>	<b>37,9%</b>
<b>total</b>		<b>1000</b>	<b>100%</b>

As amostras selecionadas foram submetidas a extração de DNA “*in house*” de acetato de sodio, como foi descrita no item 5.5. O método de extração foi validado realizando em um total de 100 amostras uma PCR “*nested*” para a detecção dos alvos ITS-1 e ITS-2 do locus de DNA ribossomal de artrópodes (LARUE *et al.*, 2009), amplificando em todas as amostras. Com base nesse teste, se deu continuidade aos experimentos para a detecção de nosso alvo de interesse.

## 6.2 Desenvolvimento de uma ferramenta para identificação e caracterização de sequências *SpvB* de origem WO.

Foi necessário realizar o desenho de primer (tabela 1.), tomando como referência a sequência do genoma sr1WOdamA e WOcauB3 reportadas por Crainey (2017), Tanaka (2009). Por existirem poucas sequências da proteína *SpvB*\_WO inseridas nos bancos de dados nesse momento, foram desenhados um conjunto de *primers* degenerados, tornando-se uma etapa desafiadora para a pesquisa, devido a que, à medida que aumenta o número de bases degeneradas em um par de *primers*, pode aumentar a probabilidade de obter produtos indesejados (LI; SHRIVASTAVA; STOCKWELL, 2015).

Inicialmente 40 amostras foram testadas para as 14 combinações diferentes de PCR descritos no (anexo 1), na tentativa de detectar essas sequências em diferentes hexápodes da região Amazônica. Múltiplas reações foram realizadas, testando diferentes protocolos de ciclagem e temperaturas para a padronização inicial do ensaio de PCR “*Touchdown nested*” (tabela2). Um total de 16 produtos de PCR amplificados do tamanho esperado, foram purificados e enviados para sequenciamento (Sanger Sequencing), posteriormente pesquisas BLAST com as sequências resultantes mostraram que apenas um desses produtos de PCR correspondia ao alvo esperado, contendo 302 nucleotídeos de comprimento, é rotulada como “*SpvB\_Cris*” neste estudo. A sequência é fornecida em formato fasta no (anexo 6) deste documento.

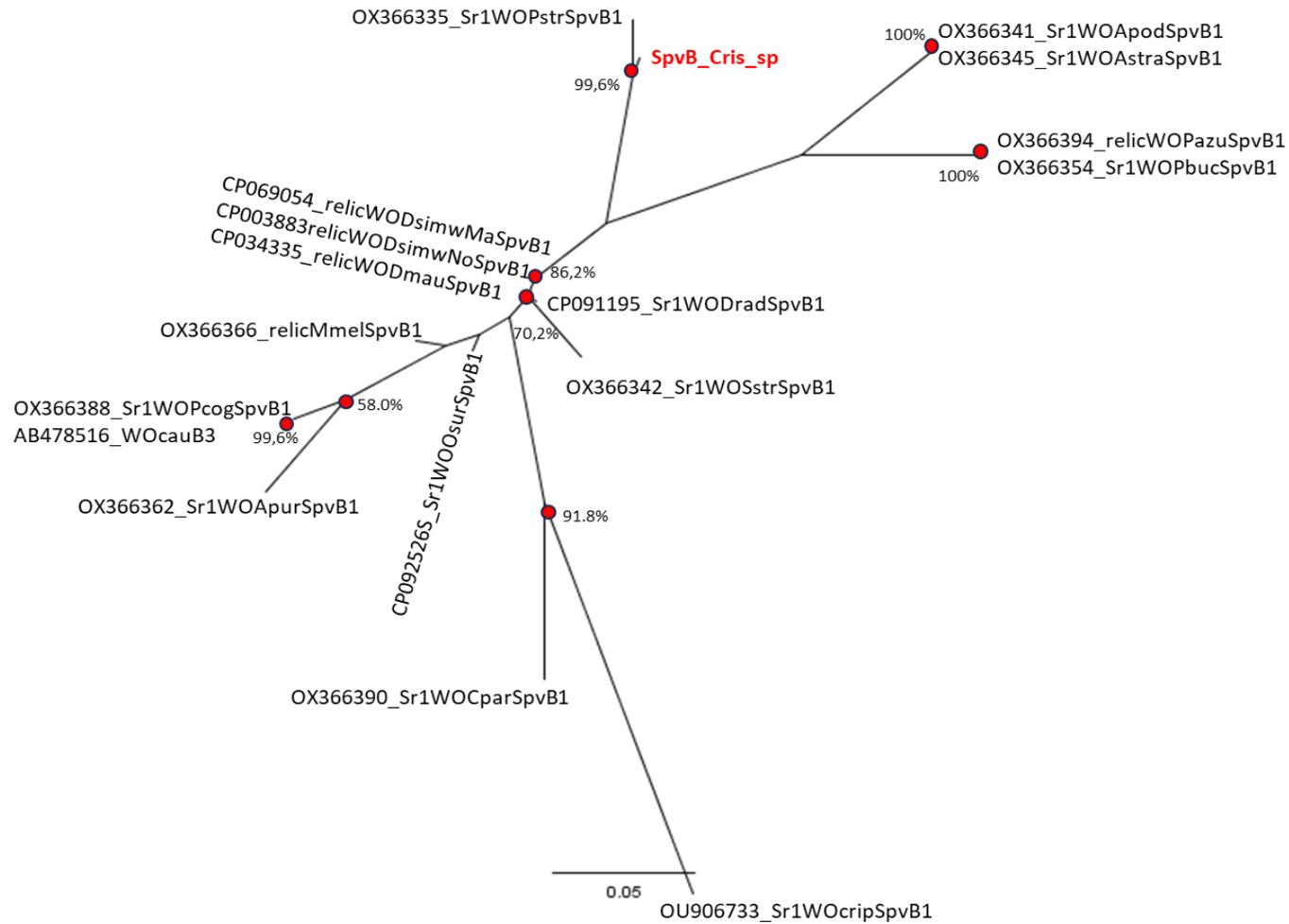
As pesquisas iniciais mostraram que as duas melhores correspondências no GenBank para esta sequência correspondiam à região alvo *SpvB* de WOcauB3 (AB478516) e à gene *SpvB* de sr1WONo (AGJ99401). A sequência “*SpvB\_Cris*” mostrou 89% de identidade em 299 posições de nucleotídeos no WOcauB3 e 88% de identidade nos mesmos 299 nucleotídeos com sr1WONo. Nenhum outro resultado significativo foi detectado nas primeiras pesquisas no banco de dados.

Para o 1º de novembro de 2022, após o lançamento dos dados do Programa Árvore da Vida do centro de Sanger, foram depositados no Genbank novos genomas que foram identificados posteriormente com várias correspondências de *SpvB* ainda melhores, incluindo uma sequência que mostrou 97% de identidade em todos os 302 nucleotídeos da nossa sequência *SpvB\_Cris*. As pesquisas

BLASTn forneceram 17 novas ocorrências, todas elas vieram de sequência de genomas de *Wolbachia* de diferentes artrópodes, com exceção do “hit” WOCauB3.

A Figura 11 mostra uma árvore de maximumlikelihood que inclui todos os “hits” e mostra que a sequência *SpvB\_Cris* está mais relacionada ao genoma de uma *Wolbachia* endossimbionte do supergrupo B de *Parapoynx stratiotata*, (OX366335) denominada Sr1WOPstr*SpvB*1.

Até o momento os genes *SpvB* são encontrados somente dentro do genoma de WO, localizada no extremo terminal do módulo da cauda GP47 e associada a fagos contendo o segmento de Serina Recombinase SR1, essas genes são relatados como proteínas de toxina inseticida, descritos inicialmente no genoma do fago funcional WOCauB3 (KENT *et al.*, 2011a), e dos possíveis Pseudogenes wNo (ELLEGAARD *et al.*, 2013) e WODamA (CRAINEY *et al.*, 2017), os últimos autores acreditam que essas proteínas podem ter propriedades inseticidas, o que podem ter um papel na forma como *Wolbachia* parasita seus hospedeiros insetos, mas isso precisa ser estudado.



**Figura 11.** Arvore representativo de distância de maximumlikelihood (ML), utilizando 1000 réplicas para o alvo . Os agrupamentos das sequências de *SpvB* de WO, foram confirmadas com apoio de Bootstrap >50%; em destaque (vermelho) a sequência *SpvB\_Cris*, junto com os valores de Bootstrap.

De acordo com os resultados na padronização do protocolo de PCR, o ensaio denominado como B2 descrito no anexo 1, foi validado como ensaios de PCR para o diagnóstico de proteínas SpvB de origem WO (tabela 7)

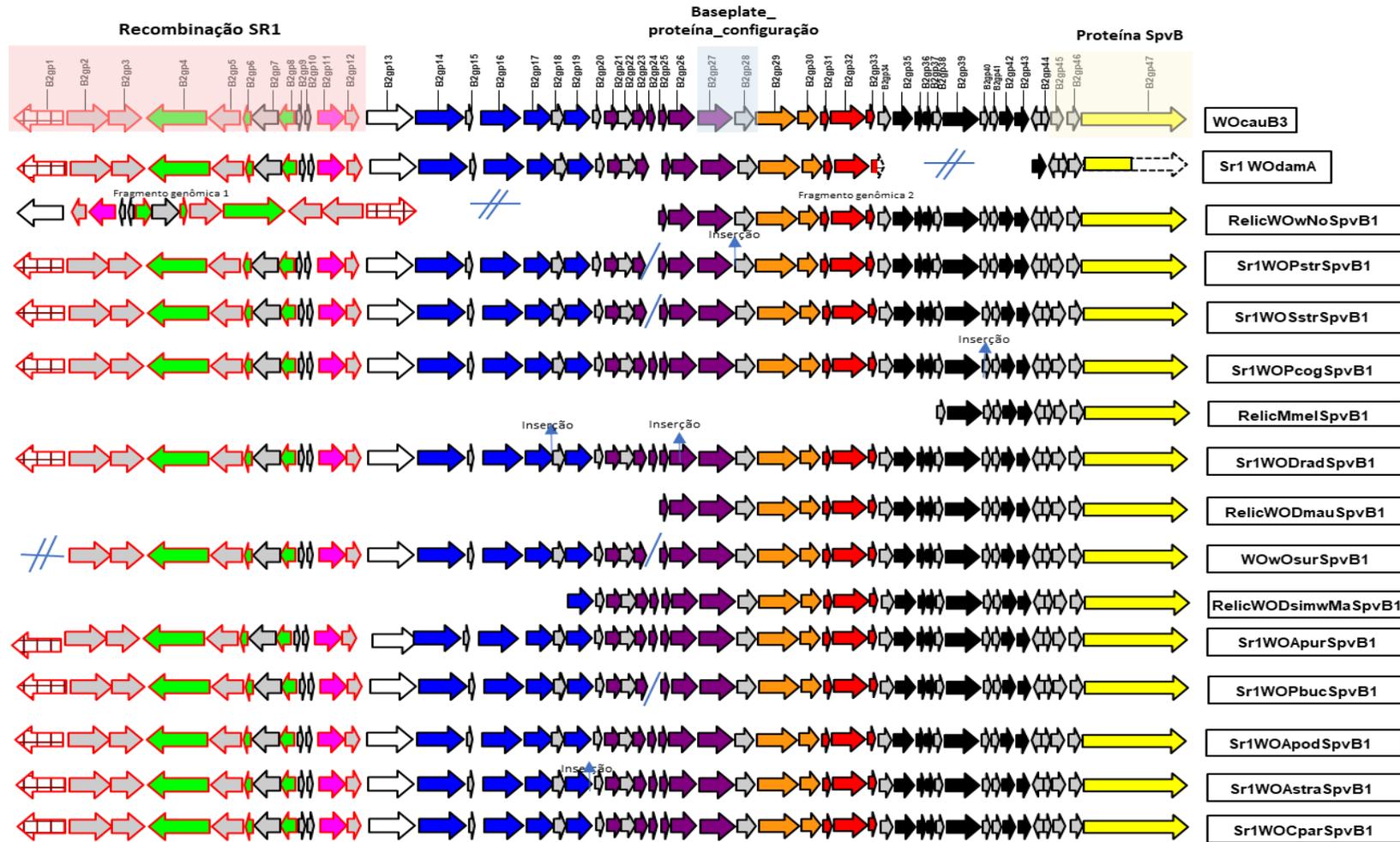
**Tabela 7.** Ensaio padronizado PCR “*Touchdown nested*” para o diagnóstico de proteínas SpvB-WO.

ALVO	PRIMERS	TAMANHO PB	
<b>F3-SVPB_fii</b> <b>R5_SVPB_rii</b>	F3_ GCACAYTACAGGATTTGCAGT R5_ TCCATCACCATTTGGTCTGA	1° Ciclo: 600pb	
<b>F4-SVPB_fii</b> <b>R4_SVPB_rii</b>	F4_ AAGAGCGGTAAARCARGTTG R4_ GTACCCAGCAAACCTTGAA	2° Ciclo: 300 pb	Alvo B2 Positivo

### 6.3 Caracterização de fagos de *Wolbachia* Sr1\_WO de depósitos de GenBank.

Usando a sequência do fago WOcauB3 como referência para consulta BLAST2 e alinhadas com os 13 genomas de *Wolbachia* identificados com correspondência ao alvo *SpvB\_Cris*, foi determinado que todas essas sequências fazem parte dos elementos lisogênicos do fago WO integrados nos genomas da *Wolbachia*.

A Figura 12 mostra a arquitetura genômica prevista desses elementos com base na identidade que compartilham com o genoma do fago WOcauB3; na maioria dos casos, esses elementos compartilham notável semelhança estrutural com WOcauB3.



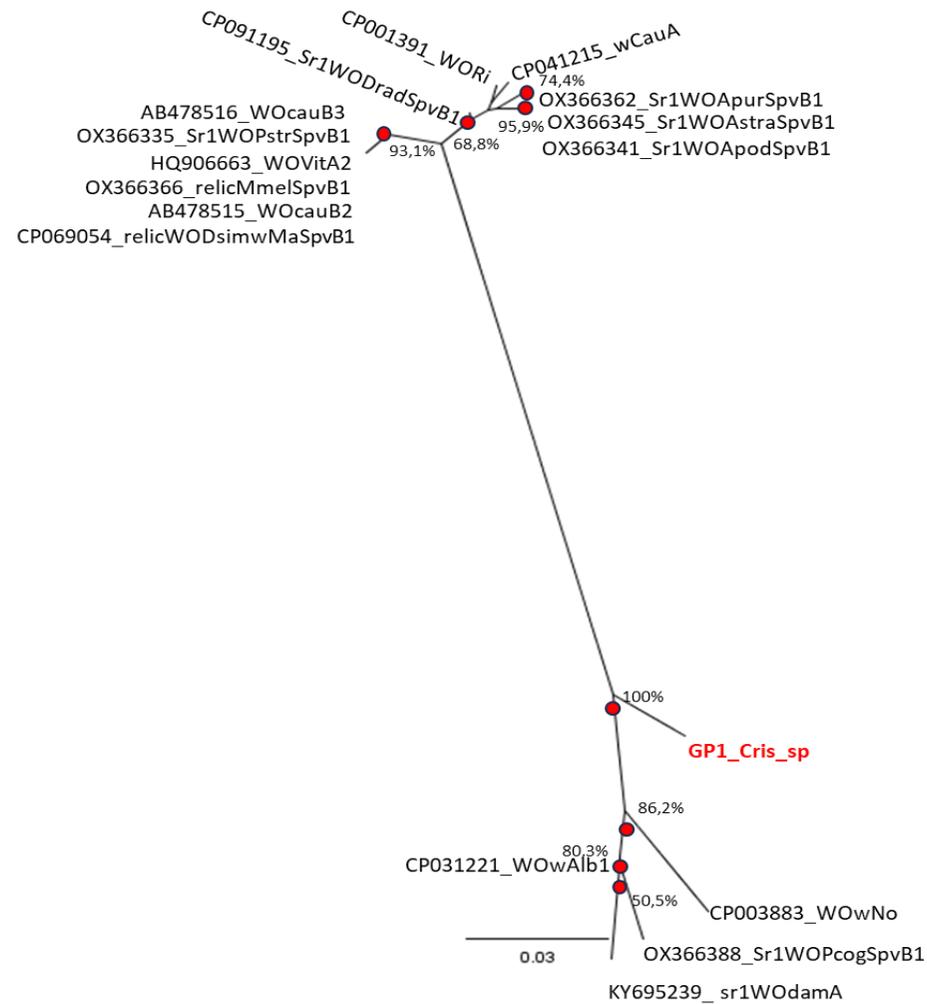
**Figura 12.** Arquitetura genômica de fagos WO. As setas são usadas para indicar a direção na qual as sequências de genes previstas são codificadas, é destacado com uma caixa rosa o segmento de serina recombinase Sr1, na caixa azul o gene GP27\_28 e na caixa amarela a proteína SpvB.

Todos os novos genomas identificados contêm os mesmos 9 genes (na mesma ordem e orientação) que são imediatamente adjacentes à sequência *SpvB* em WOcauB3 e a maioria compartilha pelo menos 43 genes do genoma de referência. Como pode ser visto na figura 12, três desses elementos de fago parecem ser versões truncadas em sentido 5' de WOcauB3, com todos os elementos WO aparentemente completos contendo um módulo de serina recombinase conservado descrito anteriormente por Crainey *et al.*, (2017) e que agora é utilizado para a taxonomia de fagos WO de BORDENSTEIN; BORDENSTEIN, (2022). A análise da sequência que envolve nossos acertos de *SpvB\_Cris* sugere, portanto, que todos derivam do fago Sr1WO e que esta família de WO (que não contém ortólogos CifA ou CifB) é o grupo mais predominante de WO a ter sequências de genes *SpvB* e pode, de fato, ser a única família de WO a conter essas sequências *SpvB*.

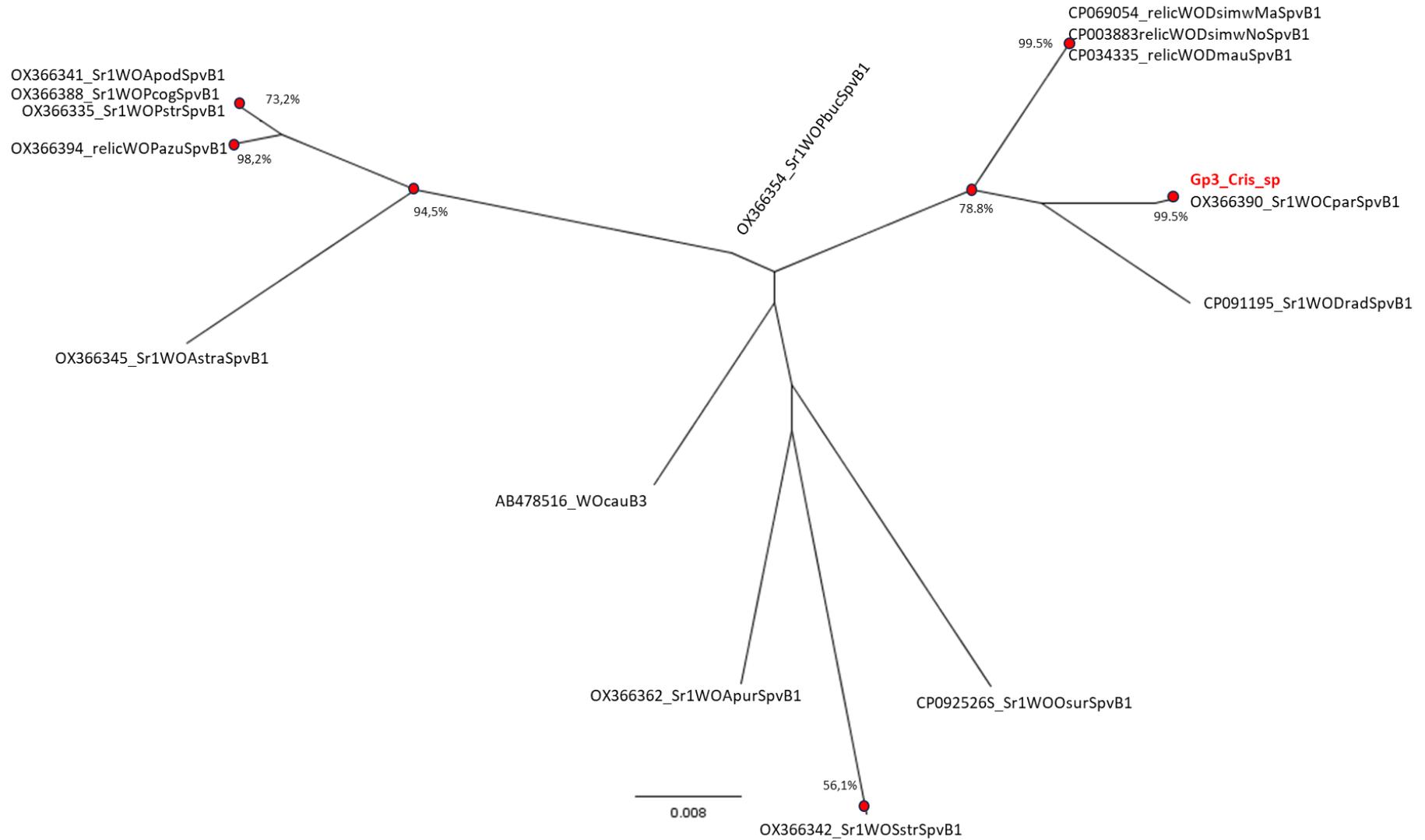
#### **6.4 Detecção e caracterização de elemento de fago WO, classificação Sr1, a partir de um extrato de DNA hexápode**

Após a verificação de todas as sequências que correspondiam a *SpvB* no banco de dados, todas pareciam derivar de um fago Sr1WO, e sugeriu a hipótese de que a sequência *SpvB\_Cris* isolada na Amazonia também poderia derivar do elemento de fago da família Sr1WO. Assim, sete alvos de fagos WO já caracterizados foram testados, descritos na tabela 5. Dos sete alvos, quatro foram positivos por PCR, seguindo o protocolo descrito na mesma tabela. Os genes amplificados foram Gp1, Gp3, ORF7 e Gp27\_28, os quais foram sequenciados, obtendo resultados de qualidade em 3 alvos, que foram verificados no Genbank.

Dos ensaios de PCR testados anteriormente, dois desses ensaios têm como alvo genes dos módulos Sr1 (Gp1 e Gp3) e o outro alvo tem uma combinação de genes de uma região da cauda e da placa de base. Todos os três PCRs amplificaram com sucesso a sequência do gene alvo e as pesquisas BLAST das sequências Sanger resultantes mostraram que todas eram de origem WO e da região alvo. As Figuras 13 e 14 mostram as árvores filogenéticas construída com os genes Gp1 e Gp3 do módulo Sr1, descritos anteriormente (BORDENSTEIN; BORDENSTEIN, 2022; CRAINEY *et al.*, 2017), juntamente com ortólogos de outros fagos Sr1 WO identificados neste estudo.



**Figura 13.** Arvore representativo de distância de *Maximum likelihood* (ML), utilizando 1000 réplicas para o alvo com valores de Bootstrap, para o ALVO Gp1\_Cris\_sp (Os agrupamentos das seqüências, junto com os nomes dos alvos em destaque (vermelho)).

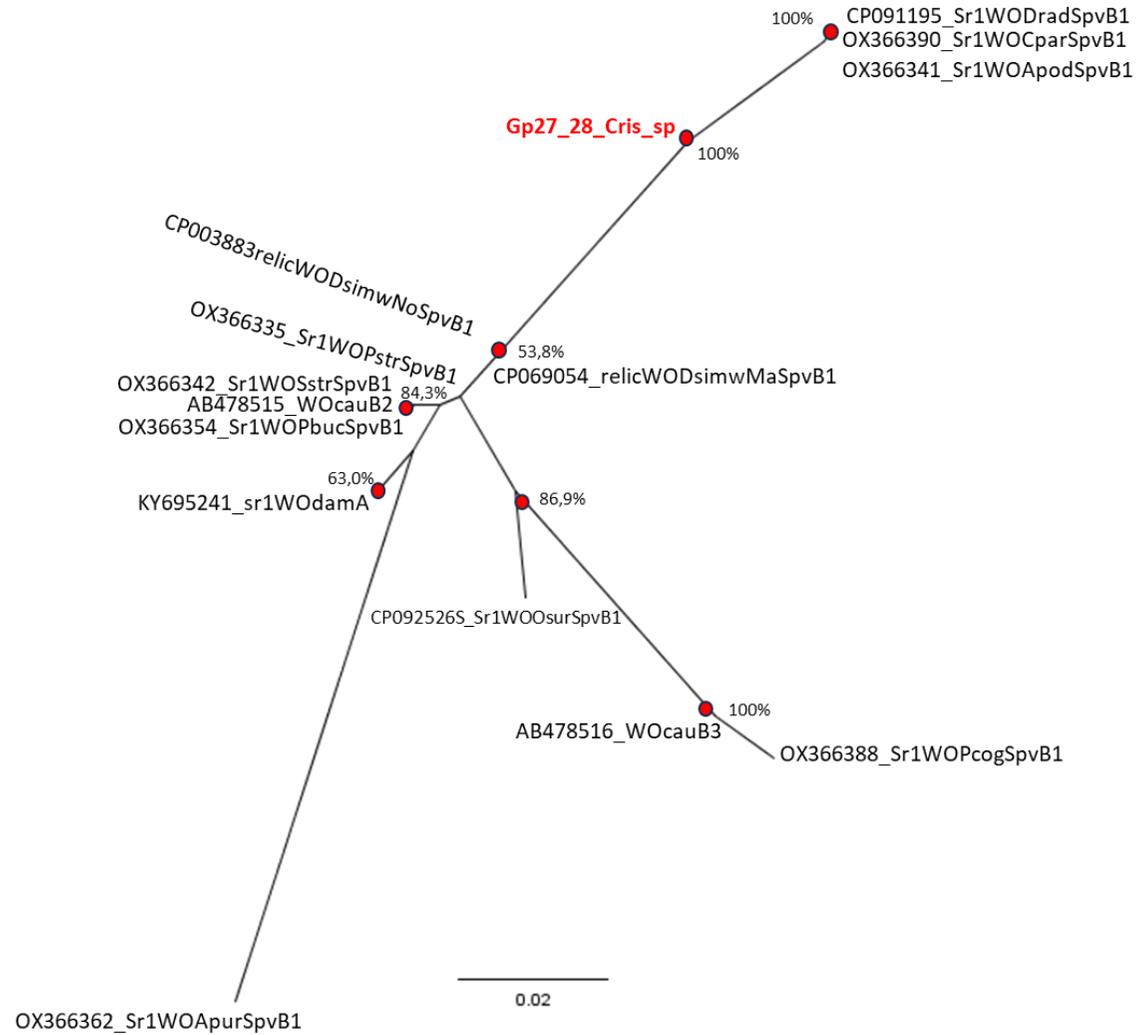


**Figura 14.** Arvore representativo de distância de *Maximum likelihood* (ML), utilizando 1000 réplicas para o alvo com valores de Bootstrap, para o ALVO Gp1\_Cris\_sp (Os agrupamentos das sequências, junto com os nomes dos alvos em destaque (vermelho)).

Os genes GP1 e GP3 estão associados ao segmento de recombinação descrito por Crainey (2017) como um segmento conservado de 12 genes do GP1 ao GP12 com funções envolvidas de recombinação e replicação, referido como Serina Recombinase SR1. A sequência GP1 e GP3 do Hexápode isolado foram agrupados perto dos genomas dos fagos, Gp1 perto de WOwno, WOwalb1, Sr1WOPcogSpvB1 e Sr1WODamA WODamA e wNo com valores de bootstrap do 100% e para GP3, perto de Sr1WOCparSpvB1 com valores de *Bootstrap* do 99.5%

Dentro dos outros grupos funcionais de proteínas gênicas (Gp) classificadas por (KENT *et al.*, 2011), são encontrados os segmentos de cabeça, placa de base, virulência e cauda, O alvo GP27\_28 sequenciado do hexápode, compreende 2 genes individuais, pertencente GP27 ao segmento de cabeça placa (*baseplate*) e o gene GP28, referido como o gene inicial do segmento de virulência (figura 15). Há um pouco mais de Sr1WO incluído na filogenia preparada para figurar a sequência de DNA Gp27-28 porque é capaz de incluir algumas das sequências truncadas de Sr1WO. A sequência GP27\_28 do Hexápode isolado forem agrupados perto dos genomas dos fagos, WODrad, WOCpar e WOApod, com valores de *bootstrap* do 100%.

Os testes realizados como os genes GP1, GP3 e GP27\_28 presentes na amostra do hexápode contendo a proteína SpvB corroboraram a procedência de um fago WO clarificação Sr1.



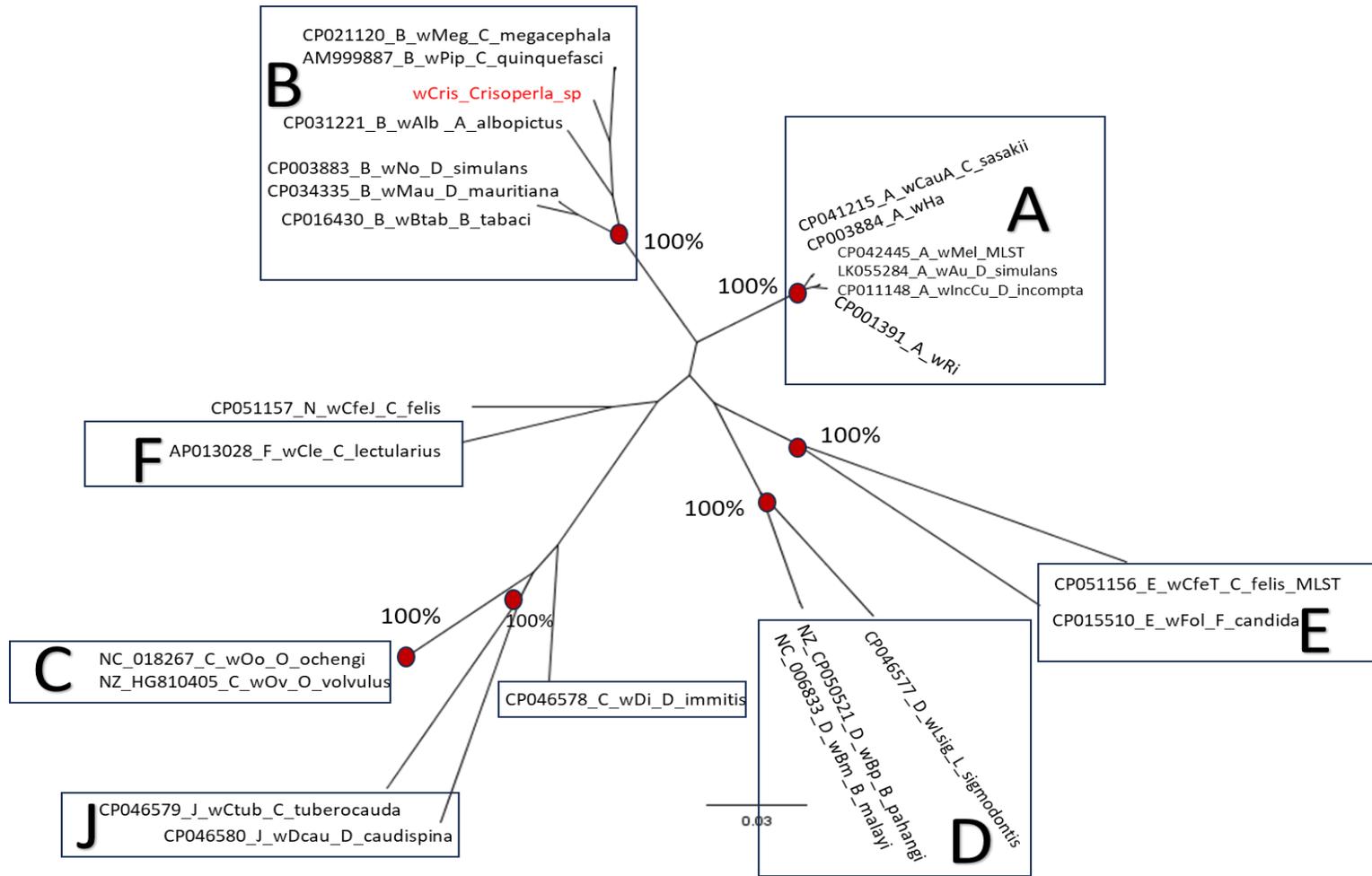
**Figura 15.** Arvore representativo de distância de *Maximum likelihood* (ML), utilizando 1000 réplicas para o alvo com valores de Bootstrap, para o ALVO Gp27\_28\_Cris\_sp (Os agrupamentos das seqüências, junto com os nomes dos alvos em destaque (vermelho)).

### 6.5 Caracterizações e isolamento de genes de *Wolbachia* de um hexápode, contendo *SpvB*\_WO.

Após a confirmação dos genes *SpvB* em um hexápode da Amazônia, foi realizada a caracterização da *Wolbachia*, utilizando 5 alvos referentes a sequências já caracterizados (FERREIRA, 2021), testando cada um desses individualmente (tabela 4), todas as reações foram positivas por PCR seguindo o protocolo descrito na mesma tabela. Os 5 alvos foram sequenciados, obtendo resultados de qualidade em 3 deles (CoxA, WD0183 e FabK), as sequências foram confrontadas no banco de dados, confirmando a existência de *Wolbachia*.

Para a montagem das árvores filogenéticas de máxima verossimilhança, foram selecionados os genomas de referência primário descritos por Lefoulon (2020) para cada alvo sequenciado CoxA, FabK e WD0138, utilizando representantes de cada um dos super grupos. Super grupo A: wAu, wMel, wIncCu, wHa, wCauA, wRi; Super grupo B: wAlb, wNo, wMau, wBat, wMeg, wPip; Super grupo C: wDimm, wOo e wOv; Super grupo D: wLsig, wBp, wBm; Super grupo E: wFol, wCfet; Super grupo F: wCle; Super grupo E: wCtub, wDcau e WCfej.

Os resultados filogenéticos de cada alvo individual, agrupa nossa *Wolbachia* no supergrupo B, com apoio de *Bootstrap* para CoxA de 95,1%, FabK de 96,9% e para WD0183 do 99,9%. Foi construído uma árvore filogenética de distância *Maximum likelihood* (ML) e do consenso dos 3 alvos de *Wolbachia* recuperados neste estudo. Árvores de distância representativas são mostradas no anexo com importantes agrupamentos suportados por *bootstrap* indicados nos (anexos 2, 3 e 4). A Figura 16 mostra uma árvore de distância de máxima verossimilhança representativa, também com importantes agrupamentos suportados por *bootstrap* indicados. A árvore da figura 16 é uma árvore MLST que foi construída a partir de um alinhamento concatenado dos três genes (CoxA; WD0183 e FabK) obtidos para este estudo.



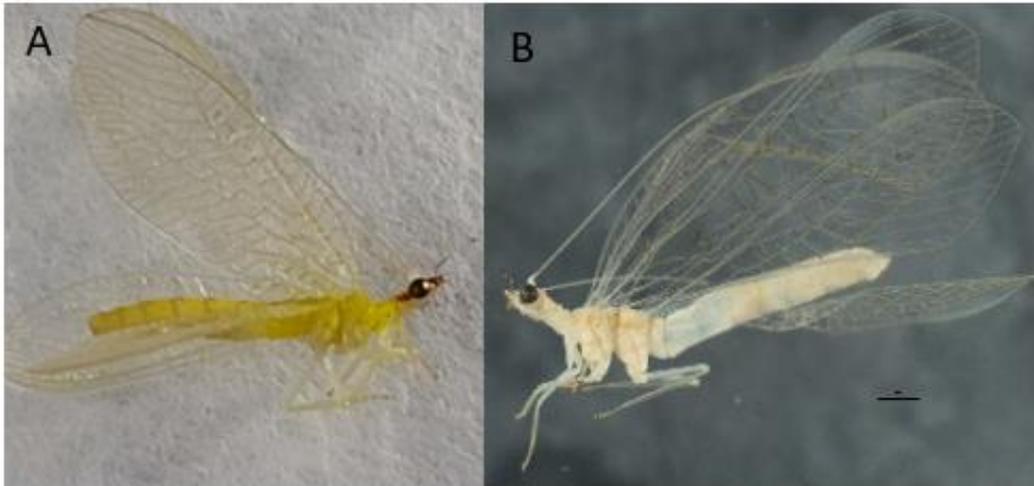
**Figura 16.** Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de bootstrap >50% para o consenso das sequência-alvos. Em vermelho: agrupamento da cepa de *Wolbachia* do hexápode da Amazônia.

A caracterização filogenética da *Wolbachia* infectado o inseto do gênero *Crisoperla sp.*, agrupo no supergrupo B com valores de *Bootstrap* do 100%, junto com todas os genomas reconhecidos dentro do supergrupo. Avaliando nossos resultados utilizando somente 3 alvos em comparação com as análises filogenéticas realizadas por Lefoulon (2020) sendo considerada como o padrão ouro para a classificação de *Wolbachia*, nossas análises recuperaram os mesmos agrupamentos dos supergrupos em relação com a sequência alvo recuperada do inseto o que fornece uma classificação confiável da *Wolbachia* identificada.

### **6.6 Taxonomia molecular para a identificação do artrópode hospedeiro**

Após a confirmação do artrópode contendo o gene *SpvB*, foi realizada a identificação taxonômica do espécimen classificado inicialmente como pertencente ao subfilo Hexápode, baseados nos sistemas de código de barras que empregam sequencias de DNA, utilizando o gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) (HEBERT *et al.*, 2003). De acordo com a abordagem foi identificada a amostra confirmada por filogenia contendo a proteína SpvB sendo o primeiro registro desse gene para a região amazônica.

Apoiados no banco de dados do sistema *Barcode of Life Data* (BOLDSYSTEMS, 2023) que inclui uma biblioteca de referência de códigos de barras de DNA, foram comparadas nossas sequencias. O resultado taxonômico da amostra (anexo 5), coletada na área urbana de Manaus, no intra domicílio, foi identificada como um inseto pertencente ao gênero *Crisporla sp.* (figura 12). Como pode ser visto neste resultado, o depósito de sequência de COI mais próximo vem da espécie *Crisoperla rufilabris*, que apresenta 98,35% de identidade com a sequência de 650 nucleotídeos que obtemos de nosso espécime de *Crispola*.



**Figura 17.** Fotografia de *Crisoperla* sp. Figura A: amostra coletada na área urbana de Manaus, figura B: imagem obtida do resultado no banco de dados BIOUG00864-F04 (fonte: A: arquivo pessoal, B: BOLDSYSTEM, 2023)

Os insetos do gênero *Crisoperla*, pertencem ao Filo Arthropoda, da ordem Neuroptera, família Chrysopidae, são considerados como a segunda família com maior número de espécies dentro dos Neuroptera, tem um ciclo de vida holometábolo, são predadores vorazes de grande variedade de presas, além, são de grande importância devido ao potencial de algumas de suas espécies por serem utilizadas no controle de pragas agrícolas (PESSOA; FREITAS, 2008).

Sequências de CO1 também foram obtidas de outros insetos da região amazônica, inicialmente suspeitos de serem positivos para o *SpvB* gene, mas que o sequenciamento de Sanger mostrou ser falsos positivos.

**Tabela 8.** Taxonomia molecular de hexápodes

Banco de dados de pesquisa	Gene	Identificação taxonômica	Ponto de coleta
BLODSYSTEM	COI	<i>Culex sp</i>	Área urbana de Manaus intradomicílio
		<i>Culex nigripalpus</i>	Comunidade Jatuarana
		<i>Probergrothius varicornis</i>	Comunidade Assentamento Nazaré
		<i>Probergrothius nigricornis</i>	Comunidade Assentamento Nazaré
		<i>Crematogaster montezumia</i>	Fragmento florestal dentro de área urbana central Park
		<i>Crematogaster rasoherinae</i>	Fragmento florestal dentro de área urbana central Park
		<i>Polypedilum curticaudatum</i>	Comunidade São Francisco de Mainá
		<i>Xestocephalus sp</i>	Comunidade Jatuarana
		<i>Streblidae sp</i>	Comunidade Jatuarana
		<i>Xestocephalus brunneus</i>	Comunidade Jatuarana
		<i>Tretogonia cribrata</i>	Comunidade Assentamento Nazaré
		<i>Aedes albopictus</i>	Fragmento florestal dentro de área urbana central Park
		<i>Macrostemo hialínico</i>	Igarapé Cabeça Branca
		<i>Cecidomyiidae sp.</i>	Comunidade Jatuarana
<i>Crematogaster sp.</i>	Igarapé Sossego da Pantera		

Obter uma classificação taxonômica baseada na morfologia é complexo, já que requer de conhecimento taxonômico amplo e preciso, para conseguir chegar até o nível de espécie, além de precisar certas condições para preservar as estruturas dos indivíduos durante a coleta e o transporte das mesmas para evitar perder caracteres específicos para a identificação, é por isso que o uso de ferramentas de identificação baseadas no DNA é uma alternativa confiável, precisa e rápida em qualquer estágio da vida do indivíduo (GROVER *et al.*, 2022). Nosso caso foi uma alternativa útil, fácil de usar, que permitiu fazer um levantamento de insetos como possíveis fontes de proteínas *SpvB* para estudos futuros visando na bioprospecção de novos compostos para o controle vetorial.

## 7. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de uma metodologia para a detecção molecular de genes *SpvB* de fagos WO os quais podem ter propriedades inseticidas e um potencial uso para o controle de vetores ou pragas agrícolas, facilita a busca de possíveis fontes naturais para futuros projetos visando a bioprospecção de novos compostos. A metodologia desenvolvida no presente projeto vai permitir que sejam exploradas as propriedades bioquímicas e biológicas das proteínas SpvB assim como a maneira delas poderem afetar o hospedeiro.

Corroboramos com o resultado das proteínas SpvB detectada no projeto e por meio das pesquisas nos bancos de dados que a proteínas SpvB-WO são associados exclusivamente a fagos contendo o segmento de serina recombinasse 1 (SR1), e conseguimos comprovar que a proteínas SpvB detectada no inseto do gênero *Crisoperla* sp., pertence a um fago WO completo, utilizando genes de diferentes segmentos dos fagos para a caracterização.

Com base nas análises filogenéticas de 3 genes, pode-se afirmar que *Wolbachia* infectando o inseto do gênero *Crisoperla* sp. pertence ao supergrupo B; sendo um dos grupos mais representativos de *Wolbachia* infectado artrópodes. Este estudo também mostram o poder do uso do código de barras CO1 para identificações retrospectivas de espécies de insetos.

## 8. REFERÊNCIAS

- BIAN, G. *et al.* *Wolbachia* Invades *Anopheles stephensi* Populations and Induces Refractoriness to Plasmodium Infection. **Science**, v. 340, n. 6133, p. 748–751, 10 maio 2013.
- BOLDSYSTEMS. **Sistema de dados do código de barras da vida v4**. Disponível em: <<https://www.boldsystems.org/>>.
- BORDENSTEIN, S. R. Bacteriophage Flux in Endosymbionts (*Wolbachia*): Infection Frequency, Lateral Transfer, and Recombination Rates. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 10, p. 1981–1991, jun. 2004.
- BORDENSTEIN, S. R. *et al.* The Tripartite Associations between Bacteriophage, *Wolbachia*, and Arthropods. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 5, p. e43, 19 maio 2006.
- BORDENSTEIN, S. R. *et al.* Parasitism and Mutualism in *Wolbachia*: What the Phylogenomic Trees Can and Cannot Say. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 1, p. 231–241, 6 out. 2008.
- BORDENSTEIN, S. R.; BORDENSTEIN, S. R. The Most Widespread Phage in Animals: Genomics and Taxonomic Classification of Phage WO. **bioRxiv**, p. 2021.11.04.467296, 2021.
- BORDENSTEIN, S. R.; BORDENSTEIN, S. R. Widespread phages of endosymbionts: Phage WO genomics and the proposed taxonomic classification of Symbioviridae. **PLOS Genetics**, v. 18, n. 6, p. e1010227, 6 jun. 2022.
- BOURTZIS, K. *et al.* Harnessing mosquito–*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. **Acta Tropica**, v. 132, p. S150–S163, abr. 2014a.
- BOURTZIS, K. *et al.* Harnessing mosquito–*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. **Acta Tropica**, v. 132, p. S150–S163, abr. 2014b.
- BOYCE, R. *et al.* *Bacillus thuringiensis israelensis* ( Bti ) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, n. 5, p. 564–577, maio 2013.
- CAROLINE COELHO FERREIRA. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Wolbachia* sp. E SUA PREVALÊNCIA EM *Simulium oyapockense* Floch &**

- Abonnenc, 1946 (Diptera: Simuliidae), VETOR DE MANSONELOSE EM SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA.** Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ, 2021.
- COCKBURN, A. F.; SEAWRIGHT, J. A. Techniques for mitochondrial and ribosomal DNA analysis of anopheline mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 4, n. 3, p. 261–5, set. 1988.
- CRAINEY, J. L. *et al.* The Genomic Architecture of Novel *Simulium damnosum* *Wolbachia* Prophage Sequence Elements and Implications for Onchocerciasis Epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, maio 2017a.
- CRAINEY, J. L. *et al.* The Genomic Architecture of Novel *Simulium damnosum* *Wolbachia* Prophage Sequence Elements and Implications for Onchocerciasis Epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 29 maio 2017b.
- CRAINEY, J. L.; GARVEY, C. F.; MALCOLM, C. A. The Origin and Evolution of Mosquito APE Retroposons. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 11, p. 2190–2197, nov. 2005.
- CRAMPTON, J. M. 3. Prospects for genetic manipulation of insect vectors. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 141–143, mar. 1994.
- DEVINE, G. J.; FURLONG, M. J. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. **Agriculture and Human Values**, v. 24, n. 3, p. 281–306, 30 jul. 2007.
- DUTRA, H. L. C. *et al.* From Lab to Field: The Influence of Urban Landscapes on the Invasive Potential of *Wolbachia* in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003689, abr. 2015.
- DUTRA, H. L. C. *et al.* *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 6, p. 771–774, jun. 2016.
- ELLEGAARD, K. M. *et al.* Comparative Genomics of *Wolbachia* and the Bacterial Species Concept. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 4, p. e1003381, 4 abr. 2013.
- FOLMER, O. *et al.* 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. 294–9, out. 1994.

GAVOTTE, L. *et al.* A Survey of the Bacteriophage WO in the Endosymbiotic Bacteria *Wolbachia*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 2, p. 427–435, nov. 2006.

GHELELOVITCH, S. [Genetic determinism of sterility in the cross-breeding of various strains of *Culex autogenicus* Roubaud]. **Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences**, v. 234, n. 24, p. 2386–8, 9 jun. 1952.

GLOWSKA, E. *et al.* New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Symbiophilidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 140–146, mar. 2015.

GROVER, A. *et al.* Ultrastructural and molecular approach as a tool for taxonomic identification of aquatic macroinvertebrates: A review. **Heliyon**, v. 8, n. 12, p. e12236, dez. 2022.

GUINEY, D. G.; FIERER, J. The Role of the *spv* Genes in Salmonella Pathogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 7 fev. 2003.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. **Annual Review of Entomology**, v. 45, n. 1, p. 371–391, jan. 2000.

HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. **The Journal of medical research**, v. 44, n. 3, p. 329- 374.7, mar. 1924.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/am/manaus.html?>>. Acesso em: 11 mar. 2022.

JOHN H. WERREN, W. Z. AND L. R. G. Evolution and phylogeny of *Wolbachia* : reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 261, n. 1360, p. 55–63, jul. 1995.

JOHNSTON, K. L. *et al.* Identification and prioritization of novel anti- *Wolbachia* chemotypes from screening a 10,000-compound diversity library. **Science Advances**, v. 3, n. 9, set. 2017.

JOSHI, R. S. *et al.* Way toward “Dietary Pesticides”: Molecular Investigation of

- Insecticidal Action of Caffeic Acid against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 45, p. 10847–10854, 12 nov. 2014.
- KAUR, R. *et al.* Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia* : A centennial review. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 6, p. 879–893, jun. 2021.
- KENT, B. N. *et al.* Complete Bacteriophage Transfer in a Bacterial Endosymbiont (*Wolbachia* ) Determined by Targeted Genome Capture. **Genome Biology and Evolution**, v. 3, p. 209–218, jan. 2011a.
- KENT, B. N. *et al.* Evolutionary Genomics of a Temperate Bacteriophage in an Obligate Intracellular Bacteria (*Wolbachia* ). **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24984, set. 2011b.
- KENT, B. N.; BORDENSTEIN, S. R. Phage WO of *Wolbachia* : lambda of the endosymbiont world. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 173–181, abr. 2010.
- KLASSON, L. *et al.* Genome Evolution of *Wolbachia* Strain wPip from the *Culex pipiens* Group. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 9, p. 1877–1887, jun. 2008.
- LARUE, B. *et al.* Generalized structure and evolution of ITS1 and ITS2 rDNA in black flies (Diptera: Simuliidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 3, p. 749–757, dez. 2009.
- LAVEN, H. Crossing Experiments with *Culex* Strains. **Evolution**, v. 5, n. 4, p. 370, dez. 1951.
- LEFOULON, E. *et al.* Diminutive, degraded but dissimilar: *Wolbachia* genomes from filarial nematodes do not conform to a single paradigm. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 12, 1 dez. 2020.
- LEPAGE, D.; BORDENSTEIN, S. R. *ET AL.* *Wolbachia* : Can we save lives with a great pandemic? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 385–393, ago. 2013.
- LEPAGE, D. P. *et al.* Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia* - induced cytoplasmic incompatibility. **Nature**, v. 543, n. 7644, p. 243–247, mar. 2017.
- LI, K.; SHRIVASTAVA, S.; STOCKWELL, T. B. Degenerate Primer Design for Highly Variable Genomes. p. 103–115.
- LI, S.-J. *et al.* Plantmediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies.

**The ISME Journal**, v. 11, n. 4, p. 1019–1028, 9 abr. 2017.

LUNT, D. H. *et al.* The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved *primers* for phylogenetic studies. **Insect Molecular Biology**, v. 5, n. 3, p. 153–165, ago. 1996.

MASSEY, J. H.; NEWTON, I. L. G. Diversity and function of arthropod endosymbiont toxins. **Trends in Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 185–198, fev. 2022.

MCMENIMAN, C. J. *et al.* Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 141–144, 2 jan. 2009.

METCALF, J. A.; BORDENSTEIN, S. R. The complexity of virus systems: the case of endosymbionts. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 546–552, ago. 2012.

MICHAEL ALLABY. **Hexapoda.** "Um Dicionário de Zoologia. Disponível em: <<https://www.encyclopedia.com/science/dictionaries-thesauruses-pictures-and-press-releases/hexapoda-0>>.

MÜLLER, C. A.; OBERMEIER, M. M.; BERG, G. Bioprospecting plant-associated microbiomes. **Journal of Biotechnology**, v. 235, p. 171–180, out. 2016.

O'NEILL, S. L. The Use of *Wolbachia* by the World Mosquito Program to Interrupt Transmission of *Aedes aegypti* Transmitted Viruses. p. 355–360.

PESSOA, L. G. A.; FREITAS, S. DE. Potencial reprodutivo de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) em função do número de indivíduos por unidade de criação. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 3, p. 463–466, set. 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning : a Laboratory Manual**. 3. ed. New York:

SAZAMA, E. J. *et al.* Incidence of *Wolbachia* in aquatic insects. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 1165–1169, fev. 2017.

STOREY, C. C. *et al.* Further Characterization of a Bacteriophage Recovered from an Avian Strain of *Chlamydia psittaci*. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 6, p. 1321–1327, jun. 1989.

SUN, L. *et al.* Salmonella Effector *SpvB* Disrupts Intestinal Epithelial Barrier Integrity

for Bacterial Translocation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, dez. 2020.

TANAKA, K. *et al.* Complete WO Phage Sequences Reveal Their Dynamic Evolutionary Trajectories and Putative Functional Elements Required for Integration into the *Wolbachia* Genome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5676–5686, set. 2009.

TAYLOR, M. J.; BANDI, C.; HOERAUF, A. *Wolbachia* .Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. p. 245–284.

VAN DEN BERG, H.; VELAYUDHAN, R.; YADAV, R. S. Management of insecticides for use in disease vector control: Lessons from six countries in Asia and the Middle East. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. e0009358, 30 abr. 2021.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. *Wolbachia* : master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 741–751, out. 2008.

WHO. **Resposta global de controle de vetores 2017–2030**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241512978>>.

WU, M. *et al.* Phylogenomics of the Reproductive Parasite *Wolbachia* pipientis wMel: A Streamlined Genome Overrun by Mobile Genetic Elements. **PLoS Biology**, v. 2, n. 3, p. e69, mar. 2004.

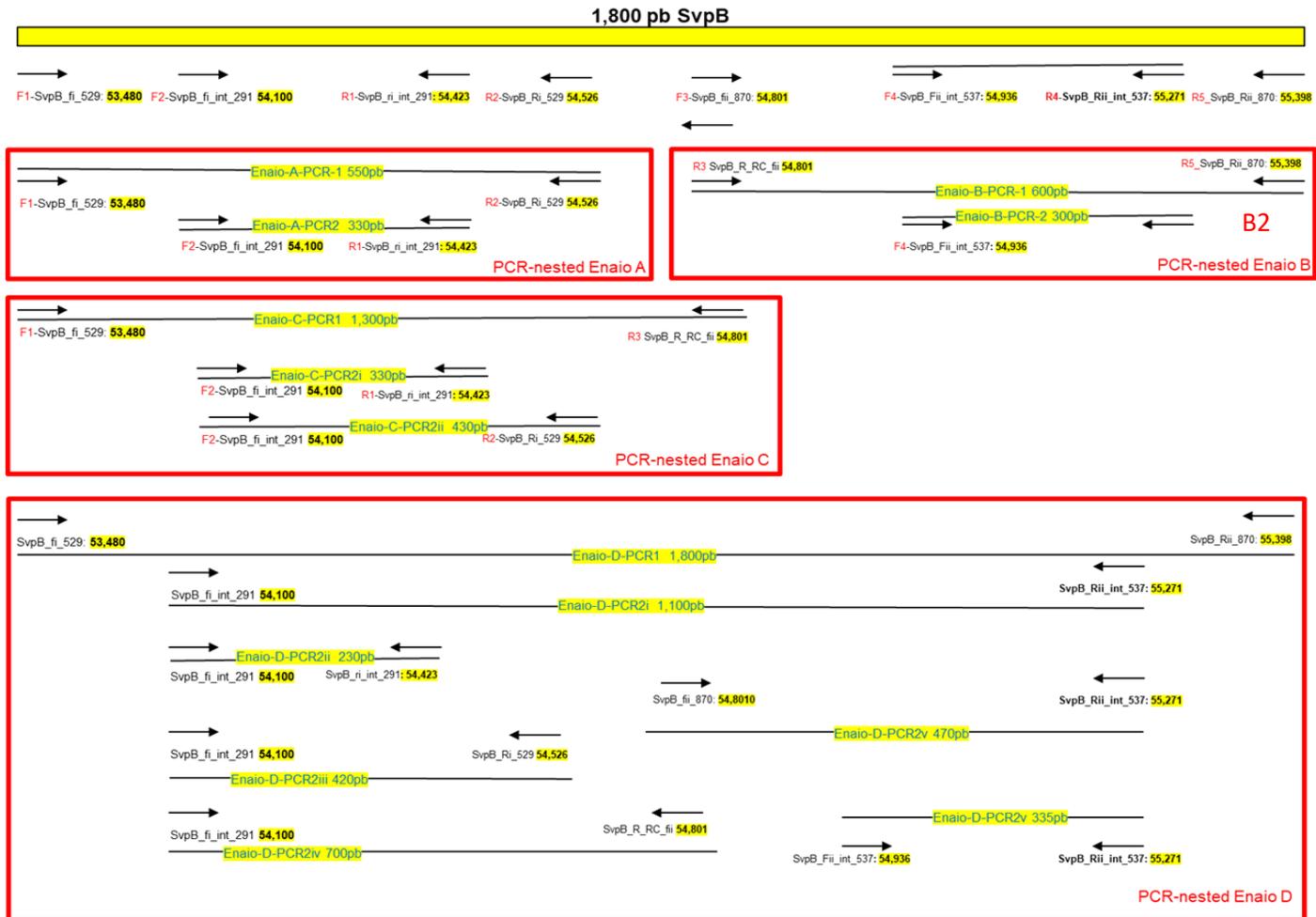
YEN, J. H.; BARR, A. R. New Hypothesis of the Cause of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens* L. **Nature**, v. 232, n. 5313, p. 657–658, ago. 1971.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia* : Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38544, jun. 2012a.

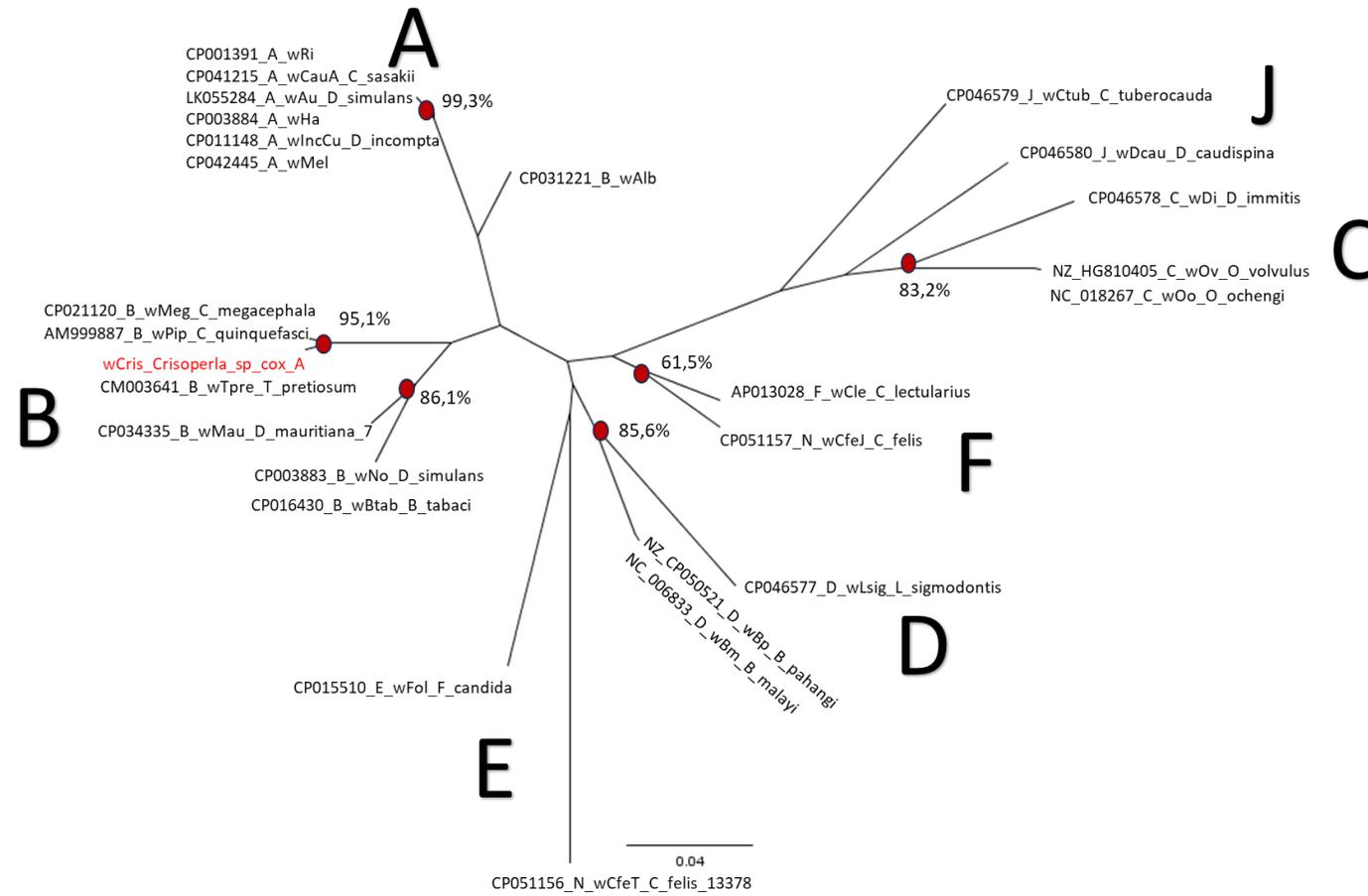
ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia* : Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38544, 7 jun. 2012b.

## 9. ANEXOS

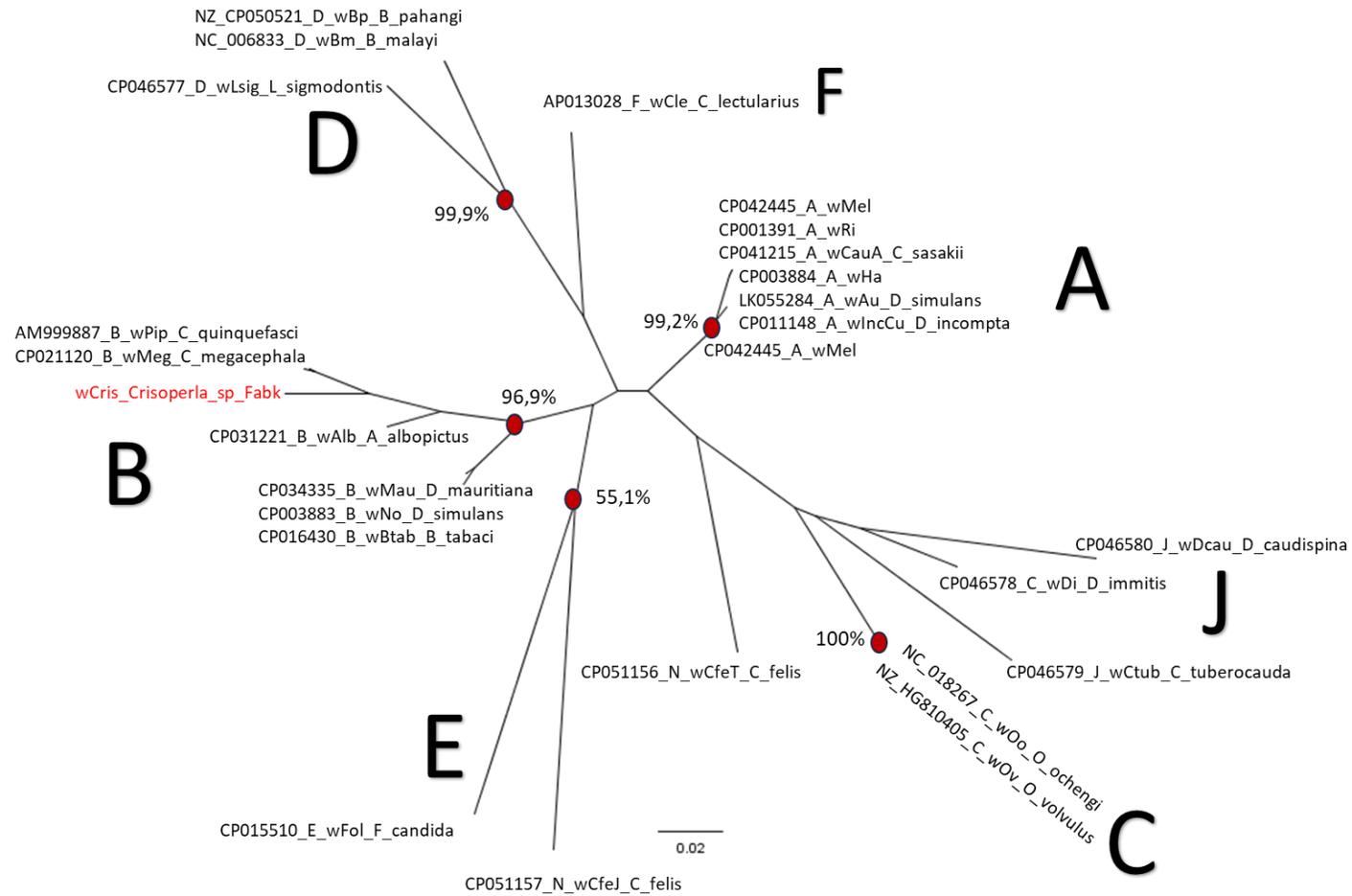
### Anexo 1. Mapa de ensaios Diagnostico de Proteínas SpvB



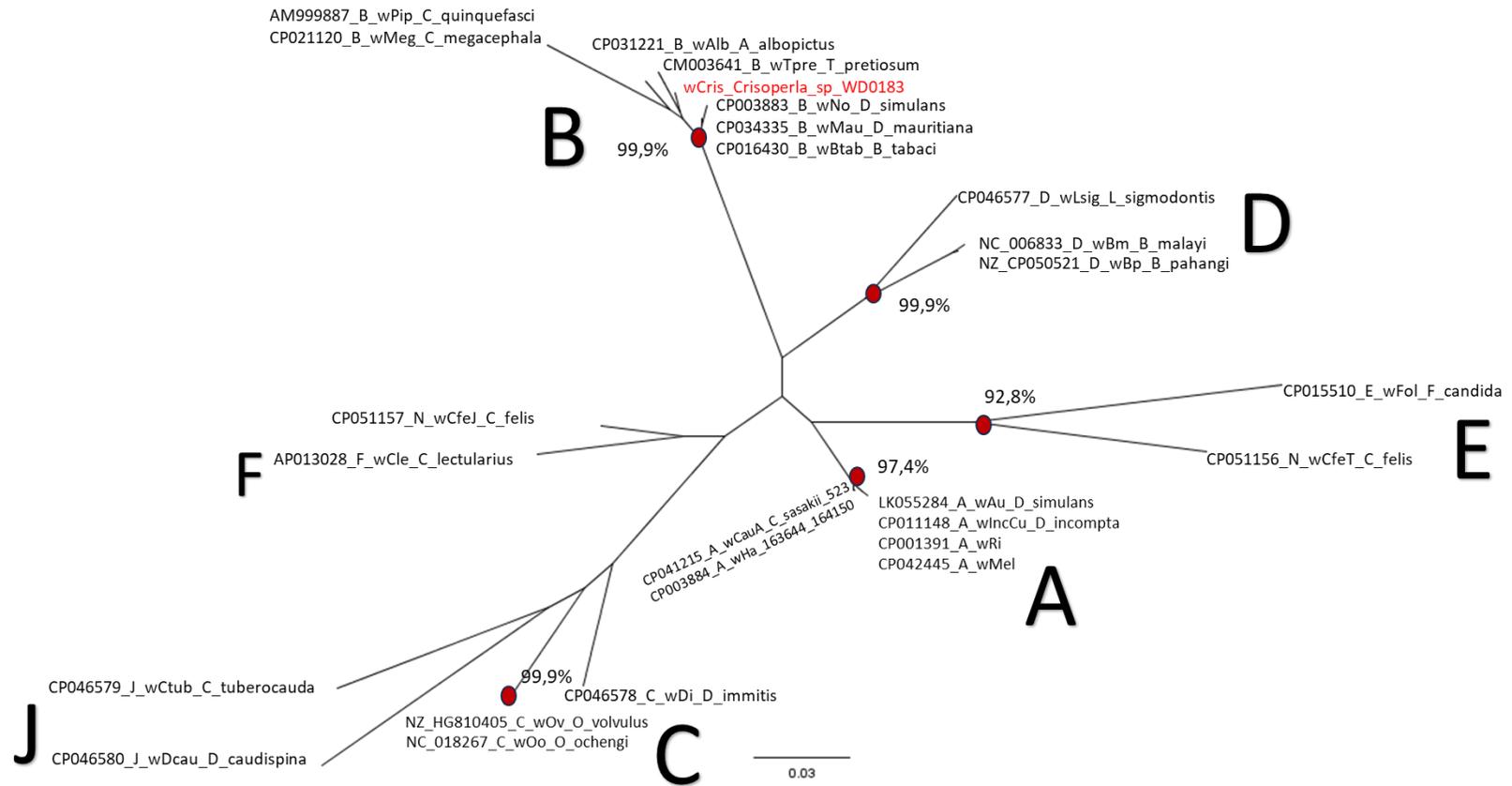
## Anexo 2. Arvore filogenético caracterização *Wolbachia* gene *CoxA*.



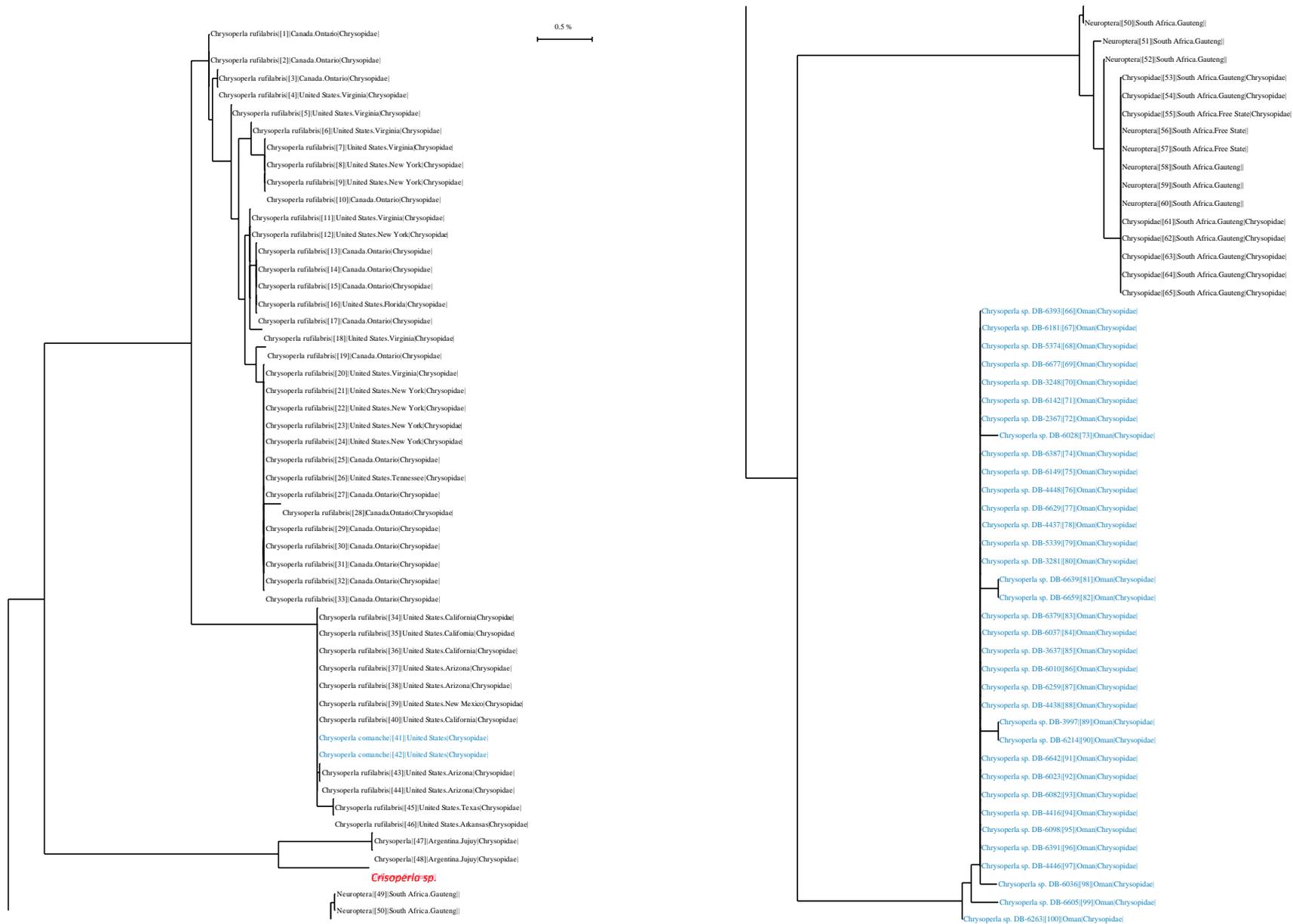
### Anexo 3. Arvore filogenética caracterização *Wolbachia* gene FabK



**Anexo 4.** Arvore filogenético caracterização *Wolbachia* gene WD0183.



**Anexo 5.** Arvore filogenético da identificação taxonômica de *Crisoperla* sp. BOLD TaxonID Tree, Fonte: (BOLDSYSTEM)



**Anexo 6. Sequencias obtidas no trabalho****SEQUÊNCIA ALVO GENES *SPVB\_CRISOPERLA*****>*SpvB\_Cris\_sp***

TTAAACAAGTTGGCTATTATGAGGGGGAGAAAAAAGATTT  
ACAAAATCTACACCAACTTTAGTTTTTTCTCATAACAGCGA  
TGATTCTACCTATGTTTCAACAGTTTCATCGGTAACACTTA  
ACAATGGTAACAAACCATCTAAAGAGCTCCTGCAGATTTT  
AAAAGAACAAGATTTTGTCTTTTCAGAACAAAATGCAGAA  
ATTTCTGAAGAAAACCTCAAATTGGAAAATCAAAGACAGCG  
AAAAAACTCTTGTCTATAAAAGAAAAAGGTAATTTTTTAAAT  
CTTTACAATCCAAACAACA

**IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA BARCODING****>*COI\_Crisoperla\_sp***

TTTGATCTGGATTAGTAGGTACAAGATTAAGTTTATTAATTC  
GAGCTGAATTAGGTCAACCTGGTTCTTTAATTGGTGATGATC  
AAATTTATAATGTTATTGTAACAGCTCATGCTTTTATTATAAT  
TTTTTTTATAGTAATACCTATTGTAATTGGAGGATTTGGTAAT  
TGATTAGTTCCTTTAATATTAGCTGCACCTGATATAGCATTTC  
CACGAATAAATAATATAAGTTTTTGAATACTACCTCCTTCATT  
AACTTTATTACTTGCATCTTCAATAGTAGAAAGAGGAGCTGG  
TACTGGTTGAACAGTATACCCACCACTTTCATCAAGAATTGCT  
CATGCTGGAGCTTCTGTAGATCTGGCTATTTTTAGTTTACATTT  
AGCCGGAATTTCTTCAATTTTAGGGGCTGTTAATTTTATTACAA  
CAGTGATTAATATACGATTAAGTTATATAACTTTAGATCGAATA  
CCATTATTTGTATGATCAGTAGTAATTACAGCTTTACTGTTATTA  
TTATCATTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACA  
GATCGTAATTTAAATACTTCATTTTTTGGATCCTGCTGGAGGAGGA

**SEQUÊNCIAS ALVO IDENTIFICAÇÃO DE *WOLBACHIA* \_ *CRISOPERLA* SP.**

**>wCris\_*Crisoperla*\_sp\_cox\_A**

TTGGTTATATGGGAATGGTTTATGCTATGCTAGGAATAGCAACG  
 TTTGGCTTTATGGTTTGGGCTCACCATATGTTTACTGTTGGGCTT  
 AGCGAGGATGCTGCTATATTTTTTAGCACTAGCACAATTTTCATT  
 GGTGTTATAACTGGTGTAAGTCTTTAGTTGGATTGCAACTATG  
 TGGGGTGGAGCGATTGAATTGAAGACACCAATGCTATTTGCATT  
 AGGTTTTATTTTCATGTTTGGTGGAGGTGGTATAACAGGGATAAT  
 TCTTTCTCACGGTGAATAGATAAGCTTTTGCACGATACCTATTA  
 TGTCGTTGCTCACTTTCCTATGTCATGTCGCTTGCTGCATTATTT  
 GGAGCTTTCGCCGGTTTTATTATTGGATAGGCAAAATGTCAGGT  
 AAGCAATATAACGAGTGTTTAGGAAAGATACACTTTTGGCTCACT  
 TTTATTAGCACCAATGTCAC

**>wCris\_*Crisoperla*\_sp\_Fabk**

GGGTTACCGACAAAACCTAATATAGAAAAAATCAAGAATGCAGGC  
 ATTAAGTTATGTGCTTTCGACCAGCATTAAAGCCTTGCGAAAAGGT  
 TAGTAAAAATGGGAGTAGATGCGTTAATAATAGAAGGTATGGAAG  
 CAGGAGGACATATCGGTCCTGTTAGCACTTCTGTTCTCGCACAAGA  
 GATATTACCTCATTTTAAAAATGAGAAAACACCGGTGTTTGTGCA  
 GGTGGAATAGGAAGAGGCGAAATGATAGTGAACCTACCTAGAAATG  
 GGAGCAAGTGGCTGTCAAATAGGTACATTATTTGTCTGCACGAATG  
 AGTCAATCGCTCACAAAATTTTAAAGAAGTATTCATCAAATCAGC  
 TGCGCGTAATGCTGTATCTTCTGTGCAAATTAGTGCTGATTTTCCTG  
 TAATTCCAATAAAAGCTATAGCCAACAAAGCAAGTGATGATTTTAT  
 GAAGCATCAAAGAGACATTATCGATAAATATCAAATGGGAAAAT  
 CTCAAAGAAGAGGGGCAACTTGAAATAGAAAAGTTCTGGGCTGG  
 AGC

**>wCris\_Crisoperla\_sp\_WD0183**

GGCTTAGTTCATGGCATCACTTGCGGTGCTGGTATGCCTTACAGGC  
 TTGGAGAAATTGCAGCTAAATATCAAGTTTATTACTACCCTATTAT  
 CTCATCGGCGCGCGCTTTTAAAGCTTTGTGGAAACGTGCTTACCAA  
 AAAATATCTTCTTTTTTGGCTTGGCGGAGTAGTATATGAGGATCCGTG  
 GCTTGCTGGTGGTCACAATGGACTCAGTAATAGTGAAGATCCAGAA  
 TTATCACAGGCTCCATTTGAAAGAGTTGCAGAGCTTAGATCTTTCAT  
 GAATGAAGTCGGTCTTCTGAAACGCCAATTGTTATGGCGGGGGGA  
 GTGTGGAATTTGAAGGATTGGGAACATTGGTTTGACAATTTACAAAT  
 TGGACCAATAGCTTTTCAGTTTGGCACTCGTCCACTTTTAACAAAAGA  
 AAGTCCGATTTCTACGGAGTGGAAAAAGAAATTACTCACTTTAGAAG  
 AAGGTGACGTATTTTTAAACAAATTTAGTCCGACAGG

**SEQUÊNCIAS ALVO IDENTIFICAÇÃO FAGO WO\_ *Crisoperla* sp.****>Gp1\_Cris\_sp\_CONSENS**

CTTATGGTTATCGCTACATAGCAAAACATGTAGGTGAAGGAAGTGC  
 TCAGTTTGAGGTTAATCAAGAAGAAGCAGATGTAGTATACAAAATA  
 TTTAATTGGGTTGGTCAAGAAAGAATGAGCATCAATGAATTTATACG  
 TAGACTTAACGAGATACCAGTAATAACACAAACAGGAAAAGAATAT  
 TGGAAAAGAAGTACTATCTGGAAATGTTAAGAAATCCTGCTTATATG  
 GGACGAGCAGCTTATGGTAAACTAAAGCATGCTCGAAGCCACAAGT  
 AAGGAAATCAAAAAAAGGGACTTGTGGTAAACTTAAAAATGGTCATT  
 TTAGTAATGATAAAGAGAACTGGATTTATGTTTCAGTGCCAAAAATAA  
 TAATGATAATTTATTTGATTCAGTGCAAGTACAGCTAACTGAAAATAG  
 ACAAAGAGCAAGAGCACGGGAAAGAAAAGAAACATATTTATTACAAG  
 GTTTAATGGTATGTCAGCGTTGCCAATATACTTATTGTGGTGCATATAG  
 TAGAAATAAGCGGTATTCTTACTACCGTT

**>Gp3\_Cris\_sp\_CONSENS**

CAAATTGCTGATCTTTTAAGTTCAAATAGTTCTTGGGTTAATCCAA  
GTCAAAATCACATTAAGCAGCAAGATACTTATTCGATCTTGGAT  
TGATAAAAATGCAAGAAAGGTATTATACTGTTTGCTCTTGTGAAG  
AGGATTATCTTGATTGGCCAAATGTGGTTGATCCAAGTTGTAGCA  
ATGAGATTTTTATCGATTCAGACTTTGATGAAGCATGTGATGACG  
CTATTTGTGAAAACGTCTCGTCATATTTTGCCTAATACTTATAA  
AAAACAGAGATTCATCTCTTATCCATATACTTAAATATAGAGAA  
AATCATAGACTGGTTTGAAACAAAGTTGAATGATTCAAGACTTAT  
GTGGGAAAAGTGGAAAAGGAGTTTATTATGTTTGTAATCAAGG  
TCGTA CTGTAAATCTAATAATCCTTGATTTTTGTACTGATGCAATAT  
TTCTAACTATAGATAAACTTAGAGTCCATCCAACAGTTCTCATTACT  
CTAAAAAAGATATACCGAATCTATTATTGAGCCTATATGTAGTGC  
GAA

**>Gp27\_28\_Cris\_sp\_CONSES**

ATGCTTGTTTTGCACCAACTGCTTATAAAGAAATAGAGCATAACATTT  
TACTTAAGTGAAGATAAACTCTCTGAGCAGATTTGGAATTTTCGACG  
TACACCAATTTTAGAGCGGTTTAGTATAACTTATTACTACGAAGCAA  
AGAGTTTTACTGATCAAAGAATAATAGAGTCTAATTTAAGGGAATAT  
CATATTGATTGTCAAATGACTCAGATTTAAAACAGAAAGATCCTAT  
TCATGAGCTAGAAAATTACGTAGCAGTATTTTACCCAGGTATGGTCA  
CTTGGCATGAACATCGCCACTTAAATCGCCCTTGGAAAATTTTGAG  
CCCATTATTACAAAAAATTGGACGTTTTTTCTACGAATCTTGTATAT  
ACATAATATCAACTACACAATCAACTATGTCAGTACTCACACAATCA  
GGCAGAGCAGCTATTGCTGCGAGCATAAAAGAGCAACCGATACATC  
TTGCTTGGGGATCTGGAGATTCTACCTGGGAAAGCAGCTACAAAGTT  
GAAAAAACTTTTGCAGCAGGCGGCAAGATAAGTTTAGATCACCACA  
CTATTAAAGATGTAAAAGTTTATACAGGGCAAACAATTTATCAGTCA  
AGCATAGATTATATAGTTGATAGTAGCTCAGGCACTATTGA