

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD  
INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

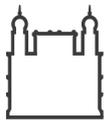
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA**  
**INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO**

**EUNICE BRANDÃO DE ALMEIDA**

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA NATURAL DE *Wolbachia***  
**(RICKETTSIALES: RICKETTSIACEAE) EM *Anopheles darlingi***  
**COLETADOS EM SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA, 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**

**EUNICE BRANDÃO DE ALMEIDA**

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA NATURAL DE *Wolbachia* (RICKETTSIALES:  
RICKETTSIACEAE) EM *Anopheles darlingi* COLETADOS EM SÃO  
GABRIEL DA CACHOEIRA, AMAZONAS, BRASIL**

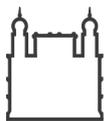
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, com área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

**ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Stefanie Costa Pinto Lopes**

**CO-ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa Amélia Gonçalves Santana**

**MANAUS – AM**

**2023**



## FICHA CATALOGRÁFICA

A447e

Almeida, Eunice Brandão de

Estudo da ocorrência natural de *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em *Anopheles darlingi* coletados em São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil.) / Eunice Brandão de Almeida. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2023.

58 f.

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

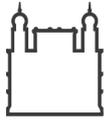
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Stefanie Costa Pinto Lopes.

Co-orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa Amélia Gonçalves Santana.

1. Malária. 2. Doença malárica. 3. *Anopheles darlingi*. 3. *Wolbachia*. I. Título

CDU 616.936(811.3)(043.3)

CDD 616.936098113 22. ed.



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD  
INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**EUNICE BRANDÃO DE ALMEIDA**

**ESTUDO DA OCORRENCIA NATURAL DE *Wolbachia* (RICKETTSIALES:  
RICKETTSIACEAE) EM *Anopheles darlingi* COLETADOS EM SÃO  
GABRIEL DA CACHOEIRA, AMAZONAS, BRASIL**

**Aprovada em:** 29/09/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

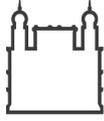
Prof. Dra. Rosemary Aparecida Roque

Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA

Prof. Dr. Grafe Oliveira Pontes

Fundação de Medicina Tropical – Dr. Heitor Vieira

Dourado – FMT/HVD



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



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

Dedico à minha mãe: o grande amor da  
minha vida e as minhas avós: Eunice  
Mendes e Ruth Batista.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por renovar a minha fé todos os dias e por sua infinita misericórdia,

À minha querida mãe, Wellen Dirlley, que sempre foi a personificação de amor e dedicação, obrigada mãe por ser o pilar da minha existência, por seu genuíno afeto e por me criar em um lar forte e feminino.

Às minhas avós, Eunice Mendes e Ruth Batista, por me ensinarem a ser perseverante e que, como mulher, posso conquistar todos os lugares que desejo,

Aos amigos, obrigada por sempre serem tão presentes na minha vida pessoal e de pós-graduanda, em especial, ao Lucas Ferreira, Erick Frota e Regila Mello por sempre me auxiliarem dentro e fora do laboratório,

Ao instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ AMAZÔNIA, por me contemplarem com a vaga de mestrado e me propiciar uma educação de excelência,

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas – FAPEAM, pela bolsa concedida durante os 24 meses de mestrado, este apoio financeiro foi essencial para total dedicação à pesquisa.

À minha orientadora, Dra. Stefanie Lopes, que sempre foi um grande exemplo de pesquisadora, mãe e mulher. Obrigada por seus ensinamentos e por ter acreditado no meu potencial,

À minha co-orientadora, Dra. Rosa Santana, por sua constante compreensão e ensinamentos durante minha jornada científica, além do seu carinho e dedicação.

À Dra. Camilla Fabbri, por ter me introduzido ao grupo de pesquisa, obrigada pelo seu constante carinho, registro aqui a minha admiração por sua dedicação com aqueles ao seu redor e com o seu trabalho,

À unidade de entomologia Nelson Ferreira Fé – FMT-HVD/ENFF, obrigada pelo espaço concedido e as amigadas criadas,

Ao seu Nelson Fé, que hoje não está mais presente, mas que continua em nossos corações e pesquisas, obrigada por ter me ensinado taxonomia e sempre ser tão afetuoso conosco,

Ao grupo de Chagas liderado pela Dra. Graça Barbosa, em especial à sua aluna Débora Nascimento, que nos concedeu reagentes para todas as técnicas moleculares, além de ensinar técnicas e solucionar minhas dúvidas, agradeço também a sua amizade,

À Unidade de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, que cedeu o espaço, material e aparelhos para realização das técnicas moleculares, além de disponibilizarem apoio técnico,

Ao encontro Seminário Laveran & Deane, por me propiciarem uma experiência imersiva no conhecimento da malária, agradeço por ampliarem os meus horizontes e em especial, agradeço as minhas tutoras: Dra. Anice Sallum e Dra. Cristiana Brito por serem muito atenciosas e conselheiras,

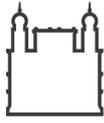
Ao laboratório de entomologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, por me cederem seu protocolo de extração e na elucidação de dúvidas à respeito,

Ao Instituto de Pesquisa do Amazonas – INPA, em especial ao Dr. Grafe Pontes e Dra. Rosemary Roque por cederem ovos de *Aedes albopictus* para colonização do controle positivo,

À Dra. Claudia Rios-Velasques, por ceder primers de *Anopheles spp.* para o andamento dos experimentos moleculares,

Ao Instituto René Rachou – FIOCRUZ MINAS, por ter concedido primers internos de *Wolbachia* e seus respectivos protocolos,

À equipe de coleta da Fundação de Vigilância em Saúde, que garantiu as amostras do projeto,



Ministério da Saúde

FIUCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

*Ninguém foge do seu propósito. O que Deus risca, ninguém rabisca.*

*(Autor desconhecido)*

## RESUMO

A família *Culicidae* abriga os vetores da malária, esses mosquitos do gênero *Anopheles spp.* são responsáveis pela febre malárica na região Amazônica. Das diversas espécies descritas na região, *Anopheles darlingi*, subgênero *Nyssorhynchus*, permanece sendo o vetor primário de locais endêmicos cercados por florestas tropicais, usualmente, infectado por *Plasmodium vivax*. Cepas da bactéria endossimbiótica, *Wolbachia pipientis*, podem infectar artrópodes de importância médica, sendo algumas, capazes de produzir efeitos fenotípicos que interferem no desenvolvimento de patógenos e atuam como biocontrole de vetores. Este estudo tem como finalidade identificar cepas de *Wolbachia* em fêmeas de *Anopheles spp.* coletadas no município de São Gabriel da Cachoeira, uma área de alta transmissão de malária na região amazônica. Os dados gerados por este estudo poderão apresentar a primeira evidência molecular de cepa de *Wolbachia* em Anofelinos do novo mundo em uma área de alta transmissão de malária. **Objetivo:** Investigar a ocorrência da infecção natural por *Wolbachia* em *Anopheles darlingi* capturados em área de alta endemia. **Metodologia:** Mosquitos capturados em dois pontos de São Gabriel da Cachoeira - Amazonas, foram utilizados para detecção de *Wolbachia* e *Plasmodium spp* por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR) **Resultados:** Das 179 amostras analisadas, todas estavam livres de infecção natural por *Wolbachia* e *P. vivax*. **Conclusão:** Nossa contribuição para este tema aponta falta de infecção natural de *Wolbachia* e *Plasmodium vivax* em uma pequena população de mosquitos *Anopheles darlingi* coletados em uma área de hiperendemia malárica, o município de São Gabriel da Cachoeira.

**Palavras-Chave:** *Anopheles darlingi*; Amazonas; *Wolbachia*

## ABSTRACT

The family *Culicidae* harbors the vectors of malaria, these mosquitoes of the genus *Anopheles* spp. are responsible for malaria fever in the Amazon region. Of the several species described in the region, *Anopheles darlingi*, subgenus *Nyssorhynchus*, remains the primary vector of endemic places surrounded by tropical forests, usually infected by *Plasmodium vivax*. Strains of the endosymbiotic bacterium, *Wolbachia pipientis*, can infect arthropods of medical importance, some of which are capable of producing phenotypic effects that interfere with the development of pathogens and act as vector biocontrol. The aim of this study was to identify *Wolbachia* strains in females of *Anopheles* spp. collected in the city of São Gabriel da Cachoeira, an area of high malaria transmission in the Amazon region. The data generated by this study may present the first molecular evidence of a *Wolbachia* strain in New World *Anophelines* in an area of high malaria transmission. **Objective:** To investigate the occurrence of natural *Wolbachia* infection in *Anopheles darlingi* captured in a high endemic area. **Methodology:** Mosquitoes captured at two points in São Gabriel da Cachoeira - Amazonas, were used for detection of *Wolbachia* and *Plasmodium* spp by polymerase chain reaction (PCR) **Results:** Of the 179 samples analyzed, all were free of natural infection by *Wolbachia* and *P. vivax*. **Conclusion:** Our contribution to this theme points to the lack of natural infection of *Wolbachia* and *Plasmodium vivax* in a small population of *Anopheles darlingi* mosquitoes collected in an area of malarial hyperendemic, the city of São Gabriel da Cachoeira.

**Keywords:** *Anopheles darlingi*; Amazonas; *Wolbachia*

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

An. – *Anopheles*

CTLs - Lectina tipo c

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FISH - Fluorescente in situ

FMT - Fundação de Medicina Tropical Dr. Vieira Dourado

FtsZ - Filamenting temperature sensitive mutant Z

UPCCB – Unidade de Pesquisa Clínica Carlos Borborema

IRS - Pulverização residual interna

LLINs - redes inseticidas de longa duração

MLST - Multilocus sequencing typing

OMS – Organização Mundial de Saúde

P. – *Plasmodium*

PB – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “*polymerase chain reaction*”)

PNG - Peptidoglicano

PRGP - Proteína de reconhecimento de peptidoglicano

RT - PCR – PCR em tempo real (do inglês “quantitative polymerase chain reaction”)

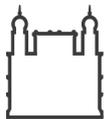
rRNA - Ribossomos

SGC – São Gabriel da Cachoeira

WSP – Proteína de superfície *Wolbachia* (do inglês “*Wolbachia surface protein*”)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de risco de infecção de malária por município em 2021 (SIVEP, 2022) .....	18
Figura 2: Fêmea de Anopheles darlingi realizando a hematofagia. Fonte: Santana, 2021.....	19
Figura 3: Ciclo da malária nos vetores invertebrados e vertebrados (modificado) (Mueller et al., 2019).....	21
Figura 4: Mapa do Estado do Amazonas (IBGE, 2022) .....	32
Figura 5: Amplificação do gene RP49. <b>M</b> : marcador molecular 200kb; <b>PD</b> : pool com amostras diluídas; <b>AC</b> : amostras concentradas; <b>AD</b> : amostras diluídas.....	35
Figura 6: Gel de agarose da amplificação do gene WSP para detecção de Wolbachia. <b>M</b> : marcador 200pb; <b>1-19</b> : pools das amostras; <b>C-1</b> : controle negativo An. aquasalis; <b>C-2</b> : controle negativo H2O ultrapura; <b>C+</b> : controle positivo Culex quinquefasciatus. ....	39
Figura 7: Gel de agarose da amplificação dos genes 18S para detecção de P. vivax. <b>M</b> : marcador 200 pb; <b>1-19</b> : pools das amostras; <b>C-1</b> : controle negativo An. aquasalis; <b>C-2</b> : controle negativo H2O ultrapura; <b>C+</b> : amostra positiva infecção experimental de P. vivax. ....	40

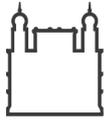


## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de coleta das sub-amostras de <i>Anopheles darlingi</i> - SGC .....	34
Tabela 2: Mix do PCR para detecção do gene constitutivo RP49 .....	35
Tabela 3: Mix da reação para detecção do gene 18S - <i>Plasmodium vivax</i> .....	36
Tabela 4: Mix da reação para detecção do gene WSP - <i>Wolbachia</i> .....	37

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1 Malária .....	18
2.2 Malária – Vetores .....	19
2.3 Malária – Ciclo de transmissão.....	20
2.4 Malária – resposta imune do vetor invertebrado .....	21
2.5 Malária – microbiota do vetor invertebrado .....	22
2.6 <i>Wolbachia</i> .....	23
2.7 <i>Wolbachia</i> – Identificação.....	24
2.8 <i>Wolbachia</i> - Diversidade filogenética.....	24
2.9 <i>Wolbachia</i> – Efeitos fenotípicos .....	25
2.10 <i>Wolbachia</i> – controle biológico .....	25
2.11 <i>Wolbachia</i> – Prevalência em <i>Anopheles spp.</i> .....	26
2.12 <i>Wolbachia</i> – Interação com o <i>Plasmodium</i> .....	28
3 JUSTIFICATIVA .....	30
4 OBJETIVOS .....	31
4.1 Objetivo geral .....	31
4.2 Objetivos específicos .....	31
5 METODOLOGIA.....	32
5.1 Área de estudo .....	32
5.2 Coleta .....	33
5.3 Taxonomia .....	33
5.4 Amostragem.....	33
5.5 Extração de DNA.....	34
5.6 Detecção de <i>Plasmodium vivax por meio</i> da reação em cadeia de polimerase - PCR ...	36
5.7 Detecção de <i>Wolbachia</i> por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR).....	36
5.8 Análise de dados .....	37
5.9. Aspectos éticos.....	37
5.10. Financiamento.....	38
6 RESULTADOS.....	39



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

6.1. Detecção de infecção natural por <i>Wolbachia</i> .....	39
6.2 Detecção de infecção natural por <i>Plasmodium vivax</i> .....	40
7 DISCUSSÃO.....	41
8 CONCLUSÃO .....	44
REFERÊNCIAS .....	45
ANEXOS.....	55

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária transmitida por meio do repasto sanguíneo do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* quando se encontra infectada pelo parasita do gênero *Plasmodium spp.* (Veronese, 2015). Cinco espécies de *Plasmodium* podem causar malária em humanos: *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium knowlesi*; *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*, todavia, as mais frequentes no Brasil são as espécies *P. falciparum* e *P. vivax* (Kumar, 2019).

Presente em zonas tropicais e subtropicais, no ano de 2021 foram registrados 247 milhões de casos de malária no mundo e 619.000 óbitos, sendo 95% dos casos concentrados na região Africana (WHO, 2022). Segundo o SIVEP (2022), No Brasil, a região amazônica concentrou 99% das infecções maláricas, em 2021, o Amazonas apresentou uma diminuição de cerca de 28% de casos, em relação ao ano de 2020 – cerca de 58.973 mil casos –, dos quais 80% das infecções foram causadas pelo *Plasmodium vivax*; 19,97% por *Plasmodium falciparum*, e 0,02% por *Plasmodium spp.* As áreas mais afetadas foram as indígenas e rurais, com 39,70% e 39%, respectivamente (SIVEP, 2022). Apesar da redução nos casos, estes resultados ainda demonstram malária ativa sendo necessário o desenvolvimento de novos mecanismos de controle da doença.

A vacina contra malária é um objetivo antigo da comunidade científica para diminuir os indicadores de malária. Em 2021, um marco histórico no desenvolvimento vacinal para doença foi atingido, a primeira vacina para malária foi oficialmente recomendada pela OMS que se caracteriza como um grande avanço na busca por novos métodos. Por enquanto, essa solução não pode ser avaliada no cenário mundial, pois a vacina é somente recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para as crianças da África subsaariana (Vogel, 2021). Além disto, não abrange a prevenção de infecções por *P. vivax*, a espécie mais prevalente da região Amazônica que embora menos virulenta que *P. falciparum*, ainda é um fardo para a saúde pública da região, além do mais, é responsável pela malária latente (Martin & vintz et al., 2018).

O uso de inseticidas contra vetores, como a pulverização residual interna (IRS) e o mosquiteiro tratado – redes inseticidas de longa duração (LLINs) – são um dos principais métodos dos programas atuais de controle da malária (WHO, 2023). Entretanto, o uso de forma contínua dos inseticidas, pode provocar uma seleção de mutações genéticas, fenotípicas ou comportamentais, gerando o fenômeno de resistência, permitindo que o

controle vetorial não seja tão efetivo em várias gerações daqueles mosquitos que adquiriram insensibilidade ao químico (Mallet, 1989). O aumento da incidência à resistência de inseticidas reflete nos números alarmantes de casos (Dondorp et al, 2010).

Para driblar a escassez de novos métodos de controle da malária, é necessário desenvolver novos meios para bloquear o desenvolvimento do patógeno. A vulnerabilidade do parasita verificada durante três importantes estágios durante a transição do seu desenvolvimento no intestino médio do mosquito – transição entre: gametócitos e oocineto; oocineto e oocistos; esporozoítos do intestino médio e os das glândulas salivares (Hillyer et al., 2007) indica que, mesmo em áreas de alta transmissão, pode haver um baixo número de oocistos – entre cinco ou menos – demonstrando uma perda significativa de parasitas (Whitten et al., 2006). Este exemplo de gargalo, pode causar uma ruptura no sucesso da infecção, tornando o compartimento intestinal do mosquito, um importante alvo de novas intervenções de controle de transmissão.

Diversos fatores influenciam para se obter o sucesso da infecção tais como: aspectos fisiológicos; a resposta imune do hospedeiro invertebrado; produção de enzimas proteolíticas; invasão da barreira peritrófica; etc. Dentre os fatores que podem influenciar na interação patógeno-hospedeiro no invertebrado inclui-se a microbiota do vetor pois o sucesso da infecção depende de um complexo mecanismo dentro do intestino médio do mosquito (Ngotho et al., 2018).

O intestino do mosquito é colonizado por vários microrganismos, essa interação dinâmica é composta por fungos, vírus e bactérias, principalmente bactérias gram negativas (Vythilingam, 2013; Wilke & Marrelli, 2015) Estudos demonstram que o papel da microbiota na modulação da infecção afeta não somente a transmissão, como também afeta, aspectos da fisiologia do mosquito, como sua sobrevivência. A modulação da microbiota é uma possível ferramenta como controle vetorial e como ferramenta de bloqueio patogênico que pode ser através de mecanismos naturais de competição (Dong et al., 2009), simbiótica natural – sem necessidade de intervenções genéticas – ou por meio de paratransgênese, uma técnica de introdução genética que expressa genes para produção de moléculas que estimulam o sistema imune do mosquito ou produção de metabólitos, atingindo diretamente a sobrevivência do parasita (Wang et al., 2017).

O uso de microrganismos endossimbiontes se mostra promissor. Com técnicas de baixo custo e simplificadas, a utilização deste meio vem demonstrando sucesso no controle de

transmissão de doenças infecciosas e na supressão de artrópodes (Dobson SL, 2021). As bactérias simbióticas oferecem benefícios aos seus hospedeiros, como suplementos nutricionais, maior tolerância ao ambiente e manipulam a homeostasia imunológica do hospedeiro (Weiss B & Aksoy S., 2011). Ademais, algumas espécies de bactérias não patogênicas encontradas naturalmente na microbiota de mosquitos, podem secretar compostos que ao serem expostos ao patógeno, refratam o seu desenvolvimento, neste caso, a cepa Su\_YN1 de *Serratia ureilytica* que refrata parasitas da malária (Gao et al., 2021).

Neste sentido, introduz-se a bactéria *Wolbachia pipientis*, gram-negativa, pertencente a classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales tendo caráter intracelular obrigatória ou facultativa, sendo a única de seu gênero. A *Wolbachia*, como é referida de forma convencional, foi identificada pela primeira vez há quase um século em mosquitos do gênero *Culex* e é distribuída em mais de 40% das espécies de inseto (Herting e Wolbach, 1924).

Sua principal via de transmissão é a herança vertical pelas linhas germinativas maternas. Apresentando alto tropismo tecidual ovariano (Frydman et al., 2006). A sua ocorrência de forma natural é um ponto crucial para o seu uso como agente modificador em um vetor do meio selvagem, pois não há a necessidade de modificações genéticas, desafio este que abrange questões éticas e legais (Johson KN, 2015) (Yen PS, 2020). A possibilidade de sua habitação na microbiota e ser transmissível de forma natural são pontos a serem consideradas para indicar um microorganismo como potencial agente simbiote.

O seu sucesso no biocontrole de arboviroses é observado pela diminuição dos casos de dengue, chikungunya, febre amarela, desenvolvimento da prole através do efeito de incompatibilidade citoplasmática e interferência no desenvolvimento do patógeno em *Aedes aegypti* da natureza (Kittayapong et al., 2019). Esses efeitos apontam que este endossimbiote tem um impacto negativo tanto na replicação de alguns vírus transmitidos por artrópodes, como em sua fertilidade.

Estudos da prevalência de *Wolbachia* em *Anopheles* ainda são escassos, mas mostram a possibilidade de interação entre *Anopheles-Wolbachia*, um receio antigo dos pesquisadores em não ser possível. Baldini et al (2014) relataram em seu estudo a possibilidade de infecção natural de *Wolbachia* – cepa *W Anga\_TZ* – em *Anopheles arabiensis* (3,1%) porém não foi observado o mesmo em *Anopheles funestus* (0%), ambos coletados no Oeste da Tanzânia. Em aldeias do Mali foi identificada a prevalência da cepa *w Anga-Mali Wolbachia* em *An. gambiae* e *An. coluzzii* (Gomes et al., 2017).

Alta densidade de *Wolbachia* foram identificadas em populações geograficamente diversas de *Anopheles moucheti* e *Anopheles demeilloni* por meio de q-PCR e hibridização fluorescente in situ (FISH). O sequenciamento do genoma identificou homólogos de genes fatores de incompatibilidade citoplasmática (CIF), apontando que as cepas desta espécie são capazes de induzir fenótipos de incompatibilidade (Walker et al., 2021). O sequenciamento bacteriano elucidou a capacidade da bactéria de ser utilizada como biocontrole, tendo em vista que algumas cepas são mais indutoras e outras não, além de, avaliar a executabilidade da transmissão endossimbiótica.

Os estudos de prevalências foram realizados em regiões endêmicas de *P. falciparum*, principalmente, coletando mosquitos em campos da África ocidental, caracterizando assim, a carência de estudos realizados em áreas endêmicas por anofelinos americanos infectados por *P. vivax* para deferimento de prevalência por *Wolbachia*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Malária

A malária é uma doença de caráter parasitário que afeta a saúde pública e socioeconômica de países com climas tropicais e subtropicais, principalmente nas comunidades mais pobres ao redor do mundo. Seu agente causador é o parasita do gênero *Plasmodium*. Para malária humana, existem cinco espécies de importância clínica e epidemiológica: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium. malariae*, *Plasmodium. ovale*, *Plasmodium. knowlesi* sua transmissão ocorre pelo repasto sanguíneo do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (Sinka, 2012; Brasil et al. 2017).

De acordo com o “World Malaria Report” 2022 da Organização Mundial da Saúde (OMS), Em 2021, registrou-se 247 milhões de casos com cerca de 619.000 mortes no mundo. No mesmo ano, o Brasil teve 139.211 (26%) de todos os casos confirmados, sendo 23.408 infecções por *P. falciparum*/mista e 114.449 por *P. vivax* (WHO, 2022). De todos os casos autóctones no Brasil, a região Amazônica foi responsável por 99,9% dos casos, sendo 39% no estado do Amazonas (Brasil, 2022).

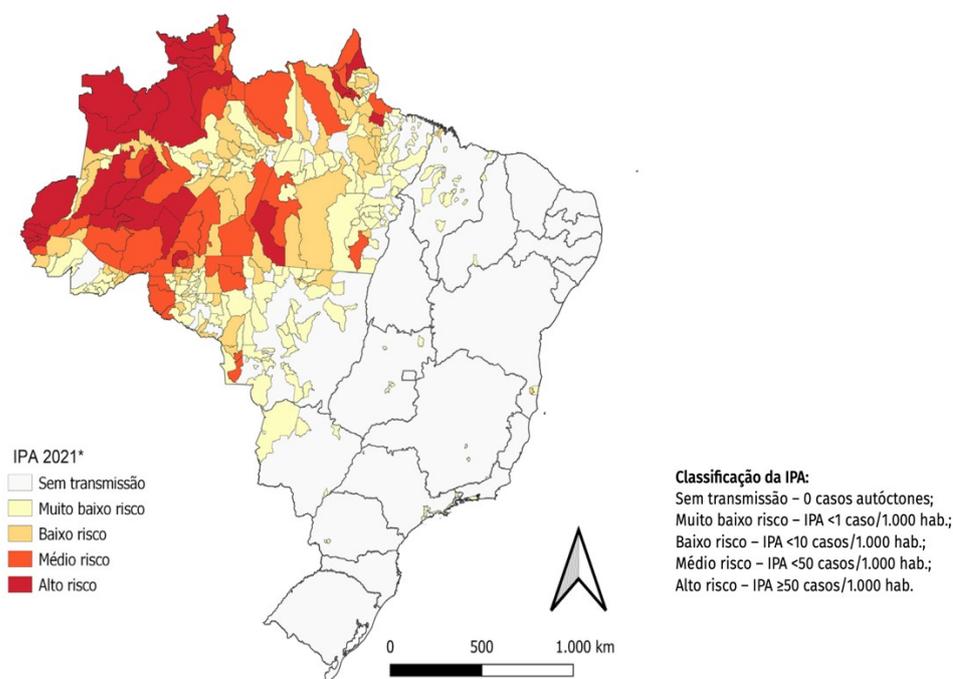


Figura 1: Mapa de risco de infecção de malária por município em 2021 (SIVEP, 2022)

Dos casos notificados na região amazônica, o município de São Gabriel da Cachoeira, possui a maior quantidade de casos prováveis de infecção, sendo 10.110 em 2021, 9.119 em 2022 e 3.297 até junho de 2023 (SIVEP-malária, 2023).

## 2.2 Malária – Vetores

Os vetores da malária humana são mosquitos do gênero *Anopheles*, pertencentes a cinco subgêneros – *Anopheles* Meigen, 1818; *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902; *Stethomyia* Theobald, 1902; *Kerteszia* Theobald, 1905; *Lophopodomyia* Antunes, 1937. No Brasil, as espécies vetorais são pertencentes aos subgêneros *Nyssorhynchus* e *Kerteszia* (Deane, 1986; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994)

Cerca de 33 espécies são descritas na região amazônica brasileira, do qual *Nyssorhynchus darlingi*, conhecido anteriormente como *Anopheles darlingi*, é considerado o principal vetor da malária na região Neotropical da bacia do Rio Amazonas, além de abranger regiões que vão do México à Argentina (Alonso et al., 2021; Sinka 2012). Esta espécie, pode se reproduzir às margens dos corpos hídricos, com baixa fluidez, tendo águas ácidas – pH em torno de 4,5 – de baixa profundidade e límpidas, com sombreados parciais (Tadei et al., 2017). Esta espécie possui duas características que são consideradas essenciais para transmissão de patógenos a humanos: antropofilia, que é a preferência por alimentação sanguínea em humanos, e, endofagia – preferência por realizar o repasto sanguíneo em ambientes internos – (Barbosa et al., 2016). Ademais, *An. Darlingi* possui suscetibilidade à infecção natural por *Plasmodium*, podendo variar entre 0,24 e 3,96% na região Norte brasileira (Sallum et al., 2019).



Figura 2: Fêmea de *Anopheles darlingi* realizando a hematofagia. Fonte: Santana, 2021.

Outras espécies de anofelinos podem ser consideradas vetores secundários ou ocasionais da malária devido à sua densidade populacional; comportamento antropofílico e infecciosidade natural em suas distribuições geográficas, as espécies *Anopheles albitarsis*, *Anopheles nuneztovari* e *Anopheles oswaldoi* são amplamente distribuídas na região Amazônica, entretanto, ainda não foram caracterizadas como potenciais transmissores, necessitando de mais estudos entomológicos para definir (Deane L, 1986; Tedei, 2000; Sinka, 2012).

### **2.3 Malária – Ciclo de transmissão**

A interação entre parasita e vetor inclui um ciclo reprodutivo assexuado no hospedeiro humano e um ciclo de reprodução sexuada no mosquito. A doença resulta do ciclo reprodutivo no homem, que possuem dois ciclos, o hepático e o eritrocítico. Quando a fêmea *Anopheles*, faz o seu repasto sanguíneo, ela inocula os esporozoítos através da sua saliva que entra em contato com o sistema circulatório do ser humano, os esporozoítos possuem tropismo pelas células hepáticas e se projetam dentro dos hepatócitos. O ciclo hepático tem duração de cerca de 14 dias e se inicia com o desenvolvimento do estágio assexuado, o parasita pode adquirir duas formas, sendo a forma de merozoíto que é replicada sucessivas vezes dentro dos hepatócitos ou para algumas espécies, como *P. vivax*, podem se transformar em hipnozoítos, a forma latente da malária. Os merozoítos e ao rompê-los, chegam até a corrente sanguínea, para iniciar o estágio eritrocítico. Com os glóbulos vermelhos invadidos, o merozoíto se diferencia em estágio anelar, trofozoíto e esquizonte, é nessa fase sanguínea que aparecem os sintomas da malária. Após replicação, alguns trofozoítos se diferenciam em gametócitos, dando origem a forma sexuada do *Plasmodium* que será ingerida pelo mosquito (Meibalan, 2017; Veronesi, 2015).

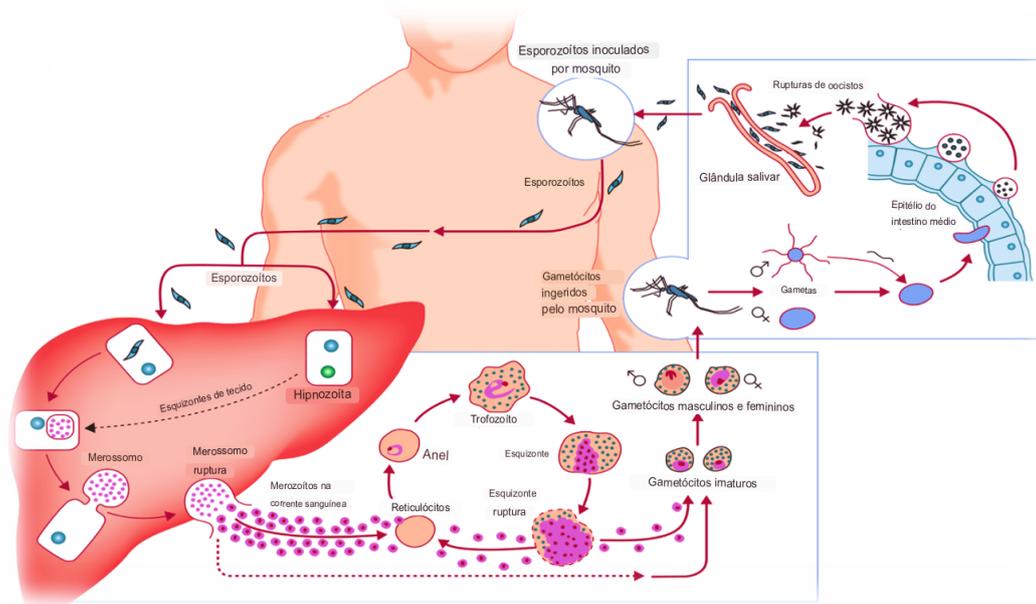


Figura 3: Ciclo da malária nos vetores invertebrados e vertebrados (modificado) (Mueller et al., 2019)

O ciclo de vida no mosquito começa quando a fêmea do anofelino faz o repasto sanguíneo contendo as formas sexuadas, os gametócitos se diferenciam em gametas. No intestino médio os microgametas passam pelo processo de exflagelação pelo qual o DNA se replica para  $8N$ , seguido pela formação de oito microgametas haplóides e se fundem ao macrogameta formando zigoto diplóide e subsequente em tetraplóide, a forma móvel do oocineto migra pelo bolo de sangue para invadir e atravessar o epitélio do intestino médio do mosquito. Após passar por várias células epiteliais, o oocineto emerge do lado basal voltado para a hemocele, onde se aloja abaixo da lâmina basal e se diferencia em oocisto. Dependendo da espécie de *Plasmodium*, pode variar de 10 a 18 dias para os oocistos aumentarem de tamanho e passar pelo ciclo esporogônio, por fim, libera os esporozoítos na hemolinfa que migrarão até as glândulas salivares do mosquito, capacitando-o para fazer uma nova infecção. (D.A Milner, 2018; Veronesi, 2015; Smith, 2014).

#### 2.4 Malária – resposta imune do vetor invertebrado

Segundo estudos, o maior gargalo para o desenvolvimento do *Plasmodium* é a invasão nas células do mosquito (Vaughan et al., 1994; Bennink et al., 2016). A microbiota oferece um fator determinante na proteção antiparasitária, o contato direto da forma oocineto com as células epiteliais do intestino médio é responsável por ativar o processo de resposta imune (Rodrigues et al., 2010). Componentes microbianos, como peptidoglicano (PNG) são

responsáveis por estabelecer imunidade basal, induzindo genes com reatividade cruzada contra microorganismo (Dong et al., 2009). Além de, algumas cepas de bactérias serem capazes de atingir diretamente o *Plasmodium* através de produção enzimática (Gao et al., 2021). A refratariedade do desenvolvimento do patógeno é em razão da resposta imune humoral e celular inata, já que não há resposta adaptativa, ademais, barreiras físicas como a síntese da matriz peritrófica no lúmen do intestino oferecem proteção ao mosquito.

A resposta humoral pode ser caracterizada por quatro etapas diferentes. A primeira etapa envolve o reconhecimento de moléculas patogênicas através de receptores – Lectina tipo C (CTLs); Proteínas de reconhecimento de peptidoglicano (PRGP), além de outras – essas proteínas vão reconhecer e se ligar aos padrões moleculares do patógeno. A segunda etapa é a modulação, este processo amplifica os sinais através de serino-proteases (serpinas) que irão conduzir uma cascata proteolítica de sinais, ativando assim a resposta efetora desencadeada pelo prévio reconhecimento. As vias de transduções interligam a fase de reconhecimento e a de amplificação, ativando as vias transcricionais. Estudos relatam que essa resposta ocorre predominantemente em insetos por duas vias, a Toll e a Imd, que fazem o controle da regulação dos genes do sistema imune (Christophides et al., 2002). Em mosquitos, como *Anopheles gambiae*, há a participação de uma terceira via, a JAK/STAT, que possui clara importância na resposta contra infecções bacterianas (Michel K, 2005) (Hoffman & Reichhart, 2002). Por fim, ocorre a transcrição de genes relativos à resposta efetora, que pode ser a síntese de peptídeos antimicrobianos (Levashina EA, 2004) e o sistema de melanização dependente de fenol-oxidase (Christophides et al., 2002).

A resposta imune celular resulta na fagocitose e encapsulação celular, ambos mediados por hemócitos que são células circulantes da hemocele, capazes de fagocitar microrganismos e encapsulá-los quando se agregam ao redor (Michel K, 2005).

## **2.5 Malária – microbiota do vetor invertebrado**

Os mosquitos estão continuamente expostos a uma variedade de microrganismos em seu ecossistema. Alguns destes seres - bactérias, fungos, protistas, vírus e nematoides coevoluíram e desenvolveram relação simbióticas (Chandler et al., 2015). Os simbióticos residem em múltiplos órgãos, como o intestino, ovário, túbulos de Malpighi e hemocele (Eleftherianos et al., 2013), há um crescente interesse em se compreender a dinâmica da

microflora intestinal, pois este compartimento, representa o primeiro local de exposição mais extenso a patógenos, se tornando alvo de intervenções.

A transferência microbiológica para o artrópode é vista desde seu momento larval, a água dos criadores fornece a principal fonte de contaminação nesta fase, já na fase adulta, os mosquitos provêm seu microbioma de águas emergentes, bem como de açúcar de plantas/néctares de flores e/ou do repasto sanguíneo no caso das fêmeas (Steyn et al., 2016). Esta trajetória evolutiva concedeu ao mosquito a classificação de holobiótico, ou seja, o hospedeiro não é considerado uma entidade isolada, e sim uma quimera com interações próximas com o seu microbioma (Rosenberg et al., 2007). Essas relações podem ter influência na adaptação, aclimatação e evolução de seus hospedeiros, modulando mecanismo essenciais de sobrevivência como nutrição (Souza et al., 2019), desenvolvimento (Valzania et al., 2018), sobrevivência (Steyn et al., 2016) ativação da imunidade (Dong et al., 2009), competência vetorial (Bahia et al., 2016).

As bactérias são as principais integrantes da microbiota, elas participam do fornecimento de nutrientes, aptidão de insetos, maturação da imunidade e/ou transmissão de patógenos. Estudos com bactérias gram-negativas demonstraram prejuízos por múltiplos mecanismos durante a infecção por patógenos, podendo ser por meio de competição por recursos nutricionais – como por exemplo, a bactéria *Wolbachia* sequestra colesterol e outros lipídios das células (Moreira et al., 2009), sendo esses macronutrientes necessários para replicação viral (Rothwell et al., 2009) e desenvolvimento plasmodial (Atella et al., 2009) – por secreção de moléculas refratárias patogênicas (Gao et al., 2021), por lise em parasitos de *Leishmania* (MORAIS et al., 2008), por lise e formação de biofilme em *Tripanossoma cruzi* (Castro et al., 2007) e inibição de *Plasmodium sp.* por produção de intermediários reativos de oxigênio (ROS) (Cirimotich et al., 2011).

## 2.6 *Wolbachia*

A *Wolbachia pipientis* é uma espécie de bactéria gram-negativa endossimbiótica pertencente a classe Alphaproteobacteria da ordem *Rickettsiales*, gênero *Wolbachia* (Casiraghi et al., 2005), sendo identificada pela primeira vez em 1923 em ovários de mosquitos *Culex pipiens* (M, 1924). Estudos apontam que 40% de todas as espécies de insetos apresentam de forma natural cepas do gênero *Wolbachia*, essa relação apresenta variabilidade entre parasitismo/comensalismo, sendo visto entre *Wolbachia*-artrópodes e no

mutualismo podendo ser observado na interação *Wolbachia*-nematóide (Bordenstein et al., 2009; Fenn & Blaxter, 2006; Dobson, 2002).

Em artrópodes, apresentou ser um potencial controle vetorial, sua biologia oferece diferentes fenótipos podendo gerar refratariedade no desenvolvimento de patógenos (Araújo ET AL., 2015), feminização (Werren, 2008) e incompatibilidade citoplasmática (IC) (Turelli et al., 1995) em seus hospedeiros. Esses processos aumentam as suas chances de sua transmissão para a progênie (Werren, 2008). Além disto, pode influenciar nas características biológicas do vetor, como o tempo de vida (Moreira et al., 2009; Mcmeniman, 2009).

### **2.7 *Wolbachia* – Identificação**

A partir da sua descoberta em 1923 por meio de microscopia eletrônica, cientistas se empenharam para desvendar a sua distribuição na natureza e diversidade filogenética (Herting & Wolbach, 1924). Os métodos de detecção são por meio de várias técnicas moleculares que apresentam sensibilidade e especificidade variáveis, como reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR com vários marcadores, por exemplo, multilocus sequencing Typing (MLST), PCR quantitativo (qPCR), métodos de microscopia, como hibridização fluorescente *in situ* (FISH), microscopia eletrônica etc., tornaram possível avaliar a sua distribuição (Vinogradova et al., 2003; Jeffries et al., 2018; Leggewie et al., 2018).

Os genes utilizados com mais frequência para detecção são: FtsZ (do inglês “filamenting temperature-sensitive mutant Z”), responsável por codificar uma das proteínas presente na divisão celular; WSP (do inglês “*Wolbachia* surface protein”), que codifica a proteína de adesão específica sendo possível dividir o clado em 12 subgrupos (Zhou et al., 1998) e 16S rDNA (Augustinus et al., 2011), codifica uma das subunidades que compõe o ribossomo (rRNA), este último sendo o mais utilizado pois tem alta conservação em finalidades taxonômicas e filogenéticas (Mcgarry et al., 2004).

### **2.8 *Wolbachia* - Diversidade filogenética**

*W. pipientis* é considerada a única espécie do gênero *Wolbachia*, porém, há uma grande diversidade genômica, sendo caracterizada por dezessete grupos maiores diferidos entre A-R (exceção G) e linhagens. Essas definições foram realizadas baseando se na diferença do genoma da região ribossômica 16s. Esses supergrupos apresentam distribuições distintas sendo o A e B os mais encontrados em artrópodes, enquanto que o C e D são observados em nematóides filariais. Além dessas classificações, a *Wolbachia* é classificada em cepas de

acordo com as suas divergências genômicas e os efeitos causados nos seus respectivos hospedeiros (Augustinos et al., 2011; Glowska et al 2014).

O sucesso na ação de controle vetorial é observado em razão das compatibilidades entre cepa e hospedeiro (Hoffmann & Turelli, 1997). Segundo autores, estudos sobre a diversidade filogenética é um dos pontos chaves para a liberação da *Wolbachia* na natureza, pois infecções naturais previas podem ter interações e alterar a dinâmica das novas cepas introduzidas (Yen, 2020).

### **2.9 *Wolbachia* – Efeitos fenotípicos**

A *Wolbachia* é capaz de induzir quatro tipos fenótipos de parasitismo reprodutivos que induzem efeitos diferentes em seus hospedeiros artrópodes, sendo esses efeitos o de incompatibilidade citoplasmática, killer male, partenogênese e feminização.

A incompatibilidade citoplasmática é o processo mais descrito em artrópodes, ocorrendo principalmente em duas formas: unidirecional e bidirecional. A incompatibilidade citoplasmática unidirecional proporciona a morte embrionária em cruzamentos entre machos positivos para *Wolbachia* e fêmeas que não abrigam a bactéria. No modo bidirecional a morte da prole é induzida pela incompatibilidade de cepas de *Wolbachia* entre o macho e a fêmea que abrigam a bactéria durante o acasalamento (Shropshire et al, 2020).

À nível de biologia celular, estudos com moscas masculinas *Drosophila melanogaster* elucidam melhor este processo. A expressão dos genes WO do profago *Wolbachia* induzem a expressão de fatores de incompatibilidade citoplasmática que são codificadas pelos genes cif A e cif B, esses genes são transportados pelos gametas gerando defeitos de segregação cromossômica, os prónucleos masculinos e femininos não sincronizam na primeira fase da mitose, gerando erros de desenvolvimentos nas primeiras divisões celulares do ovo fertilizado, constituindo a inviabilização do ovo, o que resulta na ausência de descendentes viáveis (Shropshire and Bordenstein 2019). Esse método é conhecido como: técnica de inseto incompatível, pois reduz a população alvo de um determinado local, agindo como controle vetorial (Yen J.H, 1971; Werren, 2008).

### **2.10 *Wolbachia* – controle biológico**

Seu uso como controle biológico é realizado pelo método de substituição de fêmeas livres de *Wolbachia* por aquelas com cepas de *Wolbachia* indutoras de fenótipos e capazes de bloquear o desenvolvimento de arbovírus, como o causador da Dengue, Zika,

Chikungunya e Febre amarela (Ye, 2015; Dutra, 2016; Aliota et al., 2016; Rocha et al., 2019), além de reduzir o desenvolvimento de parasitas (Bian et al 2013). Esse mecanismo ocorre com mosquitos machos infectados com a bactéria que são liberados no ambiente natural para infectar fêmeas estéreis de *Wolbachia* durante o acasalamento (Hofmann, 2011).

O sucesso dessa estratégia vem sendo observado em programas de controle vetoriais e patogênicos. Um estudo clínico randomizado controlado, realizado em Yogyakarta, na Indonésia, demonstrou uma redução de 77% na incidência de dengue nas áreas que mosquitos do gênero *Aedes* foram tratados com *Wolbachia* em comparação com as áreas não tratadas (WMP, 2011). No Brasil, áreas tratadas com *Aedes aegypti* infectados demonstraram em dados prévios uma redução de até 77% nos casos de dengue e 60% nos casos de Chikungunya (WMP, 2021). Outros países como Estados Unidos com foco na redução de *Aedes albopictus* e *Ae. aegypti* (Mains et al, 2019), Taiti com *Aedes polynesiensis* e China com *Ae. albopictus*, demonstraram reduções vetoriais eficazes (Ritchie et al., 2018).

O poder de transmissão vertical e horizontal da *Wolbachia*, permite uma disseminação bem-sucedida e estável entre os artrópodes. Encontradas no citoplasma das células, principalmente nos tecidos reprodutivos (Rainey, 2014; Werren et al., 2008), estudos demonstraram que apesar do mecanismo de IC ser eficaz no bloqueio de progênie viável por meio da transmissão horizontal (Kriesner et al., 2013), as fêmeas infectadas ainda são capazes de produzir progênie viável, de forma independente do acasalamento ser com machos infectados ou não, este processo é pouco lucidado, entretanto, demonstra um favorecimento na sua disseminação (Werren et al, 2008).

Em *Anopheles*, a incompatibilidade citoplasmática já foi verificada. Walker et al., (2021) confirmaram a presença de homólogo de genes do fator de Incompatibilidade citoplasmática (cif) em mosquitos selvagens coletados em várias regiões da África subsaariana, indicando que cepas específicas (W AnM e w And) de *Wolbachia* são capazes de induzir o fenótipo de IC e realizar o resgate de espermatozoides nesses anofelinos.

### **2.11 *Wolbachia* – Prevalência em *Anopheles* spp.**

Estudos da prevalência de *Wolbachia* em *Anopheles* ainda são escassos, porém é possível visualizar infecções naturais em algumas áreas. Baldini et al (2018) relataram em um estudo a infecção natural da cepa w Anga\_TZ *Wolbachia* em *Anopheles arabiensis* (3,1%) porém não foi observado o mesmo em *Anopheles funestus* (0%), ambos coletados no

Oeste da Tanzânia. Em aldeias do Mali foi identificada a prevalência da cepa wAngaMali *Wolbachia* em *An. gambiae* e *Anopheles coluzzii* (Gomes, 2017).

Na região do Senegal, três de 247 fêmeas de *An. funestus* testaram positivo para as cepas wAnfu-A e wAnfu-B, demonstrando uma taxa de infecção de 1,21% nesta população selvagem de mosquitos (Niang et al., 2018). Além disso, 16 de 49 *An. arabiensis* coletados na cidade de Soumouso tinham a bactéria, sendo uma frequência de 33%. Outro estudo realizou um rastreio de maior abrangência na África Subsaariana, avaliando mosquitos de cinco países endêmicos de malária, sendo: Guiné, República Democrática do Congo, Gana, Uganda e Madagascar, nesses locais foram coletados *An. coluzzii*, *An. gambiae* ss, *An. arabiensis*, *Anopheles moucheti*, sendo que todos estavam infectados com prevalências entre 4% e 91% (Jeffries et al., 2018).

Na região do Valley-California, Estados Unidos, foram feitas coletas de várias espécies de culicídeos das quais três eram anofelinos, sendo: *Anopheles punctipennis*, *Anopheles franciscanus* e *Anopheles species A*, dessas espécies apenas *An. punctipennis* foi detectado com uma taxa de infecção de 5,3% (1/19) por *Wolbachia* (Torres et al., 2020).

As coinfeções naturais por *Wolbachia* e *Plasmodium*, foram descritas em mosquitos asiáticos. Wong et al., (2020) identificou cepas wsp em 14 (38,24%) amostras de *Anopheles* positivas para *Plasmodium* das florestas da Malásia, das quais 1 em 9 (11,1%) apresentavam oocistos e 4 de 8 (50%) apresentavam esporozoítos, a análise filogenética revelou que a maioria pertencia ao supergrupo B. Assim como este estudo, outro conduzido por Tongkrajang et al (2020) relatou a amplificação do rRNA 16s em *Anopheles spp.* oriundos de uma região de baixa transmissão da Tailândia sendo as cepas de *Wolbachia* pertencentes ao supergrupo B.

A importância de relacionar as cepas a este supergrupo, é que ele já apresentou associação com a supressão do desenvolvimento de *Plasmodium* em *An. stephensi* (Bian et al., 2013), o que permite possível uso para bloqueio de desenvolvimento do plasmódio. Em ambos os estudos, a construção da árvore filogenética relacionou a aproximação das cepas e em quais mosquitos apresentavam coinfeções.

A baixa prevalência em alguns lugares pode sugerir uma relação simbiótica instável entre *Wolbachia* e *Anopheles* (Chrostel, 2019) contudo, há indicativos que o fator ambiental e a microbiota podem influenciar na presença de *Wolbachia* em *Anopheles spp.* (Jeffries et al., 2018; Straub et al., 2020). Além disto, as falhas nos métodos de detecção e a pobreza de

informações genéticas podem diminuir ainda mais os relatos de infecção natural (Inácio et al., 2021). Um estudo recente relatou novas cepas naturais (w AnsX) de *Wolbachia* em *An. gambiae* selvagens híbridos de duas regiões da Guiné, sugerindo que a prevalência e diversidade podem ter sido substancialmente subnotificadas até o momento (Jeffries et al., 2021).

### 2.12 *Wolbachia* – Interação com o *Plasmodium*

A interação entre *Wolbachia* e *Plasmodium* é elucidada por estudos com mosquitos criados em colônias laboratoriais e mosquitos coletados do campo. Em 2011, Hughes et al., caracterizaram infecções somáticas de cepas wMelPop e wAlbB de *Wolbachia* em *An. gambiae*, o principal vetor da malária nas regiões Africanas, a infecção ocorreu em todo corpo dos mosquitos, mostrando implicações no desenvolvimento de oocinetos através da modulação do sistema imune. A indução imunológica por *Wolbachia*, coincidiu com a eliminação inicial da infecção, além disto, o estudo observa a interação da cepa com a alimentação de sangue. A refeição de sangue modifica o grau de virulência da cepa, sendo avirulenta antes e extremamente virulenta após 12h-24h de uma refeição.

Em experimentos com *Plasmodium berghei*, a cepa wAlbB apresentou um aumento significativo na infecção plasmodial, não tendo efeitos negativos na sobrevivência do mosquito, antes e após as refeições de sangue. O resultado se mostrou diferente para cepa wMelPop, que está sendo mais eficaz nos efeitos de refratariedade plasmodial nos dois tempos de refeição, porém tendo como lado negativo: fator virulento na sobrevivência do mosquito (Hughes et al., 2012). Os resultados destes estudos sugerem que as cepas de *Wolbachia* diferem em suas atuações nos hospedeiros e/ou patógenos.

Bian et al (2013) demonstraram interferência no desenvolvimento de *P. falciparum* em mosquitos *An. stephensis* por transinfecção com a cepa wAlbB de *Ae. albopictus*, sendo ainda visto, transmissão vertical estável e a capacidade de indução de altos níveis de incompatibilidade citoplasmática.

Em acordo com este experimento laboratorial, Shaw et al (2016) coletaram 602 *An. coluzzi* em uma região de alta transmissão de malária em Burkina Faso, dos quais 275 mosquitos positivaram para cepa de *Wolbachia* wAnga (46%). Destes, 221 foram utilizados para avaliar o desenvolvimento de *Plasmodium* em anofelinos do campo, os resultados demonstraram uma redução de mais de 90%, sugerindo que a cepa wAnga pode influenciar

no ciclo de vida do *Plasmodium*. Ademais, eles realizaram um modelo matemático, que revelou um potencial bloqueio de transmissão da malária por vetores infectados.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os índices de casos de malária nas Américas reduziram, todavia, ainda há malária ativa em algumas regiões amazônicas. Entre os diversos fatores que contribuem para este aumento, pode-se destacar o crescimento populacional desordenado que ocupa zonas de mata primária, causado mudanças no comportamento da doença e dos vetores. A busca por mecanismos mais eficazes e que não prejudique o ecossistema dos vetores levou os cientistas a observar um futuro promissor em métodos com o uso de bactérias simbiótica, sendo a grande maioria, bactérias gram-negativas. A biologia destes microrganismos apresenta benefícios aos seus hospedeiros, assim, como malefícios ao desenvolvimento patogênico. A bactéria endossimbiótica, *W. pipientis*, infecta 40% dos artrópodes, incluindo, muitas espécies de mosquitos de importância médica. Algumas cepas de *Wolbachia* produzem efeitos fenotípicos capazes de interferir no desenvolvimento do *Plasmodium* em fêmeas de *Anopheles sp.* igualmente como age em arboviroses. O uso de *Wolbachia* como meio de bloquear a transmissão da malária pode ser uma estratégia emergente no controle de vetores e patógenos em áreas altamente endêmicas, portanto, a identificação de cepas de *Wolbachia* no principal vetor da malária no Amazonas, pode revelar informações fenotípicas que podem ser utilizadas como um futuro uso para controle de transmissão, uma vez que a cepa de *Wolbachia* é capaz de interferir no ciclo de transmissão do *Plasmodium*. Este estudo tem como finalidade identificar cepas de *Wolbachia* em fêmeas de *An. darlingi* coletadas no município de São Gabriel da Cachoeira, uma área de alta transmissão de malária na região amazônica.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência da infecção natural por *Wolbachia* em *Anopheles darlingi*, avaliar sua diversidade e detectar a infecção de *Plasmodium vivax*.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a taxa de infecção natural por *Wolbachia* em *Anopheles darlingi*;
2. Determinar a taxa de infecção natural por *Plasmodium vivax* nos anofelinos coletados



Duas áreas foram selecionadas, sendo a primeira em Santo Alberto e a segunda área foi há 22km da estrada de Camanaus, em um sítio chamado informalmente de “sítio do seu Bené”, ambas situadas na zona perirubana de São Gabriel da Cachoeira – AM.

## 5.2 Coleta

As coletas foram realizadas em área peridomiciliar, por meio do método de atração humana protegida com auxílio de aspirador manual de Castro (FORATTINI, 2002) seguindo o “guia para planejamento das ações de captura de Anofelinos pela técnica de atração por humano protegido (TAHP) e acompanhamento dos riscos à saúde do profissional capturador” (Brasil, 2019), no horário das 18:00 às 00:00 devido à atividade do gênero. Após a coleta, os mosquitos foram acondicionados em gaiolas, contendo a identificação do local, data e horário de captura, receberam alimentação sanguínea de ave e foram transportados por aeronave para a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – Unidade de Entomologia Nelson Ferreira Fé – FMT-HDV/UENFF situada em Manaus-AM para realização de taxonomia e armazenamento.

## 5.3 Taxonomia

A classificação taxonômica foi realizada pelo entomólogo Nelson Fé de acordo com as chaves de identificação entomológica de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994). Em seguida, os mosquitos foram agrupados em pool com 10 mosquitos por espécie, acondicionados em microtubo secos e por fim armazenados em freezer a -20° para posterior análise molecular.

## 5.4 Amostragem

As amostras são oriundas de um projeto temático sob o título “Desenvolvimento do estágio hepático *in vitro* a partir de isolados brasileiros de *Plasmodium vivax*”, do qual um dos seus objetivos é implementar uma colônia de *An. darlingi*. Neste sentido, as espécimes fêmeas de *An. darlingi* coletadas em São Gabriel da Cachoeira (3.002) foram em sua maioria utilizadas para a colonização desta espécie em laboratório. Os demais espécimes *An. darlingi* foram acondicionados em *pools* por espécie e armazenados a -20°C para a investigação molecular.

179 amostras foram distribuídas em pool, foram acondicionadas dez amostras – 2µl de cada – em cada pool, gerando um único pool de 20µl, no total foram confeccionados 19

pools. O restante que não sofreu processo molecular e permaneceu armazenado para pesquisas futuras.

Tabela 1: Dados de coleta das sub-amostras de *Anopheles darlingi* - SGC

Ano	Mês	dia	Quantidade de mosquitos	
			Armazenados	Avaliados
2021	setembro	14	280	
		15	290	44
		16	680	
	outubro	23	50	43
	novembro	30	50	48
	dezembro	02	50	44
	total		1.400	179

### 5.5 Extração de DNA

Para a extração de DNA, foi utilizando o protocolo Salting Out padronizado por Miller et al (1988). Extraiu-se os mosquitos individualmente, especificamente, a região do segmento abdominal sem pernas e asas. Os abdomens foram macerados individualmente com pistilo de plástico em 500µl em TEN (Tris, EDTA, NaCl), foi adicionado 5 µl de SDS 10 % e 3 µl de proteinase K para lise, incubado por 1 hora a 56 °C, adicionou-se 150 µl de NaCl 5M, centrifugou as amostras a 5.000 rpm por 10min a 20 °C, adicionou-se o isopropanol gelado e permaneceu em overnight por 48h.

A lavagem foi realizada com etanol 70 %, inicialmente a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C, descartou-se o sobrenadante e adicionou o etanol 70 %, repetiu-se esses passos quatro vezes, totalizando quatro lavagens e finalizou-se com a secagem do pellet e eluição em 20 µl de TE (Tris e EDTA). As amostras foram armazenadas em -20 °C até posterior análise molecular.

O gDNA foi quantificado utilizando o equipamento espectrofotômetro NanoDrop™ e realizou-se uma amplificação com o iniciador do gene constitutivo de *An. aquasalis* RP49

(Fwd 5'-AGG GAC AGT ACC TGA TGC CCA ACA T-3', Rev 5'-CGC ACG TTG TGG ACG AGG AAC TTC T-3') (Bahia et al, 2010). Para 28  $\mu$ l de reação foi utilizado o kit Platinum™ Taq DNA polimerase (Invitrogen™).

Tabela 2: Mix do PCR para detecção do gene constitutivo RP49

Componente	Concentração	Quantidade (1x)
H2O ultrapura	-	15 $\mu$ l
Buffer	10 x	5 $\mu$ l
MgCl	50 mM	3 $\mu$ l
dNTP	10 mM	2 $\mu$ l
Primer F/R	100 mM	0.4 $\mu$ l
Taq	-	0.2 $\mu$ l
DNA		2 $\mu$ l
Total		28 $\mu$ l

A ciclagem utilizada foi: 95 °C – 10 minutos – 1 ciclo; 95 °C – 15 segundos, 60 °C – 1 minuto – 40 ciclos. O amplicom gerado foi de 189 pb tamanho que foi visualizado em gel de agarose 1,5 %.

Antes de se fazer o *pool* de DNA, as amostras que apresentaram quantidades superiores a 80 ng de DNA, sofreram diluição para melhor padronização, os *pools* de DNA foram feitos, cada um, contendo 5 $\mu$ l de 10 amostras diferentes, totalizando 50  $\mu$ l de DNA. Uma amplificação final foi realizada para avaliar a padronização das amostras, demonstrando que somente o *pool* com as amostras diluídas e a amostra diluída sozinha amplificou em 189 pb.

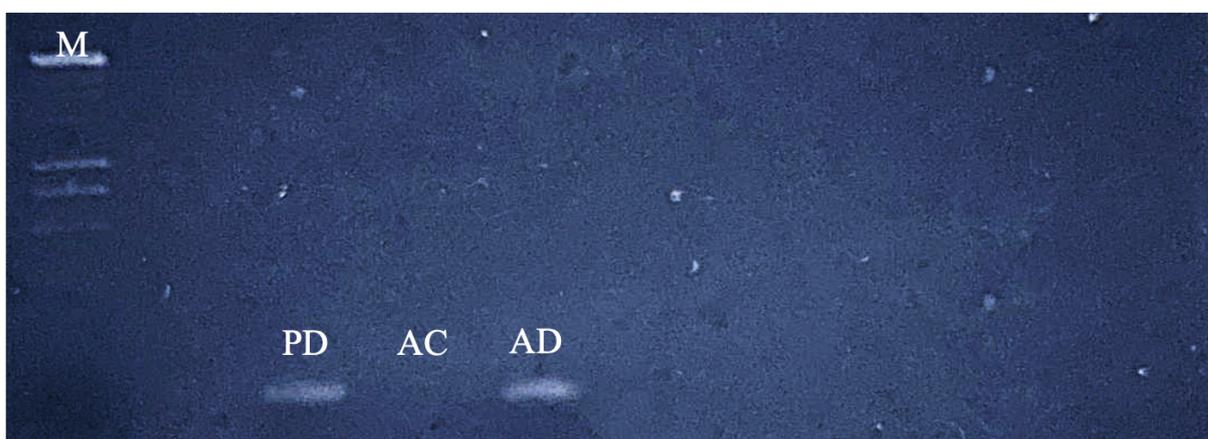


Figura 5: Amplificação do gene RP49. **M**: marcador molecular 200kb; **PD**: pool com amostras diluídas; **AC**: amostras concentradas; **AD**: amostras diluídas.

### 5.6 Detecção de *Plasmodium vivax* por meio da reação em cadeia de polimerase - PCR

179 amostras de DNA distribuídas por *pools* – 19 no total – foram submetidas aos ensaios do protocolo PCR para a detecção de *P. vivax*, utilizando uma reação já padronizada baseada em uma região conservada do gene 18S rRNA (ROSANASURGELL et al., 2010), iniciador F: 5' GCTTTGTAATTGGAATGATGGGAAT '3 R: 5' ATGCGCACAAAGTCGATACGAAG '3. Ciclagem: 95 °C – 3 minutos – 1 ciclo, 95 °C – 1 minuto; 57 °C – 30 segundos; 72 °C – 1 minuto – 32 ciclos, 72 °C - 5 minutos – 1 ciclo. O tamanho do fragmento esperado era de 215pb, sendo visualizado em gel de agarose 1%. Foi utilizado como controle positivo uma amostra positiva de *P. vivax* e como controle negativo, H<sub>2</sub>O ultrapura e DNA do mosquito *An. aquasalis* livre de infecção proveniente da colônia de *An. Aquasalis* mantida no Setor de Entomologia NFF da FMT-HVD.

Tabela 3: Mix da reação para detecção do gene 18S - *Plasmodium vivax*

Componente	Concentração	Quantidade (1x)
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	15 µl
Buffer	10 x	5 µl
MgCl dNTP	50 mM	3 µl
Primer F/R	10 mM	2 µl
Taq	50 mM	0.4 µl
	-	0.2 µl
DNA		2 µl
Total		28 µl

### 5.7 Detecção de *Wolbachia* por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR).

Todas as amostras extraídas passaram pelo processo de PCR para detecção de *Wolbachia* utilizando a enzima Platinum™ Taq DNA polimerase (Invitrogen™).

O primer utilizado se baseia na região da proteína de superfície WSP desenhado por ZHOU et al. (1998) – iniciadores: 81F (senso): TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC / 691R (anti senso): AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA.

O tamanho do amplificado desejado era entre 590 à 632 pb. Sob a ciclagem 94 °C – 3 minutos – 1 ciclo; 94 °C – 1 minuto; 57 °C – 1 minuto; 72 °C - 1 minuto – 38 ciclos e 72 °C – 10 minutos – 1 ciclo. Como controle positivo foi utilizado fêmeas do gênero *Culex quinquefasciatus* e como controles negativos os mesmos citados anteriormente.

Tabela 4: Mix da reação para detecção do gene *WSP - Wolbachia*

Componente	Concentração	Quantidade (1x)
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	15µl
Buffer	10 X	5µl
MgCl	50 mM	3µl
dNTP	10 mM	2µl
Primer F/R	20 mM	0.4µl
Taq	-	0.2µl
DNA		2µl
Total		28 µl

## 5.8 Análise de dados

A ocorrência da infecção por *Wolbachia* e *Plasmodium* foi determinada qualitativamente, tendo os seus resultados tabulados em planilha Excel. O cálculo utilizado para verificar a ocorrência foi o de taxa mínima de infecção (TMI) pois a organização de amostras foi em *pool*, sendo assim, não há uma taxa exata de infecção natural, apenas considera-se uma fêmea positiva em cada *pool* analisado (Paiva et al., 2006).

$$TMI = \frac{N^{\circ} \text{ de pools positivos} \times 100}{N^{\circ} \text{ total de fêmeas em pool}}$$

## 5.9. Aspectos éticos

Este estudo faz parte de um projeto maior sob título “Desenvolvimento do estágio hepático *in vitro* a partir de isolados brasileiros de *Plasmodium vivax*” aprovado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio sob o número: 68304-

2, para coleta de material zoológico, especificamente, culicídeos, na área de São Gabriel da Cachoeira.

### **5.10. Financiamento**

O projeto é financiado por recursos do ILMD-Fiocruz Amazônia (PROEP Labs) e pelo Programa Universal da FAPEAM.

## 6 RESULTADOS

As três coletas realizadas no município de São Gabriel da Cachoeira em 2021 resultaram em 3.002 espécimes de *An. darlingi*, nenhuma outra espécie de anofelino foi coletada na região, destes, 179 mosquitos foram distribuídos em 19 *pools* para detecção da taxa de infecção natural por *Plasmodium* e *Wolbachia* por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR).

### 6.1. Detecção de infecção natural por *Wolbachia*

Para detecção de *Wolbachia*, avaliou-se 19 *pools* – 10 exemplares por *pool* – e a falta de amplificação sugere negatividade natural de *Wolbachia* em *Anopheles darlingi* coletados em São Gabriel da Cachoeira – AM.

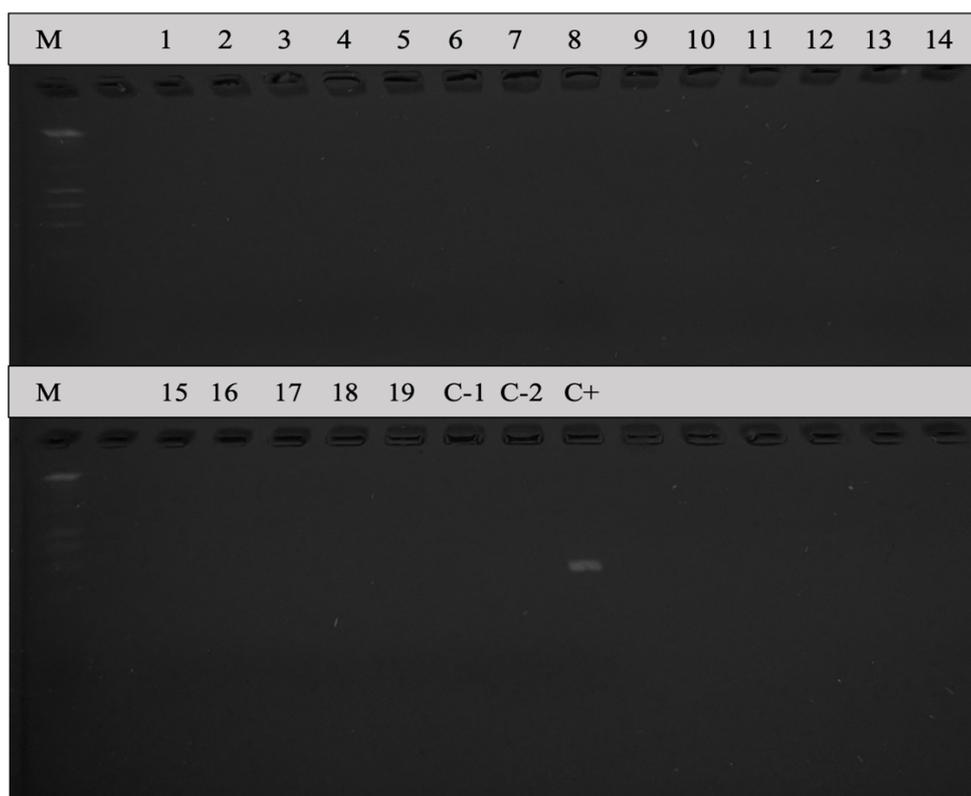


Figura 6: Gel de agarose da amplificação do gene WSP para detecção de *Wolbachia*. **M**: marcador 200pb; **1-19**: pools das amostras; **C-1**: controle negativo *An. aquasalis*; **C-2**: controle negativo H2O ultrapura; **C+**: controle positivo *Culex quinquefasciatus*.

## 6.2 Detecção de infecção natural por *Plasmodium vivax*

Todos os 19 *pools* foram identificados para *P. vivax* por PCR, apenas o controle positivo amplificou, demonstrando que todas as amostras estavam livres de infecção natural por *P. vivax*.

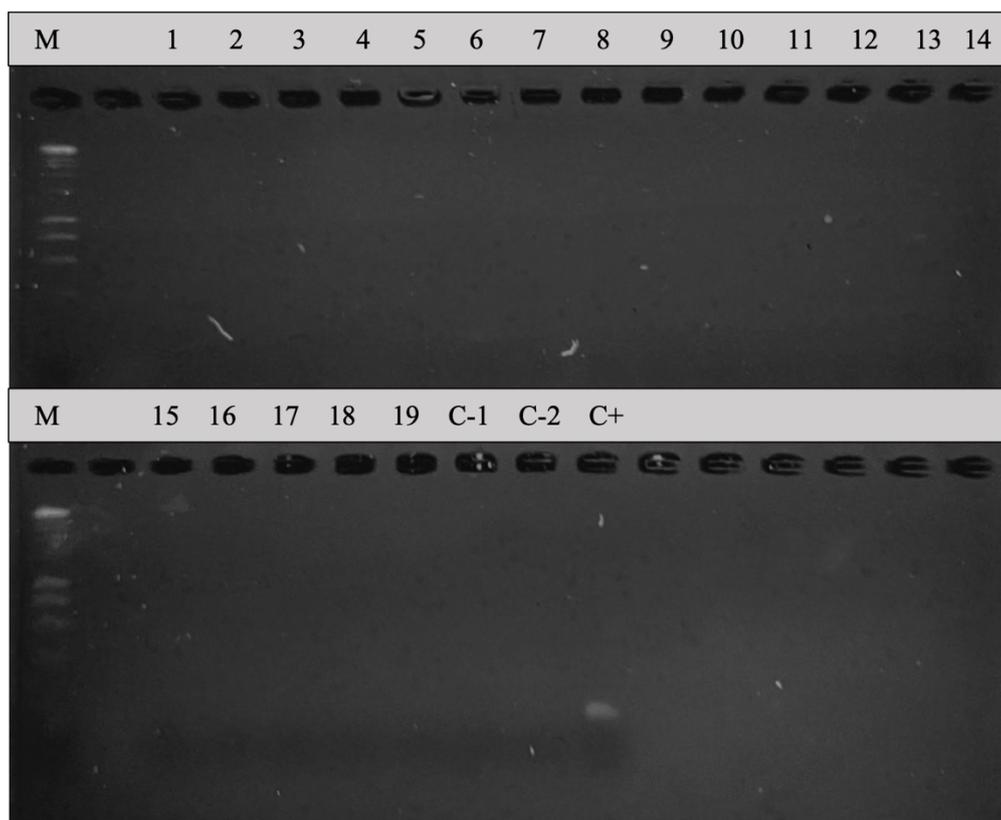


Figura 7: Gel de agarose da amplificação dos genes *18S* para detecção de *P. vivax*. **M**: marcador 200 pb; **1-19**: pools das amostras; **C-1**: controle negativo *An. aquasalis*; **C-2**: controle negativo H<sub>2</sub>O ultrapura; **C+**: amostra positiva infecção experimental de *P. vivax*.

Tabela 5: Porcentagem de amostras positivas para *Wolbachia* e *Plasmodium vivax*

<i>Ano</i>	<i>Mês</i>	<i>Espécie</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Positividade</i>	
				<i>Wolbachia</i>	<i>P. vivax</i>
2021	setembro	<i>An darlingi</i>	44	0%	0%
	outubro	<i>An darlingi</i>	43	0%	0%
	novembro	<i>An darlingi</i>	48	0%	0%
	dezembro	<i>An darling</i>	44	0%	0%

## 7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sugerem a falta de positividade de *Wolbachia* e *P. vivax* em uma pequena população coletada de *An. darlingi* em São Gabriel da Cachoeira, região de alta endemia no Estado do Amazonas.

A ideia do uso de bactérias para controle biológico é muito atraente perante a perspectiva de haver comprovação do sucesso através de fenótipos manipulatórios no hospedeiro, como observado no endossimbionte *Wolbachia* (Werren, 2008). Analisar a prevalência de *Wolbachia* é um assunto delicado na comunidade científica. Nos primórdios, estudos sinalizavam a impossibilidade de estabilidade desta bactéria em mosquitos Anofelinos (Ricci et al., 2002). Entretanto, estudos recentes desconstroem aos poucos este pensamento, revelando um potencial promissor (Bian et al., 2013; Baldini et al., 2014; Gomes et al., 2017; Jeffries et al., 2018).

Passos R, (2011) avaliou a distribuição de *Wolbachia* em mosquitos (Diptera: Culicidae), na região Amazônica, incluindo *An. darlingi*, que assim como nosso resultado, também não encontrou infecção natural, além do resultado, sua área de busca foi similar a nossa, o município de São Gabriel da Cachoeira, reforçando que mesmo que ocorra a presença da bactéria na região em outros tipos de insetos, como em *Simulium ovapockense floch* (díptera: simuliidae) (Ferreira CC, 2021), não significa que possa ter transmissão para *Anopheles spp.* Este fato também foi evidenciado por Sawadogo et al., (2022) que realizou coletas de *An. Gambiae* nas mesmas áreas de Burkina Faso e teve uma positividade de apenas 0,59% (29/4953), diferenciando da alta taxa de infecção vista por Shaw et al. (2016) de 46% (275/602) em *An. coluzzi*.

Embora anteriormente não tenha sido visto amplificação de *Wolbachia* em *An. darlingi*, Santos et al., (2023), por meio de metagenômica da microbiota, obtiveram prevalência de 79,3% em glândulas salivares e 70% no intestino médio de mosquitos colonizados. Entretanto, os autores reforçam a cautela na interpretação destes dados, levando em consideração a sugestão de Chrostek e Gerth (2019), sobre a necessidade de estudos independentes para avaliar se há real infecção natural, uma vez que, as sequencias de *Wolbachia* podem ser introduzidas de forma transitória por vias diferentes em mosquitos, como por exemplo através de ácaros, alimentação por néctar das plantas, mosquitos ectoparasitários e nematoides (Chrostek et al., 2017). Esta última foi observada por Ayala

et al (2018) que teve sua amostra de *An. coustani* contaminada por *Wolbachia* de *Dirofilaria immitis*.

É notório, os esforços para constatar a associação de *Wolbachia* com *Anopheles spp.*, considerando a sua infecção estável em algumas espécies de mosquitos do gênero *Culex* e *Aedes* (Carvajal et al., 2019) e seu prematuro sucesso no controle biológico através de efeitos fenótipos (Werren et al 2008; Moreira et al., 2009), essa possibilidade poderia trazer bons frutos para o controle da malária, todavia, apenas algumas cepas são capazes de induzir tal ação e assim como outros micróbios associados a microbiota intestinal, pode-se ter um efeito negativo no hospedeiro, afetando sua aptidão (Joshi et al., 2014) induzindo uma dificuldade na transmissão e estabilização da bactéria (Hughes et al., 2014).

Em contrapartida, o uso de endossimbionte não deve ser negligenciada, mesmo com a falta da infecção natural, ainda pode-se obter a supressão pela liberação de machos transportadores de cepas incompatíveis de *Wolbachia* por incompatibilidade citoplasmática unidirecional em uma população de fêmeas livres de *Wolbachia* (Walker et al., 2011). Deste modo, o método *Wolbachia* baseado na supressão populacional e bloqueio de patógenos, ainda pode ser utilizada em espécies de mosquitos não encontrados infectados naturalmente com *Wolbachia*.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados obtidos foi a técnica utilizada, os pools de mosquitos foram analisados, neste estudo, com PCR convencional. No entanto, uma grande parte das positivities foram vistas por PCR Nested (Ayala et al., 2019; Gomes et al., 2017; Shaw et al., 2016) que possui alta sensibilidade e a nível de comparação, Gomes et al (2017) verificou que o PCR em tempo real pode positivar mais que o dobro das mesmas amostras (67%) em relação ao Nested (52%) e ao PCR convencional (16%), isto sinaliza que o ensaio de amplificação precisa de maior sensibilidade para detecção de *Wolbachia*.

Todos os estudos sobre coinfeções são realizados em áreas com *P. falciparum*, a espécie circulante da região Africana. Notavelmente, há uma ausência de estudos para *P. vivax* relacionada com *Wolbachia*, o que aguçou a nossa curiosidade em analisar mosquitos de zonas endêmicas para esta espécie de *Plasmodium*.

*P. vivax* é a espécie circulante no Amazonas (SIVEP, 2022), apesar de ser uma forma menos agressiva que *P. falciparum* (Anstney et al., 2012), esta espécie pode gerar prejuízos

sociais e biológicos (Price et al., 2007), além de ser um reservatório oculto que contribui para a falha de erradicação da malária (Agrisano et al., 2022).

A falta de detecção de anofelinos infectados com *P. vivax* observado neste estudo, pode ser o reflexo dos significativos avanços do controle da malária no Brasil (BRASIL, 2022). O município de São Gabriel da Cachoeira lidera os números de casos no Amazonas, entretanto, em uma retrospectiva a partir de 2021, podemos observar uma decrescente taxa de infecções por *P. vivax* (SIVEP, 2023).

Usualmente, a literatura preconiza que a taxa de infecção por *P. vivax* em *An. darlingi* são entre 1-2% (Moreno et al., 2025), porém, nossas coletas foram em uma área de alta transmissão, o que poderia sugerir alguma positividade. Em São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, foi relatado a prevalência de infecção, de cerca de 2,9% (Sallum et al., 2019) em consideração a isto, o nosso resultado nulo para *P. vivax* não é tão distante do esperado. Tadei et al (1988) também observaram uma baixa prevalência (0,5%) e ainda quando há este histórico de baixas prevalências, não se anula que *An. darlingi* possua boa capacidade vetorial contra *P. vivax*, dado que, uma única pessoa infectada por *P. vivax* pode ser responsável por 60 casos secundários de malária em uma população de mosquitos (Sallum et al 2019).

Assim como foi levado em consideração a técnica empregada na detecção de *Wolbachia*, este é um ponto que foi levantado para *P. vivax* também, os vieses secundários da técnica de PCR convencional, como por exemplo leitura visual por coloração ao invés de fluorescência, vista em PCR de tempo real, podem ter interferido na detecção (BATISTA-DOS-SANTOS et al, 2012). Um segundo ponto a ser considerado é que apesar do parasita se manter em baixa densidade na população de mosquitos (Tadei., 1998), não podemos descartar, que o baixo número de amostras, pode ter refletido no resultado encontrado.

Por fim, de forma geral, foi observado durante a identificação das espécies a predominância de *An. darlingi*, fato muito bem documentado por outros autores (Tadei et al., 1988; Sinka, 2012).

## 8 CONCLUSÃO

A trilha para definir *Wolbachia* como agente de bloqueio de doenças vetoriais é longa e de incertezas, pois há dúvidas ao redor da sua estabilidade em tecidos dos Anofelinos. O sucesso visualizado em arboviroses e pragas, mantem a motivação de estabelecer essa relação benéfica para a população de áreas endêmicas de malária, aguçando os pesquisadores a procurarem meios de confirmação da infecção natural. Nossa contribuição para este tema aponta falta de infecção natural de *Wolbachia* e *Plasmodium vivax* em uma pequena população de mosquitos *An. darlingi* coletados no município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, área hiperendêmica para malária.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F. E. O. **As alterações climáticas em Manaus no século XX.** Dissertação (Mestrado) Ciências, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 1995.
- ANGRISANO F, Robinson LJ. ***Plasmodium vivax* – How hidden reservoirs hinder global malaria elimination.** *Parasitol Int.* 2022.
- ANSTEY NM, et al. ***Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis.** *Adv Parasitol*, 2012.
- ALIOTA M.T, et al. **The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*.** *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016.
- ALONSO, Diego Peres et al. **Susceptibility of Field-Collected *Nyssorhynchus darlingi* to *Plasmodium* spp. in Western Amazonian Brazil.”** *Genes* vol. 2021.
- ARAÚJO H. R. C., et al. ***Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics.** *Insects*, 2015.
- AUGUSTINOS A.A., et al. **Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: Is the hidden diversity fully unraveled?** *Plos one.*, 2011.
- ATELLA GC, et al. **The major insect lipoprotein is a lipid source to mosquito stages of malaria parasite.** *Acta Trop.* 2009.
- AYALA D et al. **Natural *Wolbachia* infections are common in the major malaria vectors in Central Africa.** *bioRxiv*, 2018.
- BAHIA AC, et al. ***Anopheles aquasalis* infected by *Plasmodium vivax* displays unique gene expression profiles when compared to other malaria vectors and plasmodia.** *Plos One* 2010.
- BALDINI, F., Rougé, J., Kreppel, K. *et al.* **First report of natural *Wolbachia* infection in the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in Tanzania.** *Parasites Vectors* 11, 635, 2018.
- BATISTA-DOS-SANTOS et al, **Real-time PCR diagnosis of *Plasmodium vivax* among blood donors.** *Malar J.* 2012.
- BARBOSA LMC, Souto RNP, Dos Anjos Ferreira RM, Scarpassa VM. **Behavioral patterns, parity rate and natural infection analysis in anopheline species involved in the transmission of malaria in the northeastern Brazilian Amazon region.** *Acta Trop.* 2016.

BENNINK S, et al. **The development of malaria parasites in the mosquito midgut.** *Cell Microbiol.* 2016.

BIAN G, et al. ***Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection.** *Science.* 340:748–751, 2013.

BORDENSTEIN, Seth R. e colab. **Parasitism and Mutualism in *Wolbachia*: What the Phylogenomic Trees Can and Cannot Say.** *Molecular Biology and Evolution*, v. 26, n. 1, p. 231–241, 1 Jan 2009.

BRASIL P et al. **Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation.** *The Lancet Global Health.* v. 5, p. e1038-1046, 2017.

BRASIL. **Guia para o Planejamento das Ações de Captura de Anofelinos pela Técnica de Atração por Humano Protegido (TAHP) e Acompanhamento dos Riscos à Saúde do Profissional Capturador.** Brasília: *Ministério da Saúde*, 2019.

BRASIL. **Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no brasil.** Boletim epidemiológico vol 53. *Ministério da Saúde*, 2022.

CARVAJAL T.M et al. **Detection of *Wolbachia* in *Aedes aegypti* mosquitoes collected in the field in the metropolitan region of Manila, Philippines.** *Parasites and Vectors*, 12, 361, 2019.

CASTRO DP, et al. ***Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*.** *Parasitologia Experimental.* 2007;

CHANDLER JA, Liu RM, Bennett SN. **RNA shotgun metagenomic sequencing of northern California (USA) mosquitoes uncovers viruses, bacteria and fungi.** *Front. Microbiol.* 2015.

CIRIMOTICH CM, Dong Y, Clayton AM, et al. **Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*.** *Science*, 2011;

CONSOLI RAGB, Lourenço-de-Oliveira R: **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** *Fiocruz*, Rio de Janeiro, p 228, 1994.

CASIRAGHI M., et al. **Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: Clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree.** *Microbiology*, 2005.

CHROSTEL, E. Gerth M. **Is *Anopheles gambiae* a natural host of *Wolbachia*.** *mBio.* 2019.

CHRISTOPHIDES GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. **Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae***. *Science* 2002.

DEANE L. **Malaria vectors in Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986.

DOBSON SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W. **Mutualistic *Wolbachia* infecção em *Aedes albopictus*: Accelerating cytoplasmic drive**. *Genetic*. 2002.

DOBSON SL. **When more is less: mosquito population suppression using sterile, incompatible and genetically modified male mosquitoes**. *J. Med. Entomol*; 58 :19801986, 2021.

DONG Y, Manfredini F, Dimopoulos G. **Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense Against malária parasites**. *PLoS Pathog*; 5 (5):e1000423. 2009.

DONDORP et al. **Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment**. *Nature reviews. Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 272–280, 2010.25

DUTRA Dutra H.L.C., et al. ***Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes**. *Cell Host Microbe*. 2016.

ELEFTHERIANOS I, Atri J, Accetta J, Castillo JC. **Endosymbiotic bactéria in insects: guardians of the immune system?** *Fisiol front*. 2013.

FENN, Katelyn e BLAXTER, Mark. ***Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism**. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 2, p. 60–65, 2006.

FERREIRA, Caroline Coelho. **Caracterização molecular de *Wolbachia* sp. e sua prevalência em *Simulium ovapockense* Floch & Abonnenc, 1946 (Diptera: Simuliidae), vetor de Mansonelose em São Gabriel da Cachoeira**. 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, 2021.

FRYDMAN HM, et al. **Somatic stem cell tropismo in *Wolbachia***. *Nature*. 441 :509-12, 2006.

FORATIINI, O. P. **Culicidologia Médica**. Vol. 2. *Edusp*. 860 p. 2002.

K, Heu e M, Gendrin. **Mosquito microbiota and its influence on disease vectorial transmission**. *Biologie aujourd'hui*, v. 212, n. 3–4, p. 119–136, 2018.

GAO H, et al. **A natural symbiotic bacterium drives mosquito refractoriness to *Plasmodium* infection via secretion of an antimalarial lipase**. *Nat Microbiol*. 2021

GOMES FM, Hixson BL, Tyner MDW, et al. **Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission.** *Proc Natl Acad Sci*, 2017.

GLOWSKA E., et al. **New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari:Syringophilidae)** *Infect. Genet. Evol.* 30:140–146. 2015.

HERTING M. WOLBACH SB. ***Wolbachia* SB Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects.** *J. Med. Res.* 1924.

HILLYER, JF, Barreau, C., e Vernick, KD. **Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel.** *Int. J. Parasitol.* 2007.

HILGENBOECKER, K.; et al. **How many species are infected with *Wolbachia*?** *Microbiol Lett.* 281:215-220. 2008.

HOFFMANN A.A., et al. **Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission.** *Nature*; 476:454–457, 2011.

HOFFMANN JA, Reichhart J-M. ***Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective.** *Nature Immunology* 2002.

HUGHES GL, Koga R, Xue P, Fukatsu T, Rasgon JL. ***Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*.** *PLoS Pathog*; 7(5):e1002043. 2011.

HUGHES GL, Vega-Rodriguez J, Xue P, Rasgon JL. ***Wolbachia* strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae* mosquitoes.** *Appl Environ Microbiol*; 78(5):1491-1495. 2012.

INÁCIO DA SILVA., et al. **Systematic review of *wolbachia* symbiont detection in mosquitoes: An entangled topic about methodological power and true symbiosis.** *Pathogens*, 2021.

IBGE. **São Gabriel da cachoeira.** Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/sao-gabriel-da-cachoeira/panorama>> Acesso em: 19 abril. 2022.

INMET. **Normais climatológicas.** Disponível em: <<https://clima.inmet.gov.br/NormaisClimatologicas>> .Acesso em: 19 abril 2022.

JEFFRIES C.L., et al. **Diverse novel resident *Wolbachia* strains in Culicine mosquitoes from Madagascar.** *Sci. Rep.* 2018

JEFFRIES, Claire L. et al. **Novel *Wolbachia* strains in *Anopheles* malaria vectors from Sub-Saharan Africa.** *bioRxiv*, 2018

JEFFRIES CL, Cansado-Utrilla C, Beavogui AH, et al. **Evidence for natural hybridization and novel *Wolbachia* strain superinfections in the *Anopheles gambiae* complex from Guinea.** *R Soc Open Sci.*;8(4):202032. 2021.

JOHNSON KN. **The Impact of *Wolbachia* on Virus Infection in Mosquitoes.** *Viruses*, 2015.

JOSHI, D. et al. ***Wolbachia* strain wAlbB confers both fitness costs and benefit on *Anopheles stephensi*.** *Parasites & Vectors*, 7, 1–9, 2014.

KITT A Y APONG P , et al. **Combined sterile insect technique and incompatible insect technique: the first proof-of-concept to suppress *Aedes aegypti* vector populations in semi-rural settings in Thailand.** *PLoS Negl Trop.* 2019.

KIYUKA PK et al. **Complement in malaria: immune evasion strategies and role in protective immunity.** *FEBS Lett.* 2020.

KUMAR H, TOLIA NH. **The structural biology of malaria invasion.** *PLoS Pathog*, 2019.

KRIESNERK, P, et al. **Rapid Sequential Spread of Two *Wolbachia* Variants in *Drosophila simulans*.** *PLoS Pathog.* 2013.

LEFOULON E, et al. **Greenhead (*Tabanus nigrovittatus*) *Wolbachia* and Its Microbiome: A Preliminary Study.** *Microbiol Spectr.* Oct 31;9(2): e0051721, 2021.

LEGGEWIE M, et al. ***Culex torrentium* mosquitoes from Germany are negative for *Wolbachia*.** *Med. Vet. Entomol.* 2018

LEVASHINAL EA. **Immune responses in *Anopheles gambiae*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004.

MCGARRY, HF; Egerton, GL; Taylor, MJ. **Population dynamics of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2004.

MALLET J. **Annual Project Summary Report for Riceland Mosquito management program.** *USDA-CSRS internal document*, 1989

- MAINS J.W, et al. **Localized Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Miami, FL, via Inundative Releases of *Wolbachia*-Infected Male Mosquitoes.** *J. Med. Entomol.* 2019.
- MARTIN TCS, Vinetz JM. **Asymptomatic *Plasmodium vivax* parasitaemia in the low-transmission setting: the role for a population-based transmission-blocking vaccine for malaria elimination.** *Malar J*; **17**:89. 2018.
- MEIBALAN E, Marti M. **Biology of Malaria Transmission.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 7 (3): a025452, 2017.
- MICHEL K, Kafatos FC. **Mosquito immunity against *Plasmodium*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2005.
- MILNER DA Jr. **Malaria Pathogenesis.** Cold Spring Harb Perspect Med. 2018.
- MILLER et al, **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells,** *Nucleic Acids Research*, Volume 16, Issue 3, 1988.
- MORAIS CS, Seabra SH, Castro DP, et al. ***Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: Ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects.** *Parasitologia Experimental.* 2008;
- MOREIRA, L. A. et al. **A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*.** *Cell*, 1268–1278, 2009.
- MORENO M, et al. **Implications for changes in *Anopheles darlingi* biting behaviour in three communities in the peri-Iquitos region of Amazonian Peru.** *Malar J.* 2015.
- MCMENIMAN, C. J. et al. **Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*.** *Science*, 141–144, 2009.
- NIANG, El Hadji Amadou, et al. **First report of natural *Wolbachia* infection in wild *Anopheles funestus* population in Senegal.** *Malaria Journal*, v. 17, n. 1, 2018.
- NILSSON K., et al. **Life cycle of *Plasmodium falciparum*.** *PLOS Pathogens.* 2015.
- PAIVA BR, et al. **Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR.** *Acta Trop* 99: 252-259, 2006.
- PASSOS R., et al., **Distribuição e diversidade de *Wolbachia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae) em mosquitos (Diptera, Culicidae) no Estado do Amazonas e o efeito do tratamento com tetraciclina em populações de *Aedes albopictus* Skuse, 1894 mantidas**

em laboratório. Tese de doutorado, 2011. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/12318>

PRICE RN, et al. **Malária Vivax: neglected and not benign.** *Am J Trop Med Hyg*, 2007

RAINEY, S.M.; Shah, P.; Kohl, A.; Dietrich, I. **Understanding the *Wolbachia* Mediated inhibition of arboviruses in mosquitoes: Progress and challenges.** *J. Gen. Virol.* 95, 517–530, 2014.

RITCHIE S.A., et al. **Mission Accomplished? We Need a Guide to the “Post Release” World of *Wolbachia* for Aedes -borne Disease Control.** *Trends Parasitol.* 34:217–226, 2018.

RITCHIE SA. ***Wolbachia* and the near cessation of dengue outbreaks in Northern Australia despite continued dengue importations via travellers.** *J. Travel Med* 25: tay084, 2018.

RICCI I, Cancrini G, Gabrielli S, D'amelio S, Favia G. **Searching for *Wolbachia* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) in Mosquitos (Diptera: Culicidae): Large Polymerase chain reaction survey and new identifications.** *J Med Entomol*, 2022.

RODRIGUES J, Brayner FA, Alves LC, Dixit R, Barillas-Mury C. **Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes.** *Science*. 2010.

ROSENBERG E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. **The role of microorganism in coral health, disease and evolution.** *Nat Rev Microbiol.* 2007

ROCHA M.N., et al. **Pluripotency of *Wolbachia* against Arboviruses: The case of yellow fever.** *Gates Open Res.* 3:161, 2019.

ROTHWELL C, et al. **Cholesterol biosynthesis modulation regulates dengue viral replication.** *Virology.* 2009

ROSANAS-RUGEL A, et al. **Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea.** *Malar J.*9:361. 2010

SALLUM MAM, et al. **Vector competence, vectorial capacity of *Nyssorhynchus darlingi* and the basic reproduction number of *Plasmodium vivax* in agricultural settlements in the Amazonian Region of Brazil.** *Malar J.* 2019.

SANTOS NACD, et al. **Bacterial Microbiota from Lab-Reared and Field-Captured *Anopheles darlingi* Midgut and Salivary Gland.** *Microorganisms.* 2023

SAWADOGO SP, et al. **Lack of robust evidence for a *Wolbachia* infection in *Anopheles gambiae* from Burkina Faso.** *Med Vet Entomol.* 2022

SHAW, W., et al. ***Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development.** *Nat Commun.* 11772, 2016.

SMITH RC, Vega-Rodríguez J, Jacobs-Lorena M. **The *Plasmodium* bottleneck: malária parasite losses in the mosquito vector.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*109(5):644661, 2014.

SILVA, D. A. **A influência das áreas verdes no clima da cidade de Manaus.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 2009.

SIVEP. **Situação epidemiológica da malária na região amazônica e extra- amazônica, 2007 a fevereiro de 2022. Dados do Sivep Malária atualizados em 29/03/2022.** Acesso em 20 de agosto 2023 <  
<https://public.tableau.com/app/profile/mal.ria.brasil/viz/BoletimMalrianasregiesamaznicaeextra-amaznica/Inicio>>

SINKA ME, et al. **A global map of dominant malaria vectors.** *Parasit Vectors*, 2012

STEYN A., Roets F., Botha A. **Yeasts associated with *Culex pipiens* and *Culex theileri* mosquito larvae and the effect of selected yeast strains on the ontogeny of *Culex pipiens*.** *Microb. Eco* 2016

SHOPSHIRE JD, Kalra M, and Bordenstein SR. **Evolution-guided mutagenesis of the cytoplasmic incompatibility proteins: Identifying CifA's complex functional repertoire and new essential regions in CifB.** *PLoS Pathog* 16, 2020.

SHOPSHIRE JD, Bordenstein SR. **Two-by-one model of cytoplasmic incompatibility: synthetic recapitulation by transgenic expression of cif A and cif B in *Drosophila*.** *PLoS Genetics.* 2019.

SOUZA RS, Virginio F., Riback TIS, Suesdek L., Barufi JB, Genta FA **Microorganism-based larval diets affect mosquito development, size and nutritional reserves in the Yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)** *Front. Fisiol.* 2019.

TADEI, WP, DUTARY, et al. **Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2000.

TADEI, W.; et al. **Adaptive processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region.** *Hydrobiologia*, 2017.

TADEI et al. **Biology of Amazonian anophelines: XII species of *Anopheles*, transmission dynamics and control of malaria in the urban area of Ariquemes (Rondonia, Brazil)**, *Med trop*, 1988.

TADEI, W. et al. **Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 59, p. 325–35, 1998.

TORRES, Ryan., et al. ***Wolbachia* in mosquitoes from the Central Valley of California, USA**. *Parasites and Vectors*, v. 13, n. 1, 2020.

VALZANIA L., et al. **Both living bacteria and eukaryotes in the mosquito gut promote growth of larvae**. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018.

VAUGHAN, J.A. et al. **Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared Anopheles mosquitoes**. *Am J Trop Med Hyg.* 1994

VINOGRADOVA E.B., et al. **Endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipiens* in synanthropic populations of the mosquito *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae)** *Dokl. Biol. Sci.* 389:172–175, 2003.

VOGEL G. **WHO Gives First Malaria Vaccine the Green Light**. *Science* 374, 245– 246. 2021.

STRAUB TJ., et al. **The *Anopheles coluzzii* microbiome and its interaction with the intracellular parasite *Wolbachia***. *Sci Rep.*10(1):13847, 2020.

TURELLI M., Hoffmann A.A. **Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila Simulans*: Dynamics and Parameter Estimates from Natural Populations**. *Genetics.* 1995.

VERONESI, R. **tratado de infectologia**. editor científico Roberto Focaccia, 5. ed. rev. e atual. São Paulo: Editora *Atheneu*, 2015.

Ye Y.H., et al. ***Wolbachia* Reduces the Transmission Potential of Dengue-Infected *Aedes aegypti***. *PLoS Negl. Trop. Dis.*9: e0003894. 2015.

YEN J.H., Barr A.R. **New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L.** *Nature.* 232:657–658, 1971

YEN PS, Failloux AB. **A Review: *Wolbachia*-Based Population Replacement for Mosquito Control Shares Common Points with Genetically Modified Control Approaches**. *Pathogens.* 2020;9(5):404, 2020.

ZHOU W. et al. **Phylogeny and PCR based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences**. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 265: 509-515, 1998.

WALKER T, et al. **Stable high-density and maternally inherited *Wolbachia* infections in *Anopheles moucheti* and *Anopheles demeilloni* mosquitoes.** *Curr Biol*; 2021.

WANG S, et al. **Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria.** *Science*; 357 (6358): 1399-1402. 2017.

WEISS B, Aksoy S. **Microbiome influences on insect host vector competence.** *Trends Parasitol*. 2011.

WERREN J e L, Baldo e ME, Clark. ***Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology.** *Nature reviews. Microbiology*, v. 6, n. 10, p. 741–751, 2008.

WHITTEN MMA, Shiao SH, Levashina EA. **Mosquito midguts and malaria: Cell biology, compartmentalization and immunology.** *Parasite Immunol*. 2006.

WILKE A.B, MARRELI M.T. **Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control.** *Parasites & vectors*, v. 8, n. 1, 24 Jun 2015.

WONG ML., et al. **Natural *Wolbachia* infection in field-collected *Anopheles* and other mosquito species from Malaysia.** *Parasit Vectors*. 13(1):414, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Guidelines for malaria**, 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Malaria report 2022**, 2002.

WORLD MOSQUITO PROGRAM. **Applying *Wolbachia* to Eliminate Dengue – A randomised controlled trial**, 2011.

WORLD MOSQUITO PROGRAM. **The *Wolbachia* method**, 2021.

## ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 68304-2	Data da Emissão: 16/07/2020 12:32:56	Data da Revalidação*: 01/03/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: Grafe Oliveira Pontes	CPF: 860.082.183-53
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS	CNPJ: 04.534.053/0001-43

## Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Este documento NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
3	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
4	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
5	Esta licença permanente NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
8	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
11	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
12	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

## Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	Família	Animalia > Arthropoda > Insecta > Diptera > Culicidae
2	Família	Animalia > Arthropoda > Insecta > Hemiptera > Reduviidae
3	Família	Animalia > Arthropoda > Insecta > Diptera > Psychodidae

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0683040220200716

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 68304-2	Data da Emissão: 16/07/2020 12:32:56	Data da Revalidação*: 01/03/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Grafe Oliveira Pontes	CPF: 860.082.183-53
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS	CNPJ: 04.534.053/0001-43

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS	Laboratório

*Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).*

**Código de autenticação: 0683040220200716**

**Página 2/3**

