

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

CAROLINE COELHO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Wolbachia* sp. E SUA PREVALÊNCIA EM
Simulium oyapockense Floch & Abonnenc, 1946 (Diptera: Simuliidae), VETOR
DE MANSONELOSE EM SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA**

CAROLINE COELHO FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Wolbachia* sp. E SUA PREVALÊNCIA EM *Simulium oyapockense* Floch & Abonnenc, 1946 (Diptera: Simuliidae), VETOR DE MANSONELOSE EM SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Leônidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ-AM, para obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação patógeno hospedeiro área de concentração bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

Orientador: Prof. Dr. James Lee Crainey

Co-orientadora: Dra. Jeane Marcelle Cavalcante do Nascimento

Manaus – AM

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

F383a

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. / Caroline Coelho Ferreira. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2021.

67 f.

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

Orientador: Prof. Dr. James Lee Crainey.

Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Jeane Marcelle Cavalcante do Nascimento.

1. Mansonelose 2. Filogenia 3. *Wolbachia sp.* I. Título

CDU 616.995.132(811.3)(043.3)

CDD 614.5552098113

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – Bibliotecário CRB-11 287

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINE COELHO FERREIRA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Wolbachia* sp. E SUA PREVALÊNCIA EM *Simulium oyapockense* Floch & Abonnenc, 1946 (Diptera: Simuliidae), VETOR DE MANSONELOSE EM SÃO GABRIEL DA CACHOEIRA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro (PPGBIO – INTERAÇÃO), como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração Bioquímica, Biologia Celular e Molecular de Patógenos e seus vetores.

Aprovada em: 29 /09/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. James Lee Crainey

Fiocruz - ILMD

Prof. Dr. Antonio Marques Pereira Junior

Fiocruz RO

Prof. Dr. Jose Joaquín Carvajal

Fiocruz - ILMD

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador, James Lee Crainey por tudo o que me ensinou nesta jornada, pela paciência e pela compreensão das divergências que não pude controlar tanto na vida acadêmica quanto pessoal. Agradeço o esforço de me ofertar uma educação de qualidade e por me inserir em um grupo de pesquisa que tanto me cativou e que levarei os ensinamentos para toda a vida.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por disponibilizar acesso as suas dependências para a realização das etapas moleculares.

A Neusa Hamada, pesquisadora no INPA que com muita complacência dispôs do seu laboratório para minhas análises finais.

A Jeane Marcelle Nascimento que, com seu dom para o ensino e sua paixão pela entomologia me coorientou nas etapas finais deste projeto. Agradeço por todo o conhecimento que foi compartilhado, pela atenção ao sanar minhas dúvidas e pela gentileza com que fui tratada.

A minha avó Ana que me deu amor e liberdade, obrigada por ter me criado com bondade e carinho, foi essencial para o meu crescimento até este momento.

Ao Ricardo, meu amigo e esposo que está comigo nos bons e maus momentos. Agradeço por se fazer presente em mais essa caminhada, por me incentivar nos estudos e a acreditar na pesquisa científica. Agradeço por me apoiar todos esses anos e ainda se mostrar resiliente diante das adversidades. Todas as minhas conquistas são nossas conquistas.

As minhas amigas de curso Agatha, Fernanda e Talita que estão comigo nessa jornada da pós-graduação e compartilham das dificuldades e das alegrias. Obrigada

pelos momentos de confidências, pela ajuda em momentos de crise e pelo conhecimento multidisciplinar de nossas conversas.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro em modelo de bolsa de estudos que permitiu suprir minhas necessidades em meio a uma situação tão delicada quanto a pandemia Covid-19.

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

Enquanto eu tiver perguntas e não houver respostas continuarei a escrever.

Clarice Lispector (A hora da estrela, 1977)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo de transmissão de *Mansonella ozzardi*
- Figura 2 – Confeção da gota espessa em lâmina
- Figura 3 – *Mansonella ozzardi* (a), *Mansonella perstans* (b) e *Mansonella streptocerca* (c)
- Figura 4. Célula de *Aedes albopictus* infectada com *Wolbachia*
- Figura 5 – Árvore filogenética dos supergrupos de *Wolbachia* (A-F, H, L, S)
- Figura 6 – Árvore filogenética dos supergrupos de *Wolbachia* (A-F, J-L, S)
- Figura 7 – Diagrama esquemático da filogenia de *Wolbachia pipientis*
- Figura 8 – Microfilárias em cabeça de Culicídeos
- Figura 9 – Exemplar de *Culicídeos*
- Figura 10 – Exemplar de simulídeo
- Figura 11 – Mapa indicando o município de São Gabriel da Cachoeira
- Figura 12 - Coleta de insetos utilizando óleo mineral sobre a pele humana
- Figura 13 – Simulídeos em placa de petri para dissecação
- Figura 14 – Etapa técnica de extração de DNA
- Figura 15 – Árvore filogenética construída com gene *ftsZ*
- Figura 16 – Árvore filogenética construída com 5 genes concatenados
- Figura 17 – Gel de agarose com screening de 17 alvos moleculares
- Figura 18- Árvore filogenética construída com gene *dnaA*
- Figura 19 – Árvore filogenética construída com gene *fabK*
- Figura 20 - Árvore filogenética construída com gene *wd0183*
- Figura 21 - Árvore filogenética construída com gene *coxA*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programação da reação de sequenciamento adotada nesse experimento para a amplificação do CO1

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

Tabela 3 – Ciclagem para identificação de *Wolbachia* com técnica *MLST*

Tabela 4 – Amostras de *Simullium oyapockense* positivas para alvos os alvos analisados nesse trabalho

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEC - Dietilcarbamazina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DOX – Doxiciclina

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

IVM - Ivermectina

IC - Incompatibilidade citoplasmática

ILMD - Instituto Leônidas e Maria Deane

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

MLST – *Multi locus sequencing type*

OMS/WHO - Organização Mundial de Saúde

pb - Pares de Base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

rDNA – Dna ribossomal

RESUMO

No Brasil, a Mansonelose é uma doença filarial crônica que atinge milhares de pessoas residentes de zonas rurais na Amazônia. Até recentemente, não havia nenhum tratamento clínico prático ou opções de controle para esta doença. No entanto, novas terapias curativas com custo-benefício viável voltadas para o uso de *Wolbachia* sp. no tratamento para a Mansonelose estão atualmente sendo estudadas em países da África. Essas novas opções de tratamento têm o potencial de mudar radicalmente a viabilidade para o controle efetivo da Mansonelose, portanto, existe uma necessidade urgente para compreender a epidemiologia dessa doença na Amazônia. No norte do estado do Amazonas, *Simulium oyapockense* é um inseto hematófago conhecido por ser vetor de *Mansonella ozzardi* (o mais importante agente causador de Mansonelose na região) e *Onchocerca volvulus* (o único agente causador da oncocercose). Após o isolamento acidental de uma nova cepa de *Wolbachia* sp. a partir de um *pool* de extratos de DNA de *S. oyapockense* infectados com *M. ozzardi*, este estudo usou um novo método de triagem de Tipagem de Sequência de Múltiplos Locus (*MLST*) utilizando baixa temperatura de anelamento (LAT) para classificar esta nova cepa de *Wolbachia* sp. e desenvolver um novo método para diagnosticá-la com menor custo e tempo. Após o teste de 17 ensaios LAT PCR em uma amostra de DNA-estoque de *S. oyapockense* (composto de amostras de DNA de 96 espécimes), cinco desses ensaios (projetados para amplificar as sequências dos genes *coxA*, *dnaAa*, *ftsZ*, *fabK* e *wD 0183*) foram selecionados para o diagnóstico de *Wolbachia* sp. utilizando a abordagem *MLST*. Dos 96 extratos de *S. oyapockense* testados com esta metodologia, 90 foram positivos para os cinco genes-alvo, dois foram positivos em 1-4 e quatro foram negativos para todos os 5 PCRs LAT *MLST*, mas positivos para o CO1 (usado separadamente para controle de amplificação). A análise das sequências gênicas referentes a *coxA*, *dnaAa*, *ftsZ*, *fabK* e *wd 0183* obtidos a partir de cinco extratos de DNA de *S. oyapockense* não forneceu evidências de variação gênica entre as sequências dos cinco espécimes testados, independentemente dos alvos usados para o ensaio. A classificação filogenética baseada na abordagem *MLST*, bem como a análise filogenética realizada usando individualmente cada um dos genes classificou consistentemente a *Wolbachia* sp. identificada como pertencentes ao “Super grupo B”. Os resultados coletados para este estudo sugerem fortemente que mais de 90% dos espécimes de *S. oyapockense* coletados em atividades de hematofagia em São Gabriel da Cachoeira estão infectados com uma única cepa de *Wolbachia* do Super grupo B, denominada como “wSoya”. Futuros estudos serão necessários para determinar se a presença desta bactéria nesse vetor influencia a dinâmica de transmissão da mansonelose ou oncocercose na região.

Palavras-chave: *Mansonella* spp., *Wolbachia* sp., Prevalência, Filogenia.

ABSTRACT

Mansonellosis is a chronic filarial disease that affects many thousands of residents living in the rural regions of the Brazilian Amazon. Until recently there have been no practical clinical treatments or control options for this disease. Novel cost-effective curative Wolbachia-targeting therapeutics with the potential to treat mansonellosis are, however, presently in clinical trials in Africa. These novel treatment options have the potential to radically change the feasibility of effective mansonellosis control and thus there is a fresh and urgent need to improve our understanding of mansonellosis epidemiology in the Amazon region. In the North of the Amazonas state region, *S. oyapockense* is a hematophage insect known to be a vector of both *M. ozzardi* (the most important causative agent of mansonellosis in the region) and *O. volvulus* (the only causative agent of onchocerciasis). Following the serendipitous isolation of a novel *Wolbachia* sp. sequence from a pool of *M. ozzardi* infected *S. oyapockense* DNA extracts, this study used a novel low-annealing temperature (LAT) Multi Locus Sequence Typing (MLST) screening method to rapidly classify this new strain and develop a new method for diagnosing it. After testing 17 different *Wolbachia*-detecting LAT PCR assays on a *S. oyapockense* DNA stock sample (composed of DNA from 96 simuliids), 5 of these assays (designed to amplify CoxA, DNAa, FtsZ, FabK and WD 0183 gene sequences) were selected for a MLST-based *Wolbachia* sp. diagnosing assay. Of the 96 *S. oyapockense* individual DNA extracts tested with this new methodology, 90 tested positive with all 5 MLST PCRs, 2 tested positive with 1-4 PCRs, and 4 tested negative for all 5 target-genes, but positive for DNA CO1 amplifiable (using as amplifying control). Sanger sequencing of five CoxA, DNAa, FtsZ, FabK and WD 0183 gene sequences obtained from 5 *Wolbachia* positive *S. oyapockense* DNA extracts, provided no evidence of within gene sequence variation among the five tested *S. oyapockense* for any of the five target genes used for the MLST assay. MLST phylogenetic classification of a concatenated of the five gene sequences and phylogenetic analysis performed using each of the 5 gene sequences individually, consistently classified the *Wolbachia* sequences recovered for this study as belong to a Super group B. The results collected for this study strongly suggest that over 90% of anthropophilic *S. oyapockense* from Sao Gabriel da Cachoeira are infected with a single strain of Super group B *Wolbachia*, named as "wSoya". Future studies will be needed to determine if the presence of this strain influences the region's mansonellosis or onchocerciasis disease transmission dynamics.

Keywords: *Mansonella* spp., *Wolbachia* sp., Prevalence, Phylogeny.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| 2.1. <i>Mansonelose</i> | 16 |
| 2.2. <i>Ciclo de transmissão</i> | 17 |
| 2.3. <i>Diagnóstico</i> | 18 |
| 2.4. <i>Tratamento para filarioses</i> | 20 |
| 2.5. <i>Wolbachia sp.</i> | 21 |
| 2.5.1 <i>Classificação de Wolbachia</i> | 23 |
| 2.6. <i>Vetores de Mansonelose</i> | 27 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 30 |
| 4. OBJETIVOS..... | 30 |
| 4.1 <i>Objetivo Geral</i> | 30 |
| 4.2 <i>Objetivos Específicos</i> | 30 |
| 5. METODOLOGIA | 31 |
| 5.1. <i>Área de estudo e aspectos éticos</i> | 31 |
| 5.2. <i>Procedimentos</i> | 31 |
| 5.2.1 <i>Coleta de insetos</i> | 31 |
| 5.2.2 <i>Identificação taxonômica e armazenamento de espécimes de Simullium oyapockense</i> | 32 |
| 5.2.3. <i>Extração e confirmação de DNA amplificável de col</i> | 33 |
| 5.2.4. <i>Desenvolvimento de metodologia a partir de PCR para caracterização e detecção de Wolbachia</i> | 34 |
| 5.2.5. <i>Screening de população de Simullium oyapockense para presença de Wolbachia utilizando diagnóstico MLST</i> | 38 |
| 5.2.6. <i>Purificação de produtos de PCR e sequenciamento de Sanger</i> | 38 |
| 5.2.7. <i>Análise de dados do sequenciamento</i> | 39 |
| 5.2.8. <i>Análise filogenética</i> | 39 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 40 |
| 6.1. <i>Desenvolvimento de ensaio MLST para a caracterização de nova cepa de Wolbachia</i> | 40 |
| 6.2 <i>A análise da sequência de DNA confirma que todos os cinco genes alvo de Wolbachia foram amplificados com sucesso e não forneceu evidências de variação genética</i> | 41 |
| 6.3. <i>A análise filogenética com o gene ftsZ sugere que a Wolbachia que detectamos é de origem de inseto e não de parasita filarial.</i> | 41 |
| 6.4. <i>Todas as análises filogenéticas de um único gene classificaram todas as sequências de Wolbachia recuperadas de S. oyapockense como derivadas do Super grupo "B"</i> | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 6.5. Classificação MLST de wSoya Wolbachia | 44 |
| 6.6. Prevalência de infecções putativas por Wolbachia na população de <i>S. oyapockense</i> de São Gabriel da cachoeira..... | 46 |
| 7. CONCLUSÃO | 48 |
| 8. MATERIAL SUPLEMENTAR | 49 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |

1. INTRODUÇÃO

A Mansonelose é uma doença causada por nematódeos filariais transmitida pela picada de insetos do gênero *Simulium* (Diptera) conhecidos como borrachudo ou pium infectado com microfilárias (Tang et al., 2018). A infecção causada por esses parasitas é considerada uma doença crônica que atinge mais de 115 milhões de africanos infectados apenas com *Mansonella perstans* (Manson 1891), um dos nematódeos causadores de Mansonelose (Simonsen et al., 2011).

Casos de Mansonelose já foram documentados no norte do Brasil, incluindo o norte do Amazonas, e estão registrados principalmente em comunidades ribeirinhas e em territórios indígenas entre os municípios e áreas de fronteira como Tefé, Coari, Lábrea, Pauini e São Gabriel da Cachoeira onde as taxas de prevalência da doença chegam aos 50% (Medeiros et al., 2017; Medeiros et al., 2009).

Os insetos dípteros, vetores de parasitos causadores da Mansonelose podem ser tanto da família Simuliidae quanto Ceratopogonidae, as quais são responsáveis pela transmissão da doença em outras partes do mundo (Tang et al., 2018). A infecção destes vetores acontece durante o repasto sanguíneo das fêmeas, mas só vai resultar em vetor-transmissor da doença se o parasita conseguir ultrapassar barreiras intrínsecas do inseto e completar o período de incubação necessário para se tornar infeccioso (Tang et al., 2018, Ferreira et al., 2020; Medeiros et al., 2017; Guegán et al., 2018). Esse gargalo na biologia do parasita demonstra como a análise do holobionte do vetor pode ser a resposta para se compreender os mecanismos de ação e ciclo de vida de organismos parasitados, isto é, o hospedeiro não deve ser mais analisado isoladamente, e sim, ser reconhecido e estudado junto a sua interação com as comunidades microbianas presentes (Guegán et al., 2018; Tang et al., 2018; Ferreira et al., 2020; Medeiros et al., 2017).

Dentre os microrganismos que infectam vetores está a bactéria intracelular *Wolbachia* sp., a qual é capaz de influenciar a competência vetorial dos seus hospedeiros através de mecanismos hereditários (Werren et al., 2008). Esses microrganismos possuem importância não só por atuarem no desenvolvimento dos parasitas dentro de seus hospedeiros, mas também por influenciarem em aspectos da biologia do vetor, como a longevidade, a qual tem importância epidemiológica (McMeniman et al., 2009; Werren et al., 2008; Kambris et al., 2009). Por exemplo,

tanto a longevidade do mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e a habilidade de certos vírus (e.g. Chikungunya, Dengue e Zika), de se desenvolverem dentro do vetor, é extremamente influenciada pela presença de *Wolbachia* spp. (Moreira et al., 2009; Dutra et al., 2016). Similarmente, a presença de *Wolbachia* sp. pode também influenciar o desenvolvimento de parasitas causadores de filarioses sendo essenciais para o seu desenvolvimento. Por essas características, atualmente a bactéria *Wolbachia* sp. é utilizada como alvo de fármacos em programas de eliminação da Mansonelose (Taylor et al., 2005; Tang et al., 2018).

Em um estudo molecular realizado no município de São Gabriel da Cachoeira, no estado do Amazonas, uma nova cepa de *Wolbachia* sp. foi encontrada durante uma análise de extrações de DNA de *Simullium oyapockense* (Floch & Abonnenc), vetor conhecido pela transmissão de Mansonelose na região. O proposto para este projeto tem como primeira etapa caracterizar molecularmente esta nova cepa de *Wolbachia* determinar sua frequência dentro da população de estudo e avaliar se esta bactéria tem alguma influência na prevalência de Mansonelose através da infecção do seu hospedeiro artrópode.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mansonelose

A Mansonelose é uma doença causada por três espécies de parasitas filariais, *Mansonella perstans* Manson 1891, *Mansonella streptocerca* (Macfie e Corson), 1922 e *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897). Estes parasitas pertencem ao filo Nematoda, ordem Spirurida, Superfamília Filarioidea, família Onchocercidae (Medeiros et al., 2017). A doença é amplamente distribuída e presente em continentes como a África, onde *M. streptocerca* é endêmica e encontrada mais a Oeste e Centro da África (Tang et al., 2018; Ferreira et al., 2020; Medeiros et al., 2017). Já na América latina, *M. ozzardi* é atualmente considerado o parasito mais comum, com casos reportados desde o México até a Argentina (Crainey et. al., 2018; Medeiros et al., 2017; Lima et al., 2016).

No Brasil, somente *M. ozzardi* e *M. perstans* estão atualmente registradas, com ocorrência nos estados do Amazonas, Acre, Mato grosso, Rondônia e Roraima (Medeiros et al., 2017). Há algum tempo se questionava se a distribuição de *M. perstans*, assim como *M. streptocerca*, estava restrita apenas para regiões africanas,

porém, essa espécie teve sua presença registrada na América Latina com base em estudos moleculares que detectaram sua presença em comunidades do norte do estado do Amazonas (Silva et al., 2017; Crainey et al., 2020).

A Mansonelose não possui sintomatologia bem definida, mas indivíduos parasitados podem apresentar dores articulares, cefaleia, frieza nas pernas, prurido, tonturas, febre e em certos casos mais graves, lesões oculares e perda da visão (Medeiros et al., 2017, Tang et al., 2018). Essa doença é negligenciada e, por isso, possui pouco investimento para pesquisas e não faz parte da lista e manual de manejo das vinte principais doenças tropicais negligenciadas do mundo recém-publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e destinado aos agentes de saúde (OMS, 2021).

Os registros de ocorrência de Mansonelose no estado do Amazonas estão associados aos municípios de Tefé, Coari, Lábrea, Pauini e São Gabriel da Cachoeira nos quais as comunidades ribeirinhas e indígenas são as mais acometidas por essa parasitose tendo uma taxa de prevalência da doença acima de 50% em certas localidades (Tang et al., 2010; Medeiros et al., 2009). Pelo fato desta doença não ter uma sintomatologia bem definida, existe uma certa dificuldade em estudá-la, bem como detectá-la em inquéritos epidemiológicos voltados para elucidação do desenvolvimento dessa doença a longo prazo. (Simonsen et. al., 2011; Medeiros et. al., 2015; Tang et. al., 2018; Lima et. al., 2016).

2.2. Ciclo de transmissão

Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas do inseto vetor ingere microfilárias do humano infectado. Uma vez no vetor, as microfilárias vão se desenvolver e passar por três estágios larvais, (L1, L2 e L3) no abdômen, tórax e cabeça, respectivamente. No humano, após a picada do inseto contaminado com a larva em estágio L3, o verme se desenvolve em adulto, se diferenciando em macho e fêmea (Ferreira et al., 2020; Medeiros et. al., 2017) (Figura 1). As fêmeas adultas fertilizadas liberam microfilárias no hospedeiro até morrerem, essas podendo viver entre 10 e 20 anos. Em áreas endêmicas, pessoas são infectadas repetidas vezes e passam a maior parte de suas vidas infectadas, tornando a mansonelose uma doença crônica (Tang et al., 2018). A localização dos vermes adultos de *Mansonella* sp. varia de acordo com as espécies, sendo que poucos desses parasitas adultos são recuperados durante as dissecações (Bain 2002; Morales Hojas 2009). Em humanos, os parasitas adultos do gênero

Mansonella foram já recuperados da cavidade peritoneal (Tang et al., 2018; Medeiros et al., 2017). No entanto vermes adultos desses parasitas são raramente encontrados, mas, microfírias são encontradas frequentemente na corrente sanguínea de residentes da região amazônica (Crainey et al., 2020).

Durante o período de infecção as microfírias podem ser detectadas em testes diagnósticos, como por exemplo, a gota espessa (Tang et al., 2018; Medeiros et al., 2017; Ferreira et al., 2020). Devido à alta parasitemia no hospedeiro, ao realizar um novo repasto sanguíneo, o inseto pode se infectar e iniciar o ciclo de transmissão da doença em um novo hospedeiro humano (Meyers et al., 1978; Orihel e Eberhard 1998; Medeiros et al., 2017; Abraham et al., 2018).

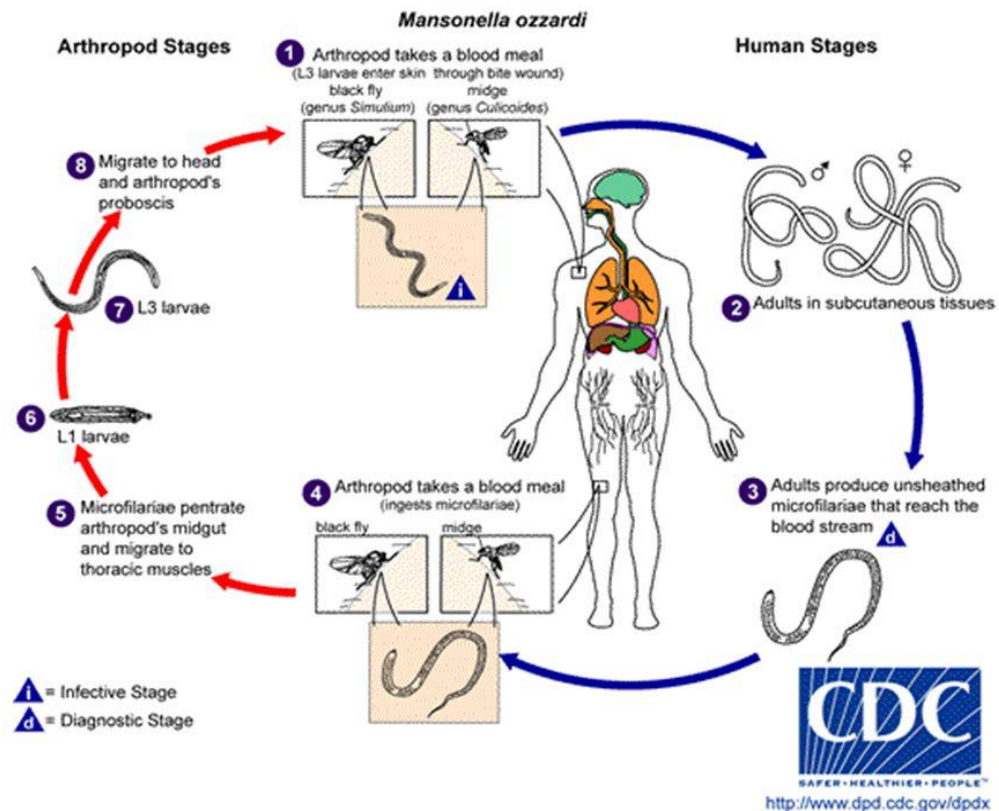


Figura 1. Ciclo de transmissão de *Mansonella ozzardi* Fonte: CDC, 2013.

2.3. Diagnóstico

O diagnóstico da Mansonelose é realizado, na maioria das vezes, utilizando a técnica clássica de gota espessa e leitura de lâmina em microscópio óptico (Figura 2) (Tang et al., 2018; Medeiros et al., 2017; Ferreira et al., 2020). A predominância do

uso dessa metodologia no diagnóstico está relacionada, em grande parte, ao local de coleta das amostras e população afetada, sendo muitas vezes associados a comunidades ribeirinhas de pouco acesso a outros testes mais específicos e de custo mais elevado (Tang et al., 2018, Medeiros et. al. 2017, Ferreira et al., 2020; Lima et al., 2016)

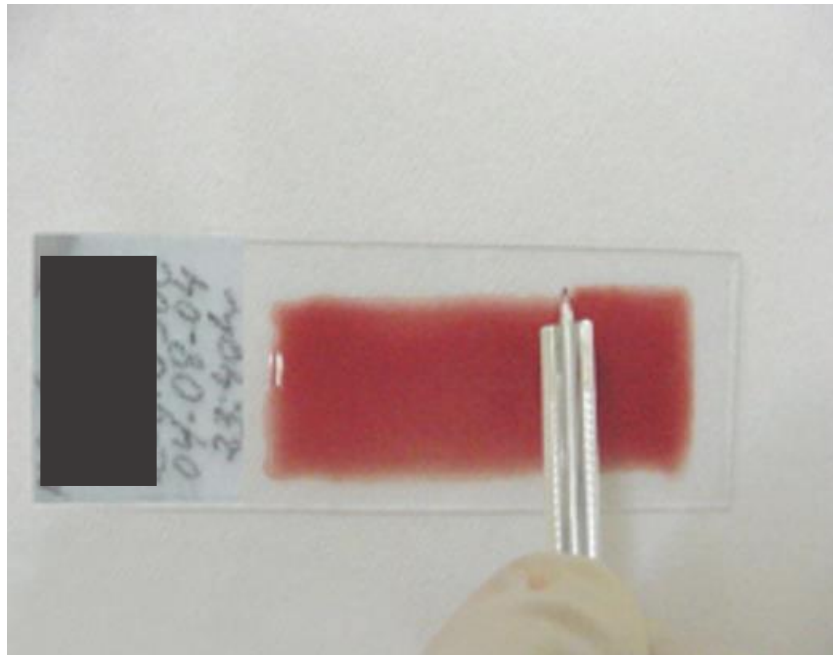


Figura 2. Confeção da gota espessa não mensurada, utilizando sangue capilar, obtido a partir da punção da região lateral do dedo anular para pesquisa de microfilárias. Fonte: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MS

Mansonella ozzardi é distinguida de outras espécies de microfilárias por não ter bainha, além de sua cauda possuir formato pontiagudo, diferentemente de *M. perstans* que possui cauda arredondada e núcleos visíveis em microscopia (Figura 3) (Medeiros et al., 2015; Tang et al., 2018; Ferreira et al., 2020; Lima et al., 2016).

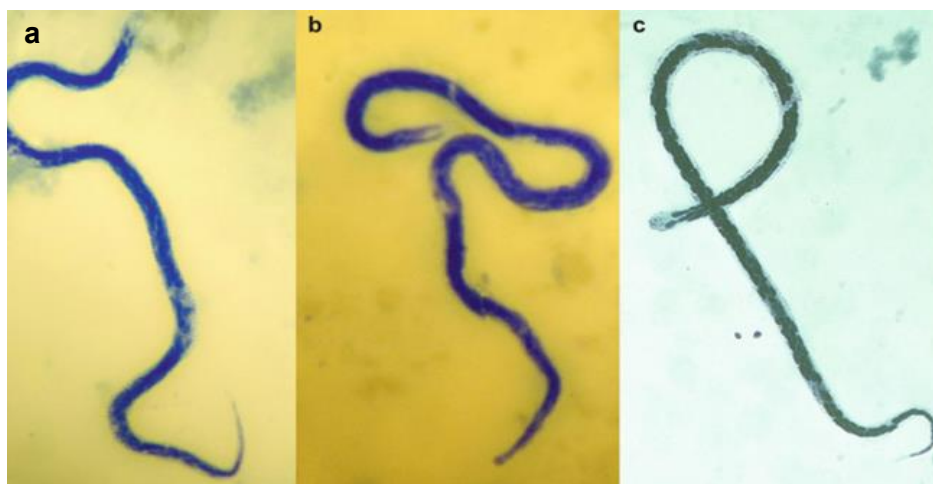


Figura 3. Microfilárias. *Mansonella ozzardi* (a), *Mansonella perstans* (b) e *Mansonella streptocerca* (c).
Fonte: Medeiros et al., 2016.

Outras técnicas diagnósticas são utilizadas para a detecção da mansonelose, como a PCR (Reação em cadeia da polimerase), que é mais abrangente em relação a detecção, entretanto, possui custo relativamente alto, sendo mais comumente empregada no campo da pesquisa. Esta técnica também tem como seu foco as microfilárias presentes na circulação do hospedeiro infectado. Devido aos altos níveis de sensibilidade da técnica e especificidade dos marcadores moleculares utilizados para detecção, os resultados dessa técnica são mais precisos em comparação com resultados de leitura de gota espessa, pois o teste de gota depende da parasitemia do hospedeiro e podem ocorrer falsos negativos (Tang et.al., 2018; Lima et al., 2016; Medeiros et al., 2015; Medeiros et al., 2017).

2.4. Tratamento para filarioses

Infecções por filariose não são normalmente tratados de forma individual, mas sim com uso em massa de ivermectina (IVM), droga utilizada para o controle de oncocercose e filariose linfática na região africana (Crainey et al., 2017). A Ivermectina não possui benefício clínico, mas elimina as microfilárias da corrente sanguínea e, portanto, quebra do ciclo de transmissão dos parasitas pelo vetor e previne ocorrência de novas infecções nas regiões de tratamento em massa (Crainey et al., 2017; Tang et. al., 2021). Embora a ivermectina elimine microfilárias de *M. ozzardi* da corrente sanguínea, essa ainda não é usada para tratamento em massa para o controle da Mansonelose (Medeiros et al., 2017; Basano et al., 2014; Tang et al. 2018; Tang et. al., 2021). A Ivermectina tem pouco impacto nas microfilárias de *M. perstans*, pois ainda não há concordância em relação ao tratamento deste parasito, desse modo tem

sido adotado o uso de albendazol, tiabendazol, DEC (dietilcarbamazina) e mebendazol no combate a microfilaremia. No entanto, *M. perstans* tanto em regiões da África quanto América Latina, ainda não é alvo de controle (Tang et al. 2021).

Na busca de novos tratamentos e drogas para o combate a filariose, foi evidenciado que a presença da bactéria do gênero *Wolbachia* tem influência positiva para o desenvolvimento e reprodução de filárias (Taylor et. al., 2005). Por esse motivo, essas bactérias tornaram-se alvo no tratamento de filarioses, com a utilização do antibiótico Doxiciclina (DOX), o qual mata as *Wolbachia* nestes parasitas (Taylor et al., 2005) Pelo fato de filárias e vermes adultos dependerem das bactérias da *Wolbachia* para sua sobrevivência, estas acabam morrendo em função da morte das bactérias (Crainey et al., 2017; Tang et. al. 2018; Tang et. al., 2021). O mecanismo de ação da DOX como substância antibiótica se dá pela inibição da síntese de proteínas bacterianas via porção 30S dos ribossomos. Sua meia-vida de eliminação plasmática está compreendida entre 12 e 24 horas sendo necessário seu uso diário por quatro semanas consecutivas (Tang et. al., 2018; Tang et. al., 2021). A doxiciclina é, portanto, um tratamento efetivo para uma série de infecções por parasitas filariais humanos e animais, mas com tratamento de duração prolongada (Tang et al., 2018; Tang et. al., 2021). Uma vez que *M. ozzardi* e *M. perstans* possuem associação com *Wolbachia*, existe uma perspectiva de que esses tratamentos *anti-Wolbachia* de curta duração propostos para a eliminação da oncocercose e da filariose linfática, possam ser empregados no controle e eliminação da mansonelose e, dessa maneira, fazer com que a eliminação de *M. ozzardi* seja significativamente mais barata e viável (Bakowski et al., 2019, Crainey et al., 2020; Tang et al., 2021).

2.5. *Wolbachia* sp.

Wolbachia é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória que é herdada citoplasmicamente e infecta mais de um milhão de espécies de insetos e nematódeos filariais, cerca de 75% dos organismos catalogados atualmente (Tortora, 2017). Essa bactéria foi reportada pela primeira vez por Hertig e Wolbach no tecido reprodutivo do mosquito *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) dando origem ao nome de sua única espécie *Wolbachia pipiens* (Hertig e Wolbach, 1924).

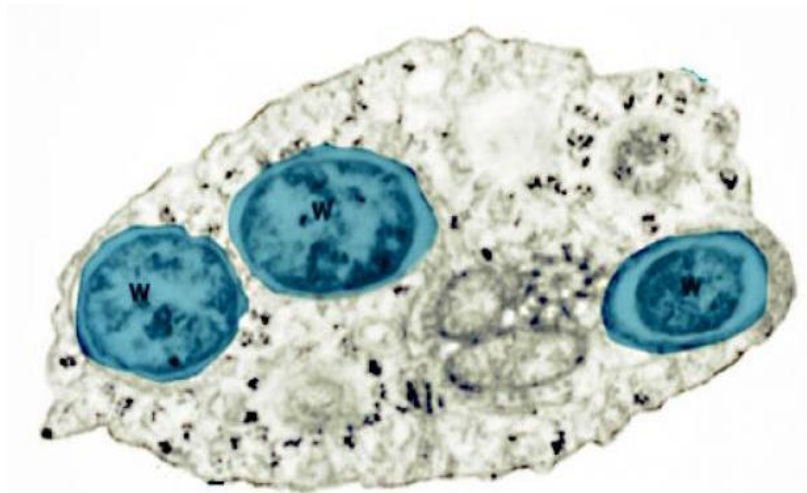


Figura 4. Célula de *Aedes albopictus* infectada com *Wolbachia*. Fonte: World mosquito program

Bactérias do gênero *Wolbachia* são encontradas nas glândulas salivares, cérebro, músculo, retina e principalmente no tecido reprodutivo dos seus hospedeiros. São herdadas por transmissão vertical (herança materna), entretanto mais recentemente foi observado, que também ocorre através de infecção horizontal entre vespas e afídeos (Werren et al., 2008). Uma vez infectados, os hospedeiros podem sofrer alterações como incompatibilidade citoplasmática (IC), efeito mais frequentemente encontrado, o que evita que os machos infectados tenham sucesso no cruzamento com fêmeas que não são infectadas ou que não possuam a mesma linhagem de *Wolbachia* (Kambris et al., 2009). Outro efeito é a feminização, resultado da transformação da prole de machos em fêmeas e morte de machos para favorecer as fêmeas (propagação da espécie) e partenogênese, a qual elimina a participação dos machos na reprodução (Hoerauf et al., 2007). Essas características, em particular IC, estão sendo amplamente abordadas em pesquisas para aplicação no controle natural de vetores de parasitas causadores de doenças em humanos e pragas agrícolas utilizando técnicas moleculares para infecção artificial de vetores com este gênero de bactérias (Kambris et al., 2009). A exemplo, há o programa *World Mosquito Program*, uma iniciativa internacional sem fins lucrativos que utiliza a bactéria *Wolbachia* artificialmente inserida em *Aedes aegypti* para que se reproduzam com os *Aedes aegypti* locais estabelecendo, aos poucos, uma nova população destes mosquitos, todos com *Wolbachia* e quando presente neste mosquito, a *Wolbachia* impede que os vírus da dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela urbana se desenvolvam dentro dele, contribuindo para redução destas doenças. Atualmente essa metodologia é implementada no Brasil e é conduzido pela Fundação Oswaldo

Cruz (Fiocruz), com financiamento do Ministério da Saúde, em parceria com os governos locais (Gesto et. al., 2021).

2.5.1 Classificação de *Wolbachia*

Anteriormente, as bactérias *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* faziam parte de um grupo de bactérias classificadas de acordo com características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas e clínicas. Com a utilização da biologia molecular no diagnóstico e na pesquisa científica foi observado que existem diferenças genéticas entre os representantes deste grupo e, recentemente, o gênero *Wolbachia* foi reagrupado em outro táxon tendo sua atual classificação como pertencente a classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae (Bowman et al., 2011; Dumler et al., 2001).

Com o avanço de tecnologias científicas na identificação de microrganismos, o estudo genético surgiu a fim de elucidar mecanismos e comportamentos que interferem diretamente na epidemiologia dos insetos. Os esquemas tradicionais de tipagem molecular para a caracterização de microrganismos patogênicos são pouco portáteis porque indexam variações que são difíceis de comparar entre laboratórios (Maiden et. al., 1998). A necessidade de caracterização de alta sensibilidade de isolados levou ao desenvolvimento de uma ampla gama de métodos de tipagem de cepas, incluindo tipagem de sequência multilocus (MLST), a qual se tornou o método de escolha para análise de muitos organismos bacterianos (Magurran et al., 2004).

A utilização de MLST para avaliar a presença da bactéria *Wolbachia* sp. em vetores e filárias é amplamente utilizada pois ela usa alelos como unidade de comparação, em vez de sequências de nucleotídeos podendo avaliar vários *loci* com sequências altamente conservadas de genes ortólogos (marcadores de especiação) (Maiden et. al., 1998). A diversidade filogenética resultada desses dados é uma medida base de informações que incorpora as relações genéticas das espécies podendo assim definir a origem e a associação com seus hospedeiros através da análise de genes de manutenção (Maiden et. al., 1998).

Mesmo metodologias com resultados satisfatórios para análise filogenética de novas espécies há uma dificuldade nas tentativas de reestruturar a filogenia molecular com árvores filogenéticas de *Wolbachia*, há divergências que precisam ser consideradas quanto a limitação de genes a serem utilizados que geram resultados

incongruentes quanto a posição de uma raiz válida. Dessa forma os estudos filogenéticos para *Wolbachia* muitas vezes são dispendiosos devidos aos reagentes utilizados para múltiplas reações de PCR na busca de isolar sequências satisfatórias para um sequenciamento molecular de qualidade e posterior aplicação de dados em análises filogenéticas (Bordenstein et al., 2009; Maiden et al., 1998; Paige et al., 2017; Figueiredo et. al., 2003). Bordenstein et al., (2009) sugere que a eliminação ou redução do erro sistemático associado as interferências nesse tipo de estudo podem ser alcançadas utilizando uma melhor amostragem de táxons porque permite maior detecção de múltiplas substituições e a aplicação de uma seleção rigorosa de genes para aumentar a relação da filogenética.

Lefoulon et al. (2009) utilizou em seu estudo a abordagem MLST com os genes 16S rDNA (menor unidade ribossomal), *wsp* (*Wolbachia surface protein*) e *ftsZ* (*filamenting temperature-sensitive mutant Z*) responsáveis por codificar uma das subunidades que compõe o ribossomo (rRNA), uma proteína de adesão específica desta bactéria e uma das proteínas responsáveis pela divisão celular, respectivamente. Bordenstein et al. (2009) em seu estudo analisando 21 sequências moleculares baseadas em sequências-alvo de *Wolbachia* construiu uma árvore de Máxima Verossimilhança sugerindo a existência de ao menos 7 supergrupos (A-F, H). Nas análises filogenéticas mais recentes de Lefoulon et al. (2020 a; 2020 b) foi descrito mais 3 supergrupos: J, L, S.

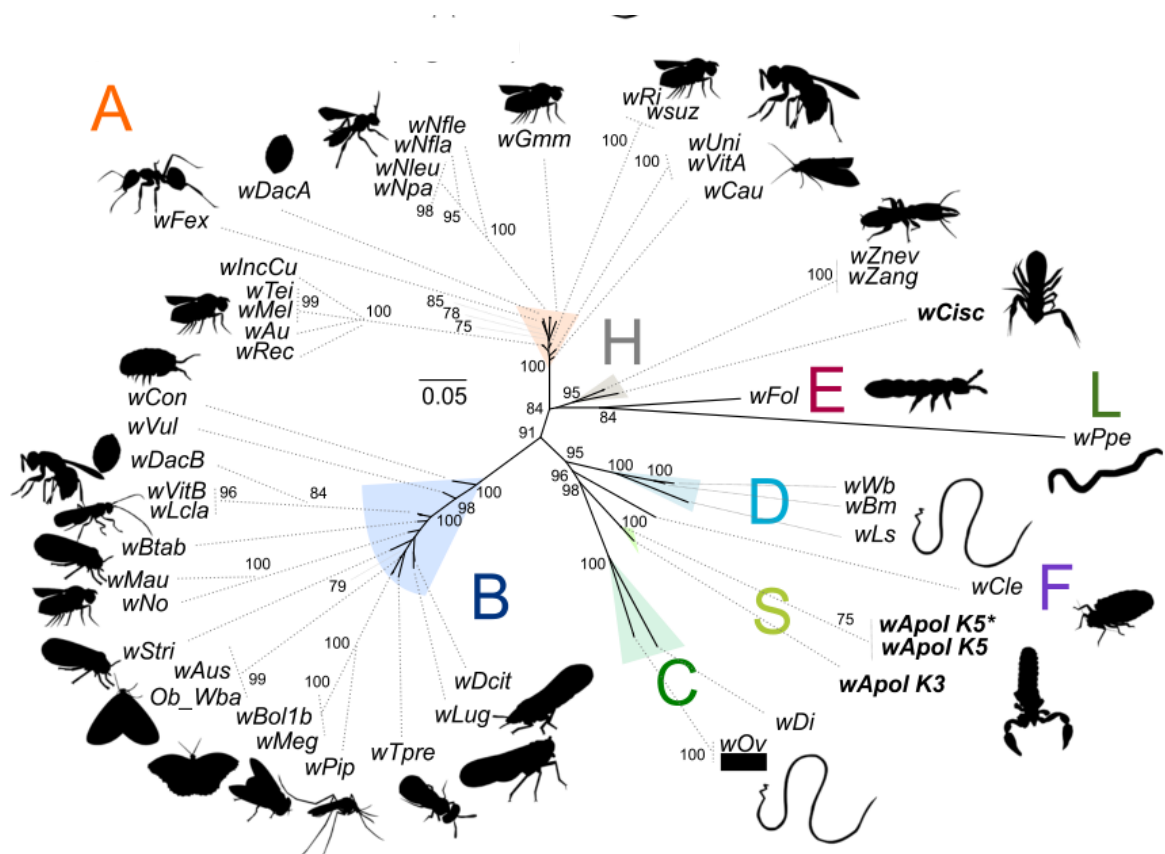


Figura 5. Árvore filogenética dos supergrupos (A-F, H, L, S) de *Wolbachia* baseada na concatenação de seis genes. (Fonte: Lefoulon et al., 2020a)

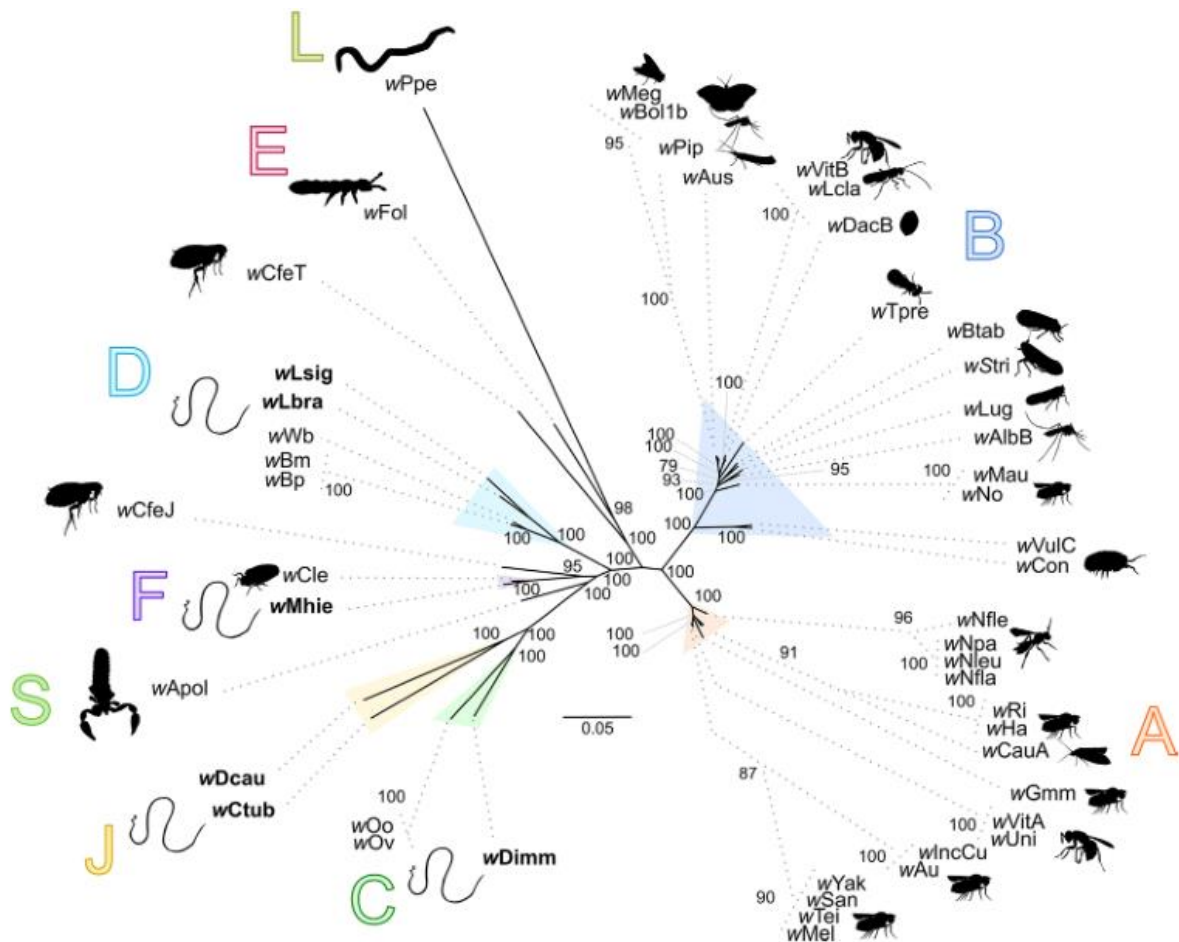


Figura 6. Árvore filogenética dos supergrupos (A-F, J-L, S) de *Wolbachia* baseada na concatenação de 160 ortogenes. (Fonte: Lefoulon et al., 2020b)

Os supergrupos A, B, E e H são encontrados apenas em hospedeiros artrópodes; os supergrupos C, D e J são encontrados exclusivamente em nematódeos filariais; por fim, o supergrupo F infecta tanto artrópodes quanto parasitas, incluindo o gênero *Mansonella* (Lefoulon et al., 2020). O supergrupo F é o único supergrupo descrito que infecta tanto artrópodes quanto parasitas filariais (Figura 7) (Werren et al., 2008). Em estudo realizado por Crainey et. al., (2010), foi encontrada uma cepa de *Wolbachia* infectando *Simulium squamosum* (Enderlein, 1921), sendo esta a única cepa de *Wolbachia* até o momento conhecida infectando insetos do gênero *Simulium*, mas ainda não incluído em nenhum supergrupo filogenético conhecido.

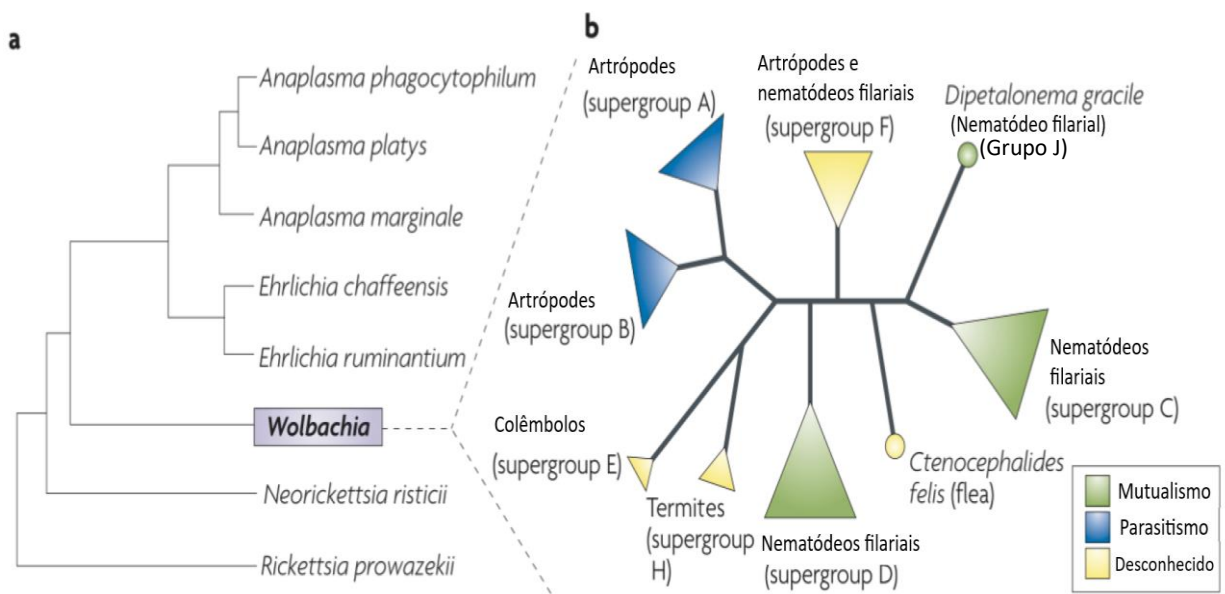


Figura 7. Diagrama esquemático da filogenia de *W. pipientis*. **a.** Relações filogenéticas entre *Wolbachia* e outros gêneros de proteobactérias. **b.** Árvore filogenética dos supergrupos de *Wolbachia*. Fonte: adaptado de Werren et al., (2008).

Com uma gama de informações agora disponíveis sobre a distribuição de *Wolbachia* em diferentes populações, aumentam-se as pesquisas focadas em como o desenvolvimento dos patógenos é impactado em seus vetores infectados com *Wolbachia* (McMeniman et al., 2009, Kambris et. al., 2009, Gomes et. al., 2017). Em um trabalho dessa natureza feito por Kambris et al. (2009) mostrou-se que o desenvolvimento do parasita *Brugia pahangi*, uma espécie de filaria que infecta animais domésticos e selvagens, é inibido pela presença de *Wolbachia* nos vetores *Aedes aegypti* artificialmente infectados. Embora *Wolbachia* tenha sido encontrado naturalmente infectando vários vetores importantes de parasitas filariais, incluindo *Culex pipiens* (o vetor principal de *Wuchereria bancrofti*) e *S. damnosum* (o vetor principal de *O. volvulus*) em região da África, o efeito que esses endossimbiontes têm sobre a epidemiologia natural dos parasitas ainda não é objeto de investigações detalhadas (Crainey et al, 2017; Crainey et. al., 2010). Entretanto, nos poucos estudos feitos demonstram que infecções naturais podem alterar o desenvolvimento de patógenos (Gomes et al. 2017).

2.6. Vetores de Mansonelose

Os vetores de Mansonelose podem ser tanto do gênero *Culicoides* (Ceratopogonidae) quanto *Simulium* (Simuliidae) dependendo da área de foco da

doença. Em países do Caribe as espécies relacionadas à transmissão de *M. ozzardi* são *Culicoides furens* (Poey, 1853), *Culicoides barbosai* (Kettle, 1968) e *Culicoides Phlebotomus* (Williston, 1896). No México, há presença *C. furens* e acredita-se que, também, a espécie *Culicoides paraenses* (Goeldi, 1950) esteja envolvida na transmissão de *M. ozzardi*. Ainda não se sabe a respeito da transmissão de *Mansonella ozzardi* por *Culicoides* spp. na Região Amazônica (Shelley e Cóscaron, 2001).

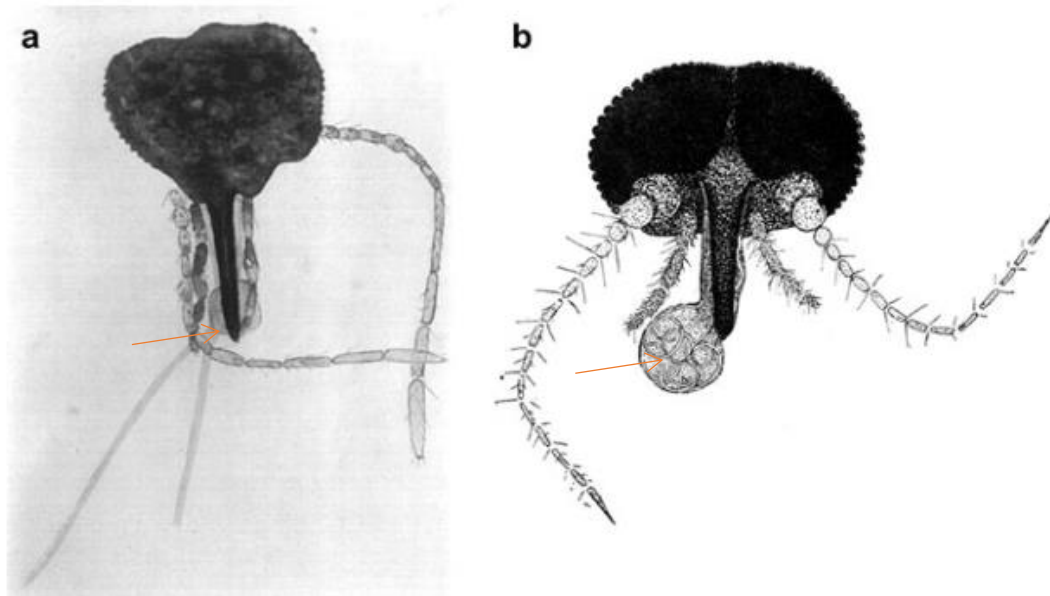


Figura 8. Microfilárias em cabeça de *Culicoides*. **a.** Microfilárias de *Mansonella perstans* emergindo da probóscide de *Culicoides austeni*. **b.** Microfilárias de *M. perstans* pronta para emergir do labro estendido. Fonte: Medeiros, 2017.

A família Simuliidae (Diptera) é amplamente distribuída no mundo, possuindo 31 gêneros, 53 subgêneros e cerca de mil e oitocentas espécies (Adler, 2021). São insetos holometábolos, cujos imaturos (ovo, larva e pupa) habitam ambientes de água corrente e podem ser encontrados em ambientes diversos, como: águas frias (próximas a 0°C) e quentes (acima de 25°C); altitudes variando desde o nível do mar até 5.000m; água doce e com baixo grau de salinidade; águas limpas e com turbidez; alto e baixo nível de saturação de oxigênio. Sendo condição obrigatória para sua sobrevivência, a presença de água corrente (Coscarón & Arias, 2007; Lane e Crosskey, 1993). Quando adultos, são alados, medindo entre 1 e 5 mm, com coloração preta ou cinza, podendo ser amarelados em algumas espécies (Lane e Crosskey, 1993). Quando adultos habitam o ambiente terrestre com grande capacidade de dispersão que pode chegar a vários quilômetros. Possuem hábitos diurnos, podendo

se alimentar de néctar e sangue de animais e humanos (fêmeas), fato que implica diretamente na disseminação de parasitas, sendo observado mudança no comportamento de animais na tentativa de evitar o ataque de Simulídeos. (Baldwin et al., 1975; Butler & Hogsette, 1998; Hunter et al., 1997; Smith et al., 1998; Lane e Crosskey, 1993). As fêmeas realizam a cópula somente uma vez, porém são capazes de realizar mais de uma oviposição. Adultos geralmente vivem de 2 a 3 semanas, podendo sobreviver até 85 dias em algumas espécies, além de possuírem grande importância ecológica servindo de alimento para várias outras espécies tanto em estágio larval quanto adultos (Butler e Hogsette, 1998).



Figura 9. *Culicoide* (Ceratomyzidae) (Maruim),
Fonte: LPC Carvalho, 2015.



Figura 10. *Simulium* (Simuliidae) (Pium)
Fonte: Medeiros, 2017.

Na Amazônia Brasileira, os simulídeos já são conhecidos por serem transmissores de *Mansonella ozzardi* e a filária *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1894) outra espécie de nematódeo filarial causador da doença oncocercose, comumente chamada de cegueira dos rios (Lane e Crosskey, 1993; Adler e McCreddie, 2019). Os vetores implicados pela transmissão de *M. ozzardi* são as espécies *Simulium argentiscutum* (Shelley & Luna Dias, 1980), *Simulium amazonicum* (Goeldi, 1905) e *Simulium oyapockense* (Shelley e Cóscaron, 2001; Medeiros et al., 2017). Sendo *Simulium oyapockense* já incriminado como vetor de *Mansonella ozzardi* em São Gabriel da cachoeira, município do estado do Amazonas (Romão et. al., 2021).

3. JUSTIFICATIVA

Historicamente, o controle e eliminação de parasitas de Mansonelose da região amazônica não era uma opção prática e, portanto, pouco esforço foi investido no estudo de sua epidemiologia. O desenvolvimento de novos tratamentos curativos para as filarioses está mudando esse cenário, tornando o controle e a eliminação desses parasitas cada vez mais viáveis. Novas abordagens que utilizam a bactéria *Wolbachia* em vários Países, incluindo o Brasil, demonstram como o conhecimento da sua relação com insetos vetores tem impacto direto na epidemiologia de doenças. A descoberta de uma nova cepa de *Wolbachia* infectando *S. oyapockense*, sendo essa a segunda ocorrência de uma cepa de *Wolbachia* infectando insetos do gênero *Simulium* e a primeira ocorrência no Brasil, encontrada a partir em um estudo anterior que realizava o levantamento da diversidade genética de *Wolbachia* em *Mansonella ozzardi* de São Gabriel da Cachoeira abre assim uma nova linha de pesquisa que busca avaliar se esta bactéria endossimbionte influencia no desenvolvimento das larvas de filárias infectando os insetos vetores desse gênero, já sendo reconhecido na literatura a importância dessas bactérias tanto para nematódeos quanto artrópodes. Uma perspectiva clara sobre a dinâmica de transmissão de parasitas filariais e um bom entendimento de como essa nova cepa de *Wolbachia* impacta a biologia de *S. oyapockense* (vetor de Mansonelose em São Gabriel da Cachoeira) irá fornecer informações para serem aplicadas em novos estudos que visam contribuir para programas de eliminação da Mansonelose na região Amazônica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente uma nova cepa de *Wolbachia* sp. e avaliar sua frequência em uma população de *Simulium oyapockense* no município de São Gabriel da Cachoeira.

4.2 Objetivos Específicos

- Classificar molecularmente uma nova cepa de *Wolbachia* isolada de uma população de *Simulium oyapockense* de São Gabriel da Cachoeira

- Desenvolver um novo ensaio para detectar e caracterizar a presença de *Wolbachia* em *Simulium oyapockense*
- Avaliar a frequência de *Wolbachia* em uma população de *Simulium oyapockense* de São Gabriel da Cachoeira.

5. METODOLOGIA

5.1. Área de estudo e aspectos éticos

A parte laboratorial deste projeto foi realizada nas dependências da Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Leônidas e Maria Deane FIOCRUZ/ILMD e no Laboratório de Citotaxonomia de Insetos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA utilizando espécimes de *S. oyapockense* coletados anteriormente no município de São Gabriel da Cachoeira. A captura desses vetores foi realizada seguindo um protocolo aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ / IOC: CAAE: 41678515.1.0000.5248)



Figura 11. Local de coleta. Município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil. Fonte: Differential resilience of Amazonian otters along the Rio Negro in the aftermath of the 20th century international fur trade.

5.2. Procedimentos

5.2.1 Coleta de insetos

Os insetos foram coletados por meio da técnica de exposição humana com uso de óleo mineral, onde uma camada do produto foi aplicada diretamente sobre a pele.

Os insetos presos na camada oleosa foram então capturados com auxílio de uma pinça e armazenados em frascos contendo álcool (Romão et al. 2019).



Figura 12. Coleta de insetos utilizando óleo mineral Fonte: Laboratório de filarioses, 2019.

5.2.2 Identificação taxonômica e armazenamento de espécimes de *Simullium oyapockense*

A identificação do material como *Simullium oyapockense* foi realizada com base nas chaves de identificação de Shelley et al., (2010) e Coscarón e Coscarón-Arias (2007). Os insetos foram dissecados em três porções: cabeça, tórax e abdômen. As cabeças e tórax (sem pernas) foram armazenados separadamente em microplacas de 96 poços identificadas e contendo álcool etílico hidratado 96°gl para posteriores análises.



Figura 13. Simulídeos em álcool dispostos em placa de petri para dissecção. Fonte: Laboratório de filarioses,2019

5.2.3. Extração e confirmação de DNA amplificável de col

Para análises moleculares foram utilizados os 96 abdomens e pernas de espécimes dissecados e identificados taxonomicamente como *Simullium oyapockense*, conforme descrito acima. Estes foram submetidos a extração de DNA através de técnica de maceração com pistilo utilizando o *kit Dneasy® Blood and Tissue* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante com adaptação para overnight de 18 horas e repouso de 5 minutos nas duas etapas finais antes da centrifugação.

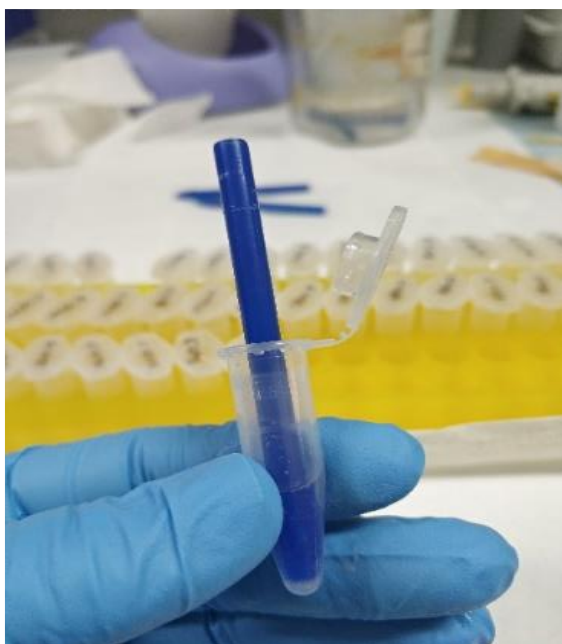


Figura 14. Abdomens de Simulídeos sendo macerados com pistilo diretamente em tubo com solução de proteinase *k*. Fonte: Laboratório de filaríoses, 2019.

Após a etapa de extração, o DNA foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em um termociclador Techne TC-512 (AnalíticaReino Unido), para obtenção das sequências correspondentes ao fragmento do gene CO1 (DNA barcoding) para identificação molecular da espécie *S. oyapockense*. Foram utilizados os primers HCO2198 e LCO1490 (658-bp), seguindo protocolo (Tabela 1) já padronizado para técnica (Folmer et al., 1994) adaptando-se a temperatura das diferentes etapas, conforme tabela a seguir.

Tabela 1. Programação da reação de sequenciamento adotada nesse experimento para a amplificação do COI.

| ETAPA | PROTOCOLO | CICLOS |
|-------|---------------------|--------|
| ÚNICA | 94°C – 3 minutos | 1x |
| | 94°C – 60 segundos | |
| | 45°C – 1:30 minutos | 45x |
| | 72°C – 1:30 minutos | |
| | 72°C – 5 minutos | 1x |

Para o preparo do mix dos reagentes para a reação da PCR foi utilizado o *kit GoTaq® DNA Polymerase* (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante: para volume de 50µL finais para cada amostra de inseto, foi utilizado 5 µL de DNA extraído, 10 µL de buffer 5x (verde), 4 µL de MgCl₂ (25mM), 5 µL (100µM), de cada um dos pares de primers (forward e reverse), 1 µL de DNTPs a 10mM, 0,2µL de *GoTaq* Polimerase (5 U/µL) e 19,8µL de água destilada estéril.

Para avaliar o resultado da amplificação foi realizado eletroforese em gel de agarose a 1,2% com base em protocolo de Sambrook e Russel (2001) utilizando produto da reação de PCR e marcador de peso molecular Ludwig Biotec ladder 100 pb (0,1 µg/µL). O resultado foi visualizado em transiluminador (UV302nm T26M, BioAgency, país) com câmera fotográfica acoplada (EOS Rebel T3, Canon).

5.2.4. Desenvolvimento de metodologia a partir de PCR para caracterização e detecção de *Wolbachia*

Um modelo de detecção de *Wolbachia* a partir da otimização de um protocolo padrão de PCR foi aplicado neste trabalho com a expectativa de diminuir o tempo e custos aplicados em pesquisa de biologia molecular com alvos *MLST* já pré-determinados. Inicialmente houve a seleção de sequências-alvo para detecção de *Wolbachia* que possuem melhor utilidade taxonômica comprovada para construção de análises filogenéticas utilizando-se o protocolo padrão de *MLST* (Borderstein et al. 2009). O protocolo padrão de amplificação de DNA foi desenvolvido para baixa temperatura de anelamento a fim de maximizar a possibilidade dos *primers* amplificarem os genes-alvo presentes no DNA extraído de cada amostra. Qual critério para isso?

Ao total 21 ensaios de PCR foram aplicados utilizando um único protocolo de PCR (tabela 3) e reação de *mix* padrão (mesmo *mastermix* de reação CO1, citado acima). Todos os 21 ensaios foram “nested” PCRs com duas etapas de reação. A primeira reação de PCR projetada para amplificar um fragmento de PCR entre ~600 e ~800 pb em tamanho e a segunda projetada para amplificar um fragmento interno entre ~400 e ~600 pb em tamanho. A primeira PCR amplificou produtos utilizando 5 µL de extrato DNA de *Simulium* spp. e a segunda reação amplificou produtos de PCR utilizando 5 µL do produto da primeira reação de PCR. Na tabela 2 estão listadas as sequências, *primers* e alvos utilizados para estes 21 ensaios. O DNA utilizado na primeira reação foi realizado a partir de uma solução-estoque de DNA que foi composto por 10 µL de cada umas 96 amostras.

Tabela 2. Alvos e sequências iniciadoras para a detecção de *Wolbachia* nas amostras de *Simulium oyapockense* analisadas.

| ALVO | SEQUÊNCIA | Banda (pb) | Atuação |
|--------|--|------------|--|
| ftsZ | Ftsz_UNI_F1: GGAGCATATAAAAGATAGTCAT | 1° Ciclo: | Proteína de |
| | FtsZ_UNI_R1: ATCRATRCCAGTTGCAAG | ~700pb | membrana para |
| | FtsZ_int_F2: CTTTTCATCACGGCAGGAAT | 2° Ciclo: | divisão celular |
| | FtsZ_int_R2: ATCTTCTCCCTCCGTTCTC | ~430pb | bacteriana |
| wd0183 | Wd0183_F1: C(R)AGGCTGGAGTTAGTCAGG | 1° Ciclo: | proteína da biogênese do citocromo tipo C |
| | Wd0183_R1:T(KS)(Y)ACC(M)ATTGCAAATTCA | ~750pb | |
| | Wd0183_INT_F2: TTTTTGCTTGG(Y)GGAGTAGT | 2° Ciclo: | |
| | Wd0183_INT_R2: GACGTCA@TTCCGTTC(Y)TGT | ~500pb | |
| coxA | CoxA_F1: GCCCCATTTGAAGAGGTGTA | 1° Ciclo: | Citocromo c oxidase Subunidade 1 |
| | CoxA_R1: TCGCTTTAGCGGTRCT(T/G)GCT | ~850pb | |
| | CoxA_INT_F2: GTCGGGTATACGCCTT(A/G)GCA | 2° Ciclo: | |
| | CoxA_INT_R2:TTGGTCA(T/G)CC(T/G)GAAGTTTAC | ~650pb | |

| | | | |
|------|--|-----------|----------------------|
| | DnaA_F1: TCCAATACCAGG(A/C)AGCAACC | 1° Ciclo: | |
| dnaA | DnaA_R1: TTACAAGACC(A/G)CGAAGCCT | ~730pb | ATPase iniciadora da |
| | DnaA_F2:TCTCCTAG(C/T)GATCTTGATGGA | 2° Ciclo: | replicação |
| | DnaA_R2: CTCCTAG(C/T)GATCTTGATGGA | ~375pb | |
| | | | |
| | FabK_F1:TTGGC(A/G)TAATTGCATGT(T/G)GT | 1° Ciclo: | |
| fabK | FabK_R1: CTTTGGCCTGCCATTAAAGA | ~780pb | Trans-2-enoil-ACP |
| | FabK_F2:GG(T/C)GG(A/G)(T/C)TACCGACAAAACC | 2° Ciclo: | redutase fabK |
| | FabK_R2: TGGAATTACAGGAAAATCAG(C/A)A | ~420pb | |
| | | | |
| | NouG_F1:TAA(Y)GGATCTTGACCGATGA | 1° Ciclo: | |
| nouG | NouG_R1: TT(Y)GGGCCACTTATTGAAAC | ~940pb | Subunidade gama da |
| | NouG_F2:GCATT(Y)TCTAT@CCCT(S)A(RY) | 2° Ciclo: | NADH desidrogenase |
| | NouG_R2: GTGGGAAGTGCGATCAGAGT | ~410pb | |
| | | | |
| | NuoD_F1:TTGGAGCGATRACTCCTCTT | 1° Ciclo: | |
| nuoD | NuoD_R1: GCAAGCATGTG(Y)CCTTTT | ~750pb | Subunidade I D de |
| | NuoD_INT_F2:TATTAGGCCAGGTGGAGTGG | 2° Ciclo: | NADH desidrogenase |
| | NuoD_INT_R2: GTTTTCATCTC(Y)GCTCTTGG | ~440pb | |
| | | | |
| | PhB_F1:CGAAAGGATTGCTGAAGGAG | 1° Ciclo: | Subunidade beta da |
| pdhB | PhB_R1:ACCCTCTTCTACGCTGACCA | ~680pb | piruvato |
| | PhB_INT_F2:GGATTTGCTGGTCTTGCTGT | 2° Ciclo: | desidrogenase do |
| | PhB_INT_R2:TT(R)CATC(Y)TTTCCTTC(Y)CGT | ~400pb | complexo E1 |
| | | | |
| | SucB_F1:TTGCGGAGGGTTTAT(K)ATCG | 1° Ciclo: | 2-oxoglutarato |
| sucB | SucB_R1:CTGACAAAACAGCGCTTGAA | ~850pb | desidrogenase E2 |
| | SucB_INT_F2:TC(R)GCACTCCGAATAACCGG | 2° Ciclo: | componente |
| | SucB_INT_R2:GCTGAACA(R)CCTGC(R)GT(RR)A | ~400pb | dihidrolipoamida |
| | | | succiniltransferase |

| | | | |
|--------|--|-----------|----------------------|
| | NadH_F1:GGTGTACATTGCCACATGA | 1° Ciclo: | |
| nadH | NadH_R1:TCTGGCTGGAAGAGCAAAC | ~720pb | |
| | NadH_INT_F2:AAGACCCGCGTATCAC | 2° Ciclo: | desidrogenase |
| | NadH_INT_R2:GCCTGTAAATCGGGCTATGA | ~400pb | |
| | HcpA_F1:TCTCAAAAATTTACGAAGCTCAT | 1° Ciclo: | |
| hcpA | HcpA_R1:GCTCTTCGACCAATGCAGAT | ~600pb | proteína não |
| | HcpA_INT_F2:ATCCACGTCTTCGTTCTGCT | 2° Ciclo: | caracterizada |
| | HcpA_INT_R2:GCATCACGCACTTTACCAA | ~420pb | |
| | Wd0237_F1:GAATGCTCGACATTGGGTTT | 1° Ciclo: | |
| wd0237 | Wd0237_R1:GGCTGGATCCAAGT(R)TAAA | ~900pb | Transposase não |
| | Wd0237_INT_F2:TCAGGCTGCAAATTTTTC | 2° Ciclo: | caracterizada |
| | Wd0237_INT_R2:AATTGGTTTGGTTTCGCTGA | ~440pb | |
| | Wd1005_F1:GGTAGCGGCACTTCAAGAAA | 1° Ciclo: | |
| wd1005 | Wd1005_R1:CAGCGTATAAGCTCTCCAACC | ~800pb | Proteína hipotética |
| | Wd1005_INT_F2:TGATG(Y)GCTGGAGAG(R)TATG | 2° Ciclo: | |
| | Wd1005_INT_R2:AGATTGTGTAGCGGGCAAGT | ~400pb | |
| | Wd0198_F1:TGGTCTCACGGAATTTCTCC | 1° Ciclo: | |
| wd0198 | Wd0198_R1:TTCCGGCTAACCTAACGAA | ~600pb | fator de alongamento |
| | Wd0198_INT_F2:CCTCAAGGTAAAGGCCACAA | 2° Ciclo: | da tradução FusA |
| | Wd0198_INT_R2:CTGTAGCAACACGTGCCATT | ~480pb | GTPase |
| | AspC_F1:AAGCCATCACCTACGATTGC | 1° Ciclo: | |
| aspC | AspC_R1:A(Y)TCTCCAGCCTGTCAT(Y)GC | ~700pb | Proteína não |
| | AspC_INT_F2:GCGTTTTAGCTGCAGGAGAG | 2° Ciclo: | caracterizada |
| | AspC_INT_R2:CGTG(R)GGATATTC(M)AGCAAT | ~480pb | |
| | AspS_F1:CCGGAGTCGAGGTGATA | 1° Ciclo: | |
| aspS | AspS_R1:ATC(Y)CC@GGCTCT(R)T(R)TTCCG | ~920pb | aspartil-tRNA |
| | AspS_INT_F2:AAAGTGTTCCGCAAATTTTCTC | 2° Ciclo: | sintetase |
| | AspS_INT_R2:GAAGCT(K)CGTGGTTCCTCT(K) | ~250pb | |

| | | | |
|------|--------------------------------------|-----------|--------------|
| | AtpD_F1:TCCCCATTTTCAGCTATTTGC | 1° Ciclo: | |
| atpD | AtpD_R1:TGAGTGTGGT(Y)CGCTGAAAG | ~730pb | ATP sintase |
| | AtpD_INT_F2:GTTGCAGGAGCTGGATCAGT | 2° Ciclo: | subunidade B |
| | AtpD_INT_R2:AGA(R)AG(R)ACGCGTGAAGGTA | ~400pb | |

Tabela 3. Ciclagem para identificação de *Wolbachia* com técnica *MLST*.

| REAÇÃO | PROTOCOLO | |
|--------|---------------------|-----------|
| 1 e 2* | 94°C – 50 segundos | 5 CICLOS |
| | 47°C – 50 segundos | |
| | 72°C – 1:10 minutos | |
| 1 e 2* | 94°C – 50 segundos | 40 CICLOS |
| | 50°C – 50 segundos | |
| | 72°C – 1:10 minutos | |
| | 72°C – 10 minutos | 1 CICLO |

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

5.2.5. *Screening* de população de *Simulium oyapockense* para presença de *Wolbachia* utilizando diagnóstico *MLST*

Após a realização do *screening* de 21 ensaios de PCR para detecção de *Wolbachia*, cinco ensaios foram selecionados para diagnóstico de infecções nos 96 espécimes de *S. oyapockense* coletados em São Gabriel da Cachoeira. Para isso, 5 µL de extrato de DNA de cada amostra individual foi utilizado para os cinco ensaios utilizando os seguintes alvos *coxA*, *ftsZ*, *fabK*, *wd0183* e *dnaA*. Desses ensaios, cinco amostras que foram positivas para os cinco alvos utilizados foram selecionados para o sequenciamento e para a confirmação de que o produto havia sido amplificado com gene-alvo corretamente.

5.2.6. Purificação de produtos de PCR e sequenciamento de Sanger

As amostras escolhidas para sequenciamento foram purificadas utilizando o kit

QIAquick PCR Purification seguindo as recomendações do fabricante sem uso de indicador de pH. Os produtos das purificações foram sequenciados no Laboratório Temático de Biologia Molecular (INPA-Manaus), onde foram submetidos à reação de sequenciamento (Sanger) utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 e os mesmos iniciadores das reações de PCR (*ftsZ*, *coxA*, *fabK*, *wd0183* e *dnaA*). Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados com EDTA/Etanol, seguindo o protocolo de Platt (2007), com modificações; por fim, foram sequenciados em ambas direções (*Senso e antisenso*) no sequenciador automático DNA ABI PRIM 3130xl (Applied Biosystems, EUA).

5.2.7. Análise de dados do sequenciamento

Os cromatogramas gerados da reação de sequenciamento tiveram suas sequências extraídas no formato FASTA utilizando o programa Cromas lite. Essas sequências obtidas do sequenciamento foram inicialmente alinhadas utilizando o programa ClustalX (versão 2.1) utilizando as fitas senso e antisenso para formação de sequência consenso editada no programa Genedoc (versão 2.7). Durante a construção das sequências consenso, os nucleotídeos desapareados foram modificados para “N” e alocados manualmente utilizando como referência a cromatografia da amostra quando a base era incerta.

As sequências consenso de cada um dos genes-alvo foram então alinhadas utilizando o programa ClustalX junto a 24 sequências de referência disponíveis no banco de dados online Genbank (anexo 8). As referências selecionadas para esse conjunto de alinhamentos têm como base 24 cepas de *Wolbachia* que foram usadas nas classificações filogenômicas do trabalho de Lefouloun et al. (2020). Uma sequência de *ftsZ* isolada de outra espécie de Simulídeo (*S. squamosum*) e sequências de *ftsZ* de parasitas do gênero *Mansonella* que estavam disponíveis no GenBank também foram utilizadas neste estudo. As cepas de *Wolbachia* wDcau e wCtub, também utilizadas por Lefouloun et al. (2020), não tinham sequências *ftsZ* disponíveis, mas foram usadas em todas as outras análises.

5.2.8. Análise filogenética

Utilizando a sequência dos cinco alvos (*ftsZ*, *coxA*, *dnaA*, *wd0183* e *fabk*) junto as sequências de referência foram construídas árvores filogenéticas com máxima

verossimilhança para análise individual. Essas sequências também foram concatenadas para produzir um alinhamento com 2.271 pb para formação de árvore *MLST* com Máxima Verossimilhança. Todas as árvores filogenéticas para este projeto foram construídas usando programa *dnaml*, programa para avaliar distância entre espécies disponível no pacote de *PHYLIP* (versão 3.698) e visualizadas e exportadas usando programa *figtree* (versão 1.4.4). A robustez das árvores construídas foi testada utilizando 1000 réplicas de alinhamentos gerados com o programa *Seqboot* e *dnaml* (pacote *Phylip*). Foi utilizado o programa *Consense* (pacote *Phylip*) para gerar uma árvore de consenso das 1000 árvores produzidas com as réplicas de alinhamento. A avaliação de confiança da topologia de árvores de distância foi feita visualizando o suporte de *bootstrap* da árvore de consenso visualizada no programa *treeview* (versão 1.4.4). Agrupamentos filogenéticos importantes com apoio de *bootstrap* foram destacados na árvore geradas para as figuras apresentadas neste trabalho.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento de ensaio *MLST* para a caracterização de nova cepa de *Wolbachia*

Apenas cinco dos 21 ensaios utilizando PCR nested realizados para detecção de *Wolbachia* não amplificaram qualquer tipo de produto de PCR quando visualizados em gel de agarose. Todos os outros 16 ensaios amplificaram bandas em pelo menos uma das reações. Três das reações de PCR na primeira etapa produziram uma única banda com o tamanho esperado para os marcadores testados (*wD 0183*; *fabK* e *ftsZ*). Os alvos *dnaA* e *coxA* produziram múltiplas bandas na primeira reação e foram submetidas a segunda reação de PCR (nested) a fim de atingir o isolamento de bandas no tamanho esperado. A partir desta análise preliminar utilizando screening de todos os alvos, foi decidido que a caracterização da nova cepa de *Wolbachia* de *S. oyapockense* e o diagnóstico *MLST* seriam feitos usando os cinco genes-alvo: *wD0183*; *fabK*; *ftsZ*; *dnaA* e *coxA*. Também foi determinado que a classificação *MLST* seria feita utilizando o produto da reação dos genes: *wD 0183*; *fabK* e *ftsZ* uma vez que esses apresentaram bandas únicas com os tamanhos esperados.

6.2 A análise da sequência de DNA confirma que todos os cinco genes alvo de *Wolbachia* foram amplificados com sucesso e não forneceu evidências de variação genética

Foram triados 17 alvos baseados em *MLST* utilizando o pool de 96 amostras de DNA extraídos da população de *S. oyapockense* como citados anteriormente. Com base no resultado de PCR (Anexo 1) foram selecionados cinco alvos (*ftsZ*, *coxA*, *fabK*, *wd0183* e *dnaA*) que demonstraram melhor desempenho durante amplificação.

Um total de 14 sequências de *Wolbachia* com sequência consenso de qualidade razoavelmente boa foram recuperadas dos *amplicons* selecionados inicialmente para sequenciamento: uma sequência *ftsZ* (344pb); quatro sequências de *dnaA* (294pb); quatro sequências *fabK* (684pb); três sequências *wd 0183* (513pb) e duas sequências *coxA* (478pb). As pesquisas de *Blastn* com essas 14 sequências consensos confirmaram que todas eram da região da sequência-alvo e similar a sequências previamente identificadas como *Wolbachia*. Comparando as sequências de genes recuperadas das mesmas sequências-alvo, não foi possível confirmar qualquer variação de nucleotídeos. A análise de diversidade, portanto, não forneceu evidências de que as sequências de *Wolbachia* isoladas neste trabalho poderiam derivar de mais de uma cepa na população de estudo.

6.3. A análise filogenética com o gene *ftsZ* sugere que a *Wolbachia* que detectamos é de origem de inseto e não de parasita filarial.

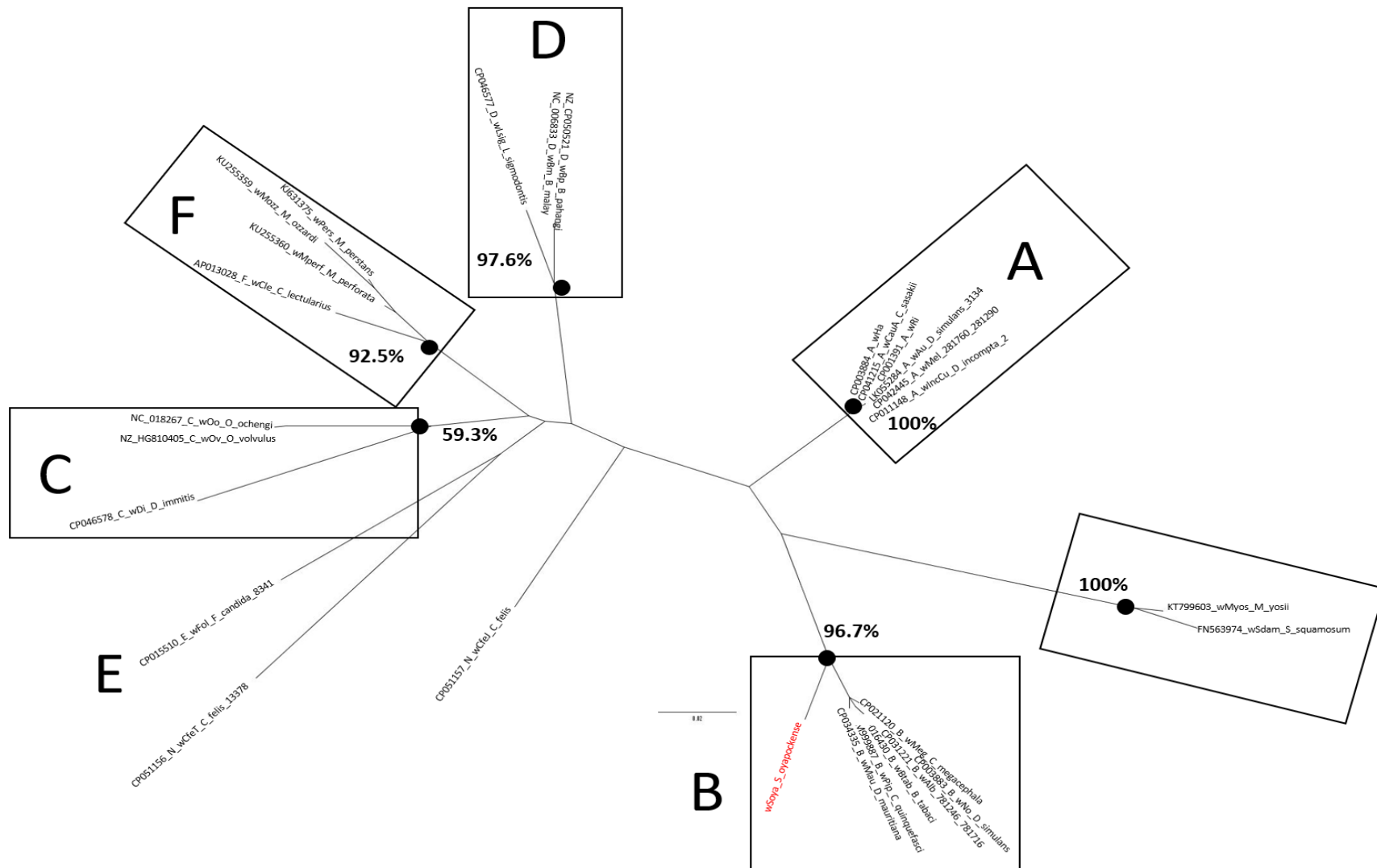


Figura 15. Árvore representativa construída com método de máxima verossimilhança e agrupamentos com apoio de *bootstrap* para uma sequência de alvo *ftsZ*. Em vermelho: agrupamento de nova cepa encontrada

A Figura 15 mostra uma árvore filogenética construída com a sequência do gene *FtsZ*. A classificação filogenética com este gene é especialmente valiosa porque ele é usado extensivamente para detecção e caracterização de *Wolbachia* e, portanto, há muitas sequências representativas disponíveis no GenBank (Lefoulon et al., 2020). Como pode ser visto nessa análise, a sequência de *Wolbachia* de *S. oyapockense* (nomeada wSoya) está agrupada com todas as seis cepas conhecidas de *Wolbachia* do “supergrupo B” em um cluster altamente suportado por *bootstrap* (96,7%). Como todas as cepas de *Wolbachia* que pertencem a esse supergrupo derivam de artrópodes, essa classificação pode ser vista como uma forte evidência de que a sequência *ftsZ* de *Wolbachia* que isolamos se origina de uma cepa de *Wolbachia* que infecta os espécimes de *S. oyapockense*. Como na análise anterior a este projeto (Crainey et al. 2010), este grupo exclui a cepa wSdam (*Simulium squamosum*) descrita anteriormente que parece pertencer a um supergrupo de *Wolbachia* totalmente diferente (mas ainda sem nome), o qual também inclui a cepa *Wolbachia* WMyos que foi isolada de um besouro recentemente. A topologia obtida mostra claramente que a cepa recuperada neste estudo é distinta da única outra cepa conhecida infectando *Simulium* (Crainey et al., 2010) e, portanto, sugere que existem várias cepas de *Wolbachia* capazes de infectar insetos desse gênero.

Também é importante ressaltar o agrupamento do supergrupo B (que inclui a sequência wSoya obtida nesse trabalho) pode ser visto como sendo distinto dos três outros supergrupos bem suportados por *bootstrap* (supergrupos C, D e F), os quais contêm todas as oito sequências filiais usadas em nossa análise. Embora esta seja uma observação esperada, visto que todos os parasitas filiais contendo *Wolbachia* até agora relatados pertencem ao supergrupo J (para o qual as sequências *ftsZ* ainda não estão disponíveis) ou a um desses supergrupos, ainda é uma observação importante para este estudo. Isso ocorre porque o adulto de *S. oyapockense* capturado na natureza pode também ser infectado por parasitas filiais e, portanto, a possibilidade de que a *Wolbachia* que isolamos neste estudo tenha vindo de um parasita filial precisa ser considerada. *Simulium oyapockense* é conhecido por transmitir os parasitas *M. ozzardi* e *O. volvulus*, que em nossa análise (como em todas as análises anteriores) podem ser vistos como pertencentes aos supergrupos F e C, respectivamente, e totalmente diferentes da *Wolbachia* que detectamos.

6.4. Todas as análises filogenéticas de um único gene classificaram todas as sequências de *Wolbachia* recuperadas de *S. oyapockense* como derivadas do Super grupo "B"

Nos anexos desse trabalho (Figura 18, 19, 20 e 21) pode ser vista a hipótese filogenética dos outros quatro genes (*coxA*, *fabK*, *dnaA* e *wD0183*) amplificados para este estudo. Em cada caso, o gene alvo agrupou-se em um grupo monofilético suportado por *bootstrap* com as outras sequências de *Wolbachia* do supergrupo B, apoiando a classificação obtida na análise da sequência *ftsZ* e sugerindo fortemente que todos os genes de *Wolbachia* amplificados para este estudo derivam de um cepa única pertencente ao supergrupo B. É importante ressaltar que todas essas quatro árvores incluíram sequências de *Wolbachia* de referência do supergrupo J (Lefoulon et al. 2020) e, portanto, incluíram sequências de *Wolbachia* filiais de todos os supergrupos conhecidos de parasitas filiais. Como as sequências consistentemente foram agrupadas com o supergrupo B apenas de artrópode, isso também fornece um forte suporte de que nenhuma dessas sequências era de origem filial.

6.5. Classificação MLST de wSoya *Wolbachia*

A Figura 16 mostra a árvore filogenética obtida usando um alinhamento de nucleotídeos feito pela concatenação das cinco sequências de referências amplificadas para este estudo. Como o observado na análise da sequência de genes individuais, a sequência (wSoya) de *S. oyapockense* foi agrupada no supergrupo B e, de fato, mais especificamente com a *Wolbachia* de *Culex quinifasciatus* (wPip) e *Chrysomya megacephala* (wMeg). É importante ressaltar que esta análise *MLST* agrupa a wSoya no supergrupo B com suporte de *bootstrap* 100% e é consistente com os resultados obtidos por Lefoulon et al. (2020), com todas os quatro supergrupos A-D sendo suportadas com 100% de suporte de *bootstrap*. Como a análise realizada por Lefoulon foi uma análise filogenômica usando 367 sequências de genes, ela pode ser considerada uma classificação padrão ouro. O fato de nossa análise recuperar as mesmas classificações que a deles pode, portanto, ser visto como uma evidência de que a análise de apenas cinco genes com abordagem *MLST* pode fornecer uma classificação confiável para *Wolbachia*.

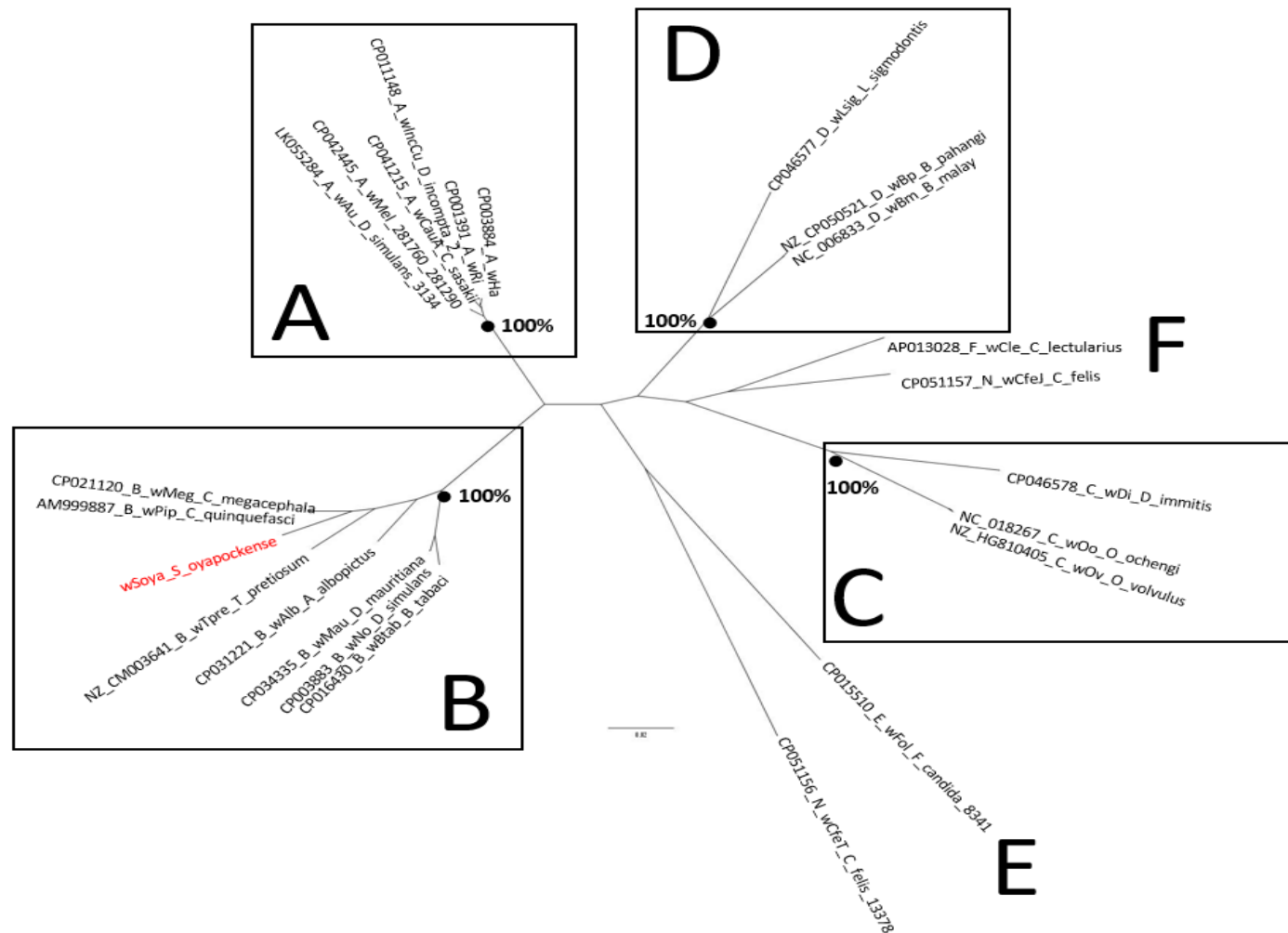


Figura 16. Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de bootstrap para sequência-alvos concatenadas. Em vermelho: agrupamento da nova cepa encontrada

Os resultados desse trabalho também comprovam o valor da abordagem de uma triagem rápida de PCR utilizando 17 genes sob baixa temperatura de anelamento para classificar essa *Wolbachia*. Em vez de investir tempo na otimização de reações de PCR que pareciam amplificar várias bandas não específicas, foram analisados somente os PCR que forneceram bandas específicas e de tamanho esperado. Além disso, vale ressaltar que esses 17 alvos foram cuidadosamente selecionados pela utilidade filogenética para classificação de *Wolbachia* (todos eles foram usados na análise de Bordenstein et al. (2009) para análise MLST). Assim, foi possível obter uma classificação confiável para todos os genes amplificados com sucesso, além de uma classificação também confiável quanto as sequências de genes foram concatenadas para a análise *MLST*. Além de fornecer uma classificação confiável da cepa wSoya isolada neste estudo, ressalta-se que a abordagem utilizada aqui pode fornecer um modelo para uma futura classificação rápida de *Wolbachia* e de custo reduzido.

6.6. Prevalência de infecções putativas por *Wolbachia* na população de *S. oyapockense* de São Gabriel da cachoeira.

O resultado das PCRs resultou em 91 amostras positivas para *Wolbachia* dentre as 96 amostras analisadas (94%), sendo 88 amostras com resultados positivos para todos os alvos e três amostras com resultados divergentes (amplificações positivas apenas para alguns dos marcadores) (Anexo 2). O alvo Wd0183 apresentou 93,75% de positivos (90/96), fabK 93,75% (90/96), dnaA 93,75% (90/96), coxA 92,7% (89/96) e ftsZ 92,7% (89/96). Cinco extratos de DNA foram negativos para os cinco alvos utilizados, entretanto, vale ressaltar que essas mesmas amostras foram positivas para o CO1, confirmando a presença de DNA amplificável.

Em uma pesquisa recente para investigar a transmissão do parasita filarias por *S. oyapockense* na região de São Gabriel da Cachoeira foi descoberto que menos de 0,2% das amostras de adultos testaram positivo para a presença de parasitas filariais (Romão et al., 2021, Shelley et al., 1997). Embora seja desejável usar um ensaio de PCR para a detecção de parasitas filarias (e.g., Tang et al. 2010) para confirmar que pelo menos algumas das amostras de *S. oyapockense* testadas e positivas para *Wolbachia* não estão infectadas com parasitas filariais e, portanto, que a *Wolbachia* não pode derivar de um parasita filarial, é remota a possibilidade de que 94% dos positivos encontrados derivem

do DNA dos parasitas filarias.

Considerando também que todos os produtos de PCR sequenciados parecem derivar de *Wolbachia* da mesma cepa do supergrupo B, a qual é exclusiva de artrópodes, a explicação mais parcimoniosa para os 94% das amostras de *S. oyapockense* que testaram positivas para todos os cinco genes nos ensaios diagnósticos, é que os espécimes estavam infectados com *Wolbachia* (chamada aqui de wSoya).

Em relação às três amostras que não foram consistentes em seus resultados, uma possível explicação é que existe variação da sequência de *Wolbachia* em nossa população de estudo que pode ter interferido na análise devido a uma quantidade limitada de pb obtidos durante o sequenciamento de Sanger. Já a explicação mais simples para o porquê de cinco amostras com resultados positivos Co1, terem resultados negativos em todas as cinco reações de PCR para o *MLST*, é que essas amostras estavam livres de *Wolbachia* (Gomes et al., 2017).

Como quase todas as cepas de *Wolbachia* que infectam artrópodes modificam a biologia de seus hospedeiros para promover sua disseminação (por isso são considerados parasitas reprodutores), a expectativa é que, quando a *Wolbachia* invade uma nova população hospedeira, sua prevalência aumente com o tempo. Em muitas populações de insetos infectadas com *Wolbachia*, a prevalência é próxima a 100%, mas em algumas é encontrada apenas raramente em alguns espécimes da população (Gomes et al., 2017). Embora a *Wolbachia* seja considerada fixa em populações de *Culex pipiens* e *Aedes albopictus*, não é incomum que pesquisas com esses insetos mostrem que menos de 100% da população selvagem capturada em qualquer área está infectada com *Wolbachia* (Albuquerque et al., 2011).

A explicação mais comum para a ausência de *Wolbachia* em espécimes capturados na natureza é que a *Wolbachia* não é 100% transmitida de maneira eficiente da mãe para o filho. Esta é, sem dúvida, uma possível explicação para os 5% de nossas amostras negativas, embora existam outras hipóteses possíveis.

Entretanto, mais importante do que o porquê de nem todos os *S. oyapockense* estarem infectados com *Wolbachia*, é a questão de se os vetores sem infecções são mais eficientes na transmissão de parasitas filariais do que os insetos infectados. Os mosquitos *Anopheles gambiae* quando naturalmente infectados com *Wolbachia* não transmitem os parasitas da malária com a mesma eficiência que os mosquitos não infectados (Gomes et al. 2017). Já os parasitas filariais de *Brugia pahangi* se

desenvolvem de forma menos eficiente em *Aedes aegypti* infectados artificialmente com *Wolbachia* (Kambris et al., 2009). Como *S. oyapockense* é um vetor de *M. ozzardi* e *O. volvulus* dentro e ao redor de São Gabriel da Cachoeira, a hipótese de que essa nova cepa de *Wolbachia* encontrada em *Simulium oyapockense* pode interferir no desenvolvimento de parasitas filariais dentro deste vetor e assim influenciar na epidemiologia de doenças filariais na região deve ser abordada de forma aprofundada em estudos futuros.

7. CONCLUSÃO

Com esse trabalho conclui-se que é possível otimizar os protocolos para detecção de *Wolbachia* e para as análises filogenéticas, com aplicação de um *screening* inicial dos alvos para reduzir o tempo empregado nas análises e visando a redução de custos. Como exemplo, temos as sequências desse trabalho que geraram um resultado robusto, onde todos os alvos (concatenados e individuais) foram agrupados repetidamente no “supergrupo B”, evidenciando que essa é uma boa metodologia que pode ser replicada. Também, conclui-se que a nova cepa de *Wolbachia* caracterizada neste estudo pertencente a *Simulium oyapockense*, sendo esta a segunda cepa de *Wolbachia* detectada infectando insetos deste gênero. Por fim, os resultados obtidos indicam que esta nova cepa de *Wolbachia* estaria infectante cerca de 94% da população de *Simulium oyapockense* da região de São Gabriel da Cachoeira. Devido o gênero *Simulium* possuir espécies implicadas na transmissão de *Mansonella ozzardi*, *M. volvulus* e *M. mariae* na região de São Gabriel da Cachoeira, ressalta-se a importância das pesquisas com *Wolbachia* associadas a esses insetos, buscando compreender a possível influência na epidemiologia das doenças transmitidas por esses vetores na região de São Gabriel da Cachoeira.

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

8.1. ANEXO 1 – Resultado da eletroforese em gel de agarose da etapa de triagem dos primers

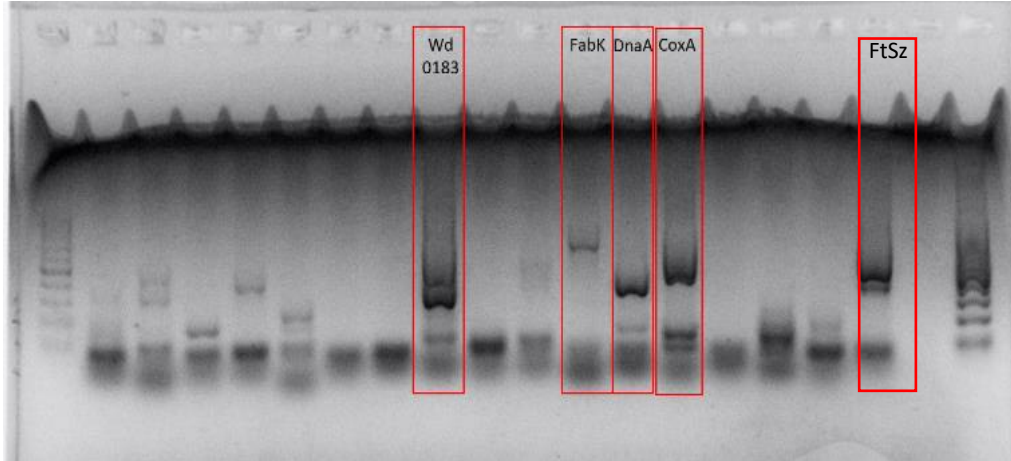


Figura. 17. Visualização de gel de agarose. Alvos selecionados entre 17 primers a partir de pool de amostras. Reação 2, primers internos. Fonte: Laboratório INPA 2021.

8.2. ANEXO 2. Tabela 4. Amostras de *Simullium oyapockense* positivas para alvos os alvos analisados nesse trabalho

| AMOSTRA | WDO183* | FABK* | DNAA** | FTSZ* | COXA** | COI |
|---------|---------|-------|--------|-------|--------|-----|
| 291 | + | + | + | + | + | + |
| 292 | + | + | + | + | + | + |
| 293 | + | + | + | + | + | + |
| 294 | + | + | + | + | + | + |
| 295 | - | - | - | - | - | + |
| 296 | + | + | + | + | + | + |
| 297 | + | + | + | + | + | + |
| 298 | + | + | + | + | + | + |
| 299 | + | + | + | + | + | + |
| 300 | + | + | + | + | + | + |
| 301 | + | + | + | + | + | + |
| 302 | + | + | + | + | + | + |
| 303 | + | + | + | + | + | + |
| 304 | + | + | + | + | + | + |
| 305 | + | + | + | + | + | + |
| 306 | + | + | + | + | + | + |
| 307 | + | + | + | + | + | + |
| 308 | + | + | + | + | + | + |
| 309 | + | + | + | + | + | + |

| | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|---|
| 310 | + | + | + | + | + | + |
| 311 | - | - | - | - | - | + |
| 312 | + | + | + | + | + | + |
| 313 | + | + | + | + | + | + |
| 314 | + | + | + | + | + | + |
| 315 | + | + | + | + | + | + |
| 316 | + | + | + | + | + | + |
| 317 | + | + | + | + | + | + |
| 318 | + | + | + | + | + | + |
| 319 | + | + | + | + | + | + |
| 320 | + | + | + | + | + | + |
| 321 | + | + | + | + | + | + |
| 322 | + | + | + | + | + | + |
| 323 | + | + | + | + | + | + |
| 324 | + | + | + | + | + | + |
| 325 | + | + | + | + | + | + |
| 326 | + | + | + | + | + | + |
| 327 | + | + | + | + | + | + |
| 328 | + | + | + | + | + | + |
| 329 | + | + | + | + | + | - |
| 330 | + | + | + | + | + | + |
| 331 | + | + | + | + | + | + |
| 332 | - | - | - | - | - | + |
| 333 | + | + | + | + | + | + |
| 334 | + | + | + | + | + | + |
| 335 | + | + | + | + | + | + |
| 336 | + | + | + | + | + | + |
| 337 | + | + | + | - | - | + |
| 338 | + | + | + | + | + | + |
| 339 | + | + | + | + | + | + |
| 340 | + | + | + | + | + | + |
| 341 | + | + | + | + | + | - |
| 342 | + | + | + | + | + | + |
| 343 | + | + | + | + | + | + |
| 344 | + | + | + | + | + | + |
| 345 | + | + | + | + | + | + |
| 346 | + | + | + | + | + | + |
| 347 | + | + | + | + | + | + |
| 348 | + | + | + | + | + | + |
| 349 | + | + | + | + | + | + |
| 350 | + | + | + | + | + | + |
| 351 | - | - | - | - | - | + |
| 352 | + | + | + | + | + | + |
| 353 | - | + | + | + | + | + |
| 354 | + | + | + | + | + | + |
| 355 | + | - | - | - | - | + |

| | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|---|
| 356 | + | + | + | + | + | + |
| 357 | + | + | + | + | + | + |
| 358 | + | + | + | + | + | + |
| 359 | + | + | + | + | + | + |
| 360 | + | + | + | + | + | + |
| 361 | + | + | + | + | + | + |
| 362 | + | + | + | + | + | + |
| 363 | + | + | + | + | + | + |
| 364 | + | + | + | + | + | + |
| 365 | + | + | + | + | + | + |
| 366 | + | + | + | + | + | + |
| 367 | + | + | + | + | + | + |
| 368 | + | + | + | + | + | + |
| 369 | + | + | + | + | + | + |
| 370 | + | + | + | + | + | + |
| 371 | + | + | + | + | + | + |
| 372 | + | + | + | + | + | + |
| 373 | + | + | + | + | + | + |
| 374 | + | + | + | + | + | + |
| 375 | + | + | + | + | + | + |
| 376 | + | + | + | + | + | + |
| 377 | + | + | + | + | + | + |
| 378 | + | + | + | + | + | + |
| 379 | + | + | + | + | + | + |
| 380 | - | - | - | - | - | + |
| 381 | + | + | + | + | + | + |
| 382 | + | + | + | + | + | + |
| 383 | + | + | + | + | + | + |
| 384 | + | + | + | + | + | + |
| 385 | + | + | + | + | + | + |
| 386 | + | + | + | + | + | + |

* Alvo submetido a uma etapa de reação de PCR Nested, *Alvo submetido as duas etapas de PCR Nested. Em azul, amostras congruentes em resultado. Em cinza, amostras divergentes em resultado.

8.3. ANEXO 3. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança construída com quatro sequências originais de *Wolbachia*.

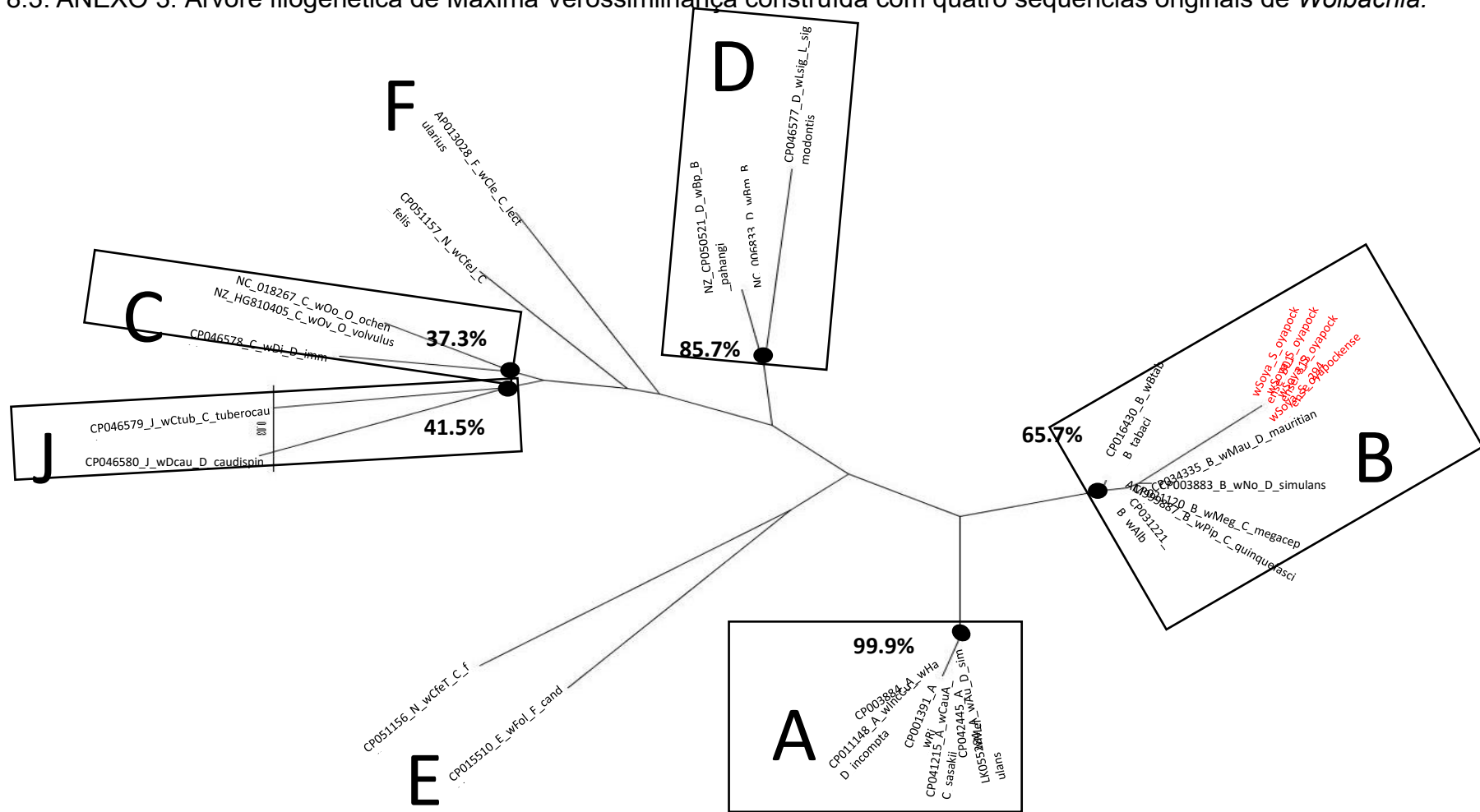


Figura 18. Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de bootstrap para sequência-alvo *dnaA*. Em vermelho: agrupamento da nova cepa encontrada

8.4. ANEXO 4. Árvore filogenética construída com 4 sequências originais de Wolbachia

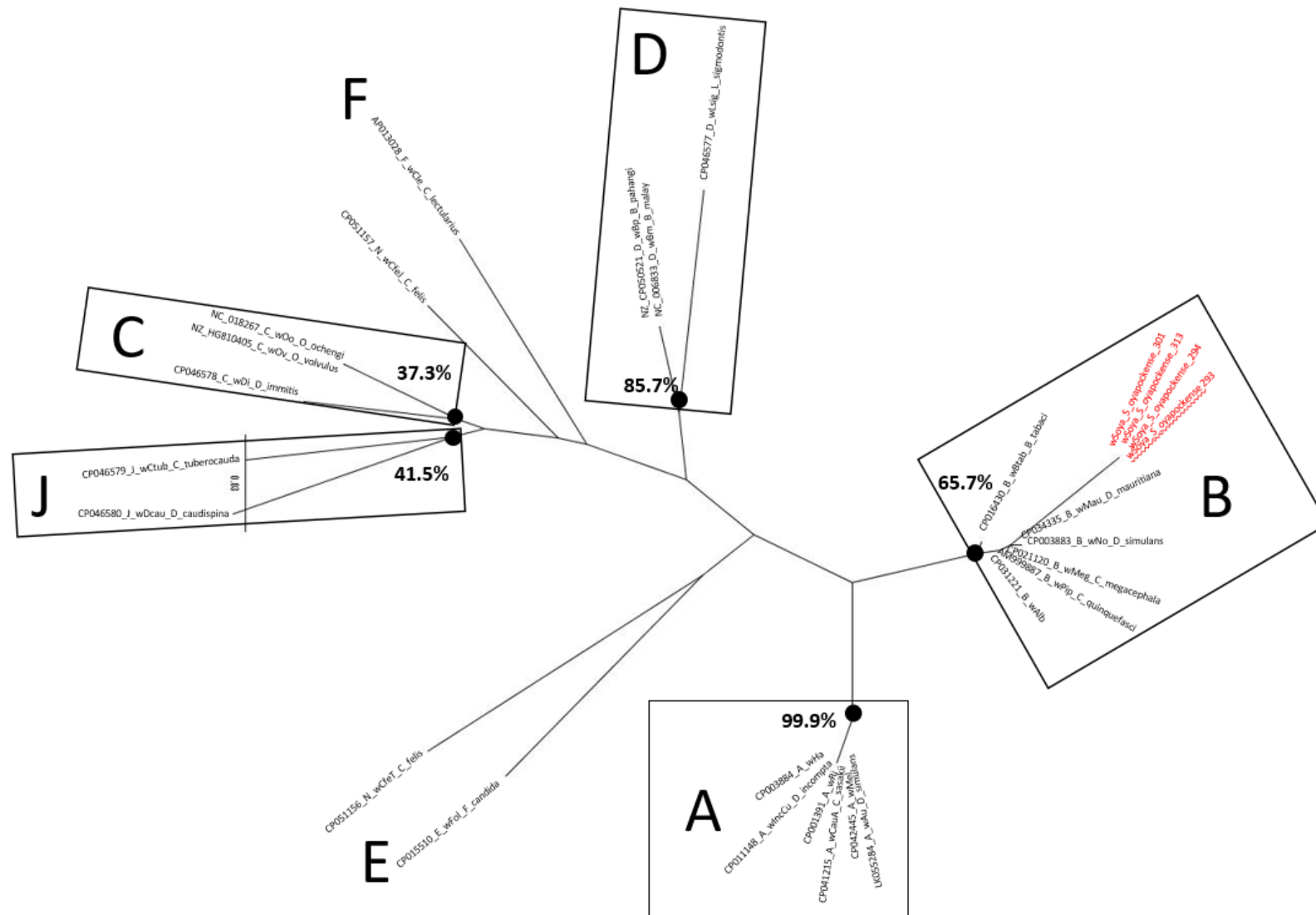


Figura 19. Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de bootstrap para sequência-alvo *fabK*. Em vermelho: agrupamento da nova cepa encontrada

8.5. ANEXO 5. Árvore filogenética construída com 3 seqüências originais de *Wolbachia*

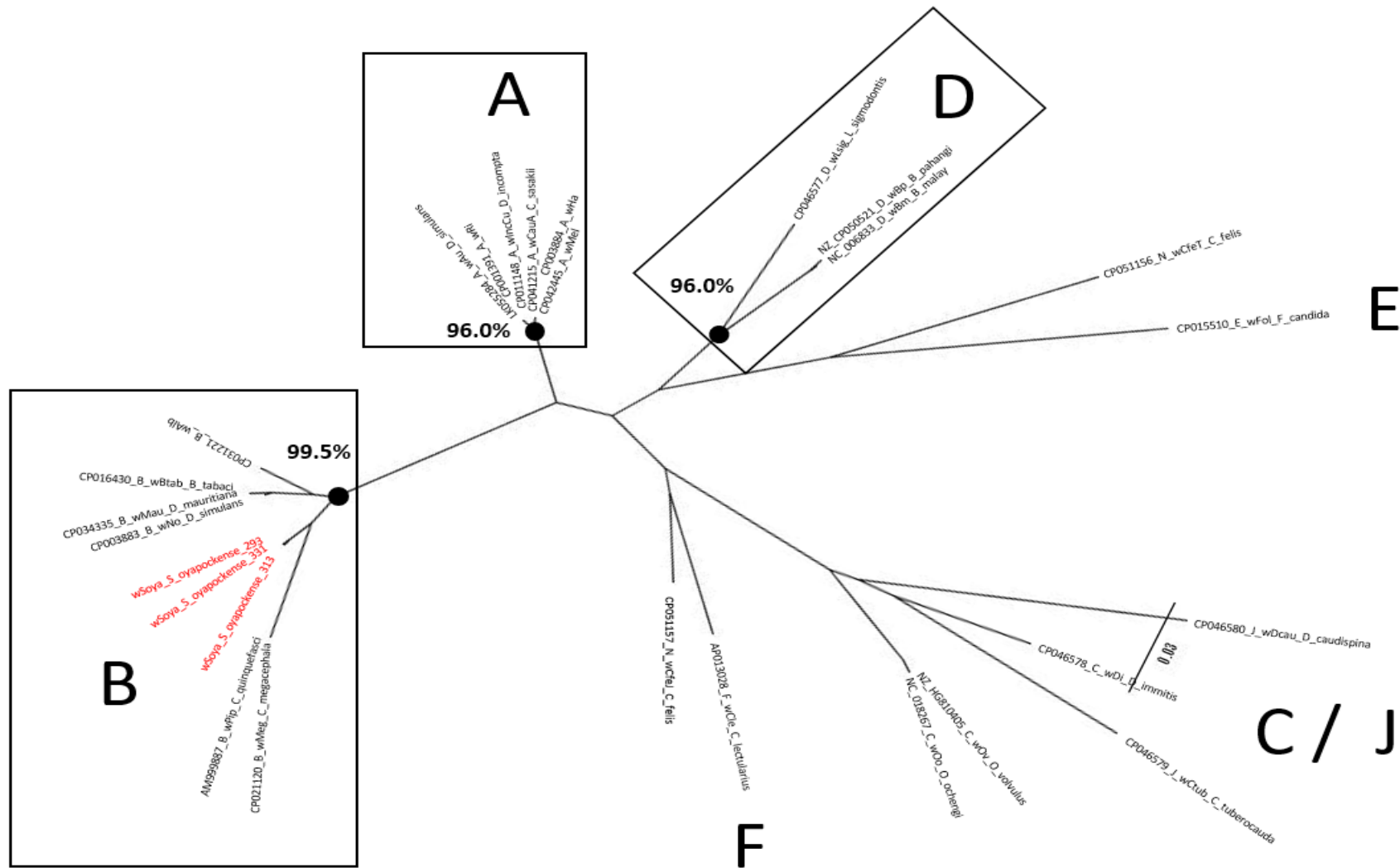


Figura 20. Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de bootstrap para seqüência-alvo *wd0183*. Em vermelho: agrupamento da nova cepa encontrada

8.6. ANEXO 6. Árvore filogenética construída com 2 seqüências originais de *Wolbachia*

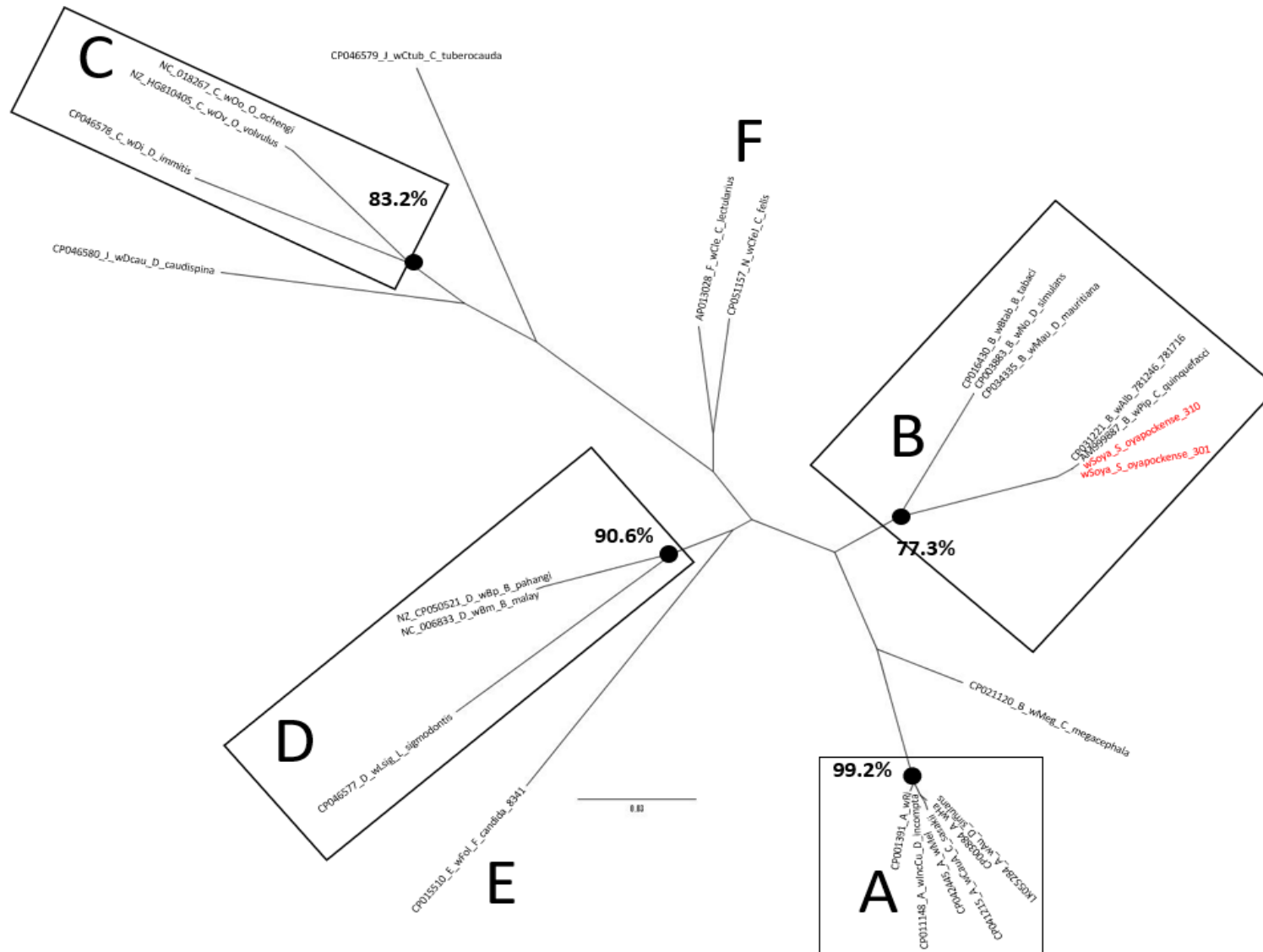


Figura 21. Árvore representativa obtida com método de Máxima Verossimilhança e agrupamentos com apoio de bootstrap para seqüência-alvo *coxA*. Em vermelho: agrupamento da nova cepa encontrada

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

coxA

>301FR_JN-037_CONS

GTGATATTGGTGCTAATAAAAAGTGAGCCAAAAGTGTATCTTTCCTAAACA
CTCGTTATATTGCTTACCTGACATTTTGCCTATCCAATAATAAAAACCGG
CAAAGCTCCAAATAATGCAGCAAGCGACATGACATAGTGAAAGTGAGCA
ACGACATAATAGGTATCGTGCAAAAAGCTTATCTATTCCACCGTGAGAAAG
AATTATTCCGGTTATACCACCTCCNACAAACATGAAAATAAAACCTAATG
CNAACAGCATTGGTGTCTTCAATTCAATCGCTCCACCCCACATAGTTGCA
ATCCAATAANACTTTTACACCAGTTATAACACCAATGAAAATTGTGCT
AGTGCTAAAAAATATAGCAGCATCCTCGNTAAGCCCAACAGTAAACATAT
GGTGAGCCCAAACCATGAAGCCAAACGTTGCTATTCTATCATGGCATAA
ACCATTCCCATATAACCAA

>310FR_JN-038_CONS

GTGATATTGGTGCTAATAAAAAGTGAGCCAAAAGTGTATCTTTCCTAAACA
CTCGTTATATTGCTTACCTGACATTTTGCCTATCCAATAATAAAAACCGG
CAAAGCTCCAAATAATGCAGCAAGCGACATGACATAGTGAAAGTGAGCA
ACGACATAATAGGTATCGTGCAAAAAGCTTATCTATTCCACCGTGAGAAAG
AATTATTCCGGTTATACCACCTCCAACAAACATGAAAATAAAACCTAANG
CAAACAGCATTGGTGTCTTCAATTCAATCGCTCCACCCCACATAGTTGCA
ATCCAATAAGACTTTTACACCAGTTATAACACCAATGAAAATTGTGCT
AGTGCTAAAAAATATAGCAGCATCCTCGCTAAGCCCAACAGTAAACATAT
GGTGAGCCCAAACCATGAAGCCAAACGTTGCTATTCTATCATGGCATAA
ACCATTCCCATATAACCAA

dnaA

>294FR_JN-021_CONS

AGAATAAAATCACGACTTGGTTGGGGATTAGTTGCAGATATCAATGAAAC
AACTTTTGAATTAAGACTTGGTATATTGCAGGCCAAAGTGGAGCGAATGA
ATATTTATGTTCCAAAAGATGTCCTAGAATTTTGTAGCAAGGAATATAAAA
TCCAATATAAGAGAACTAGAAGGAGCATTAAATAAGGTTGCTCATACTTC
GTTAATTGGAAGAAGTATGACAGTAGAATCAGCTAGCGAGACCCTAATAG
ATCTTCTTAGATCGAATCATAGGTCAATCACAATAGAAG

>313R_JN-025_R_A10_RC

AGAATAAAATCACGACTTGGTTGGGGATTAGTTGCAGATATCAATGAAAC
AACTTTTGAATTAAGACTTGGTATATTGCAGGCCAAAGTGGAGCGAATGA
ATATTTATGTTCCAAAAGATGTCCTAGAATTTTTAGCAAGGAATATAAAA
TCCAATATAAGAGAACTAGAAGGAGCATTAAATAAGGTTGCTCATACTTC
GTTAATTGGAAGAAGTATGACAGTAGAATCAGCTAGCGAGACCCTAATAG
ATCTTCTTAGATCGAATCATAGGTCAATCACAATAGAAG

>293FR_JN-020_CONS

AGAATAAAATCACGACTTGGTTGGGGATTAGTTGCAGATATCAATGAAAC
AACTTTTGAATTAAGACTTGGTATATTGCAGGCCAAAGTGGAGCGAATGA
ATATTTATGTTCCAAAAGATGTCCTAGAATTTTTAGCAAGGAATATAAAA
TCCAATATAAGAGAACTAGAAGGAGCATTAAATAAGGTTGCTCATACTTC
GTTAATTGGAAGAAGTATGACAGTAGAATCAGCTAGCGAGACCCTAATAG
ATCTTCTTAGATCGAATCATAGGTCAATCACAATAGAAG

>301R_JN-023_R_G09_RC

AGAATAAAATCACGACTTGGTTGGGGATTAGTTGCAGATATCAATGAAAC
AACTTTTGAATTAAGACTTGGTATATTGCAGGCCAAAGTGGAGCGAATGA
ATATTTATGTTCCAAAAGATGTCCTAGAATTTTTAGCAAGGAATATAAAA
TCCAATATAAGAGAACTAGAAGGAGCATTAAATAAGGTTGCTCATACTTC
GTTAATTGGAAGAAGTATGACAGTAGAATCAGCTAGCGAGACCCTAATAG
ATCTTCTTAGATCGAATCATAGGTCAATCACAATAGAAG

fabK

>310FR_CONS_JN-017_R_A09_RC

GAGACACAGAAATTAACAAACCATTTGGTGTAACCTAATTACTAT
GCACCCAAAGTTGAGTGAGTTGATAGATGTGTGCATTGAAACGAAAGTAA
GCCATATAGTGCTTGCCGGTGGACTACCAACAAAGCGTAATATAGAAAA
ATCAAGAGTGCGGGCATTAAAGTTATATGCTTTGCGCCAGCATTAAAGCCT
TGCGAAAAGGTTAGTAAACATGGGAGTAGATGCGTTAATAATAGAAGGAA
TGGAAGCAGGAGGACATATCGGTCCTGTTAGCACTTCTGTTCTCGCACAA
GAGATATTACCTAATTTTAAAATGAGAAAACACCAATTTTTGTTGCAGG
TGGAATAGGAAGAGGCGAAATGATAGTGAACCTACCTAGAGATGGGAGCAA
GTGGCTGTCAAATAGGTACATTATTTGTCTGCACAAATGAGTCAGTCGCC
CATAAAAATTTTAAAGAAGTATTCATCAAATCAGCTGCGCGTAATGCTGT
ATCTTCTGTGCAGATCAGCGCTGATTTCCCTGTAATTCAGTAAGGGCTA
TAGCTAACAAAGCAAGTGACGATTTTATGAAGCATCAAAGAGATATTATC
GATAAATATCAAATGGAGAAATCTCAAAGAAGAGGGGCAACTTGAAT

AGAAAAGTTCTGGGCTGGAGC

>301FR_CONS_JN-016

GAGACACAGAAATTAACAAACCATTTGGTGTAACCTAATTACTAT
GCACCCAAAGTTGAGTGAGTTGATAGATGTGTGCATTGAAACGAAAGTAA
GCCATATAGTGCTTGCCGGTGGACTACCAACAAAGCCTAATATAGAAAA
ATCAAGAGTGCGGGCATTAAAGTTATATGCTTTGCGCCAGCATTAAAGCCT
TGCGAAAAGGTTAGTAAACATGGGAGTAGATGCGTTAATAATAGAAGGAA
TGGAAGCAGGAGGACATATCGGTCCTGTTAGCACTTCTGTTCTCGCACAA
GAGATATTACCTAATTTTAAAAATGAGAAAACACCAATTTTTGTTGCAGG
TGGAATAGGAAGAGGCGAAATGATAGTGAACCTACCTAGAGATGGGAGCAA
GTGGCTGTCAAATAGGTACATTATTTGTCTGCACAAATGAGTCAGTCGCC
CATAAAAATTTTAAAGAAGTATTCATCAAATCAGCTGCGCGTAATGCTGT
ATCTTCTGTGCAGATCAGCGCTGATTTCCCTGTAATTCCAGTAAGGGCTA
TAGCTAACAAAGCAAGTGACGATTTTATGAAGCATCAAAGAGATATTATC
GATAAATATCAAATGGAGAAATCTCAAAGAAGAGGGGCAACTTGAAT
AGAAAAGTTCTGGGCTGGAGC

>297FR_CONS_JN-015

GAGACACAGAAATTAACAAACCATTTGGTGTAACCTAATTACTAT
GCACCCAAAGTTGAGTGAGTTGATAGATGTGTGCATTGAAACGAAAGTAA
GCCATATAGTGCTTGCCGGTGGACTACCAACAAAGCCTAATATAGAAAA
ATCAAGAGTGCGGGCATTAAAGTTATATGCTTTGCGCCAGCATTAAAGCCT
TGCGAAAAGGTTAGTAAACATGGGAGTAGATGCGTTAATAATAGAAGGAA
TGGAAGCAGGAGGACATATCGGTCCTGTTAGCACTTCTGTTCTCGCACAA
GAGATATTACCTAATTTTAAAAATGAGAAAACACCAATTTTTGTTGCAGG
TGGAATAGGAAGAGGCGAAATGATAGTGAACCTACCTAGAGATGGGAGCAA
GTGGCTGTCAAATAGGTACATTATTTGTCTGCACAAATGAGTCAGTCGCC
CATAAAAATTTTAAAGAAGTATTCATCAAATCAGCTGCGCGTAATGCTGT
ATCTTCTGTGCAGATCAGCGCTGATTTCCCTGTAATTCCAGTAAGGGCTA
TAGCTAACAAAGCAAGTGACGATTTTATGAAGCATCAAAGAGATATTATC
GATAAATATCAAATGGAGAAATCTCAAAGAAGAGGGGCAACTTGAAT
AGAAAAGTTCTGGGCTGGAGC

ftsZ

>297FR_JN-029_CONS

AAAGAAAAAAGATACTGACTGTTGGAGTTGTAACCTAAGCCGTTCCGGTTT
TGAAGGTGTGCGACGTATGCGCATTGCAGAACTTGGACTTGAAGAGTTGC

AAAATACGTAGATACACTTATTGTCATTCCCAATCAAATTTATTTAGA
ATTGCTAATGAGAAAACACTACATTTGCTGACGCATTTCAACTCGCCGATAA
TGTTCTGCATATTGGCATAAGAGGAGTAACTGATCTGATGGTTATGCCAG
GGCTTATTAACCTTGATTTTGGCTGATATAGAAACAGTAATGAGTGAGATG
GGTAAAACNNTGATTGGTNNTGGAGAGGCAGAAAGAGA

wd0183

>313FR_CONS_WD_0183_JN011

CCTGTTGGACTAAATTTGTTTAAAATACATCACCTTCTTCTAAAGTAAG
TAATTTCTTTTTCCATTCTGTAGAAATCGGACTTTCTTTTGTAAAAGTG
GACGAGTGCCAAACTGAAAAGCTATTGGTCCGATTTGTAAATTGTCAAAC
CAATGTTCCCAATCCTTCAAATGCCATACTCCCCCTGCCATAACAATTGG
CGTTTCAGTAAGACCAATCTCATTGAAAGATCTAAGCTCTGCAACTC
TTTCAAATGGAGCCTGCGGTAATTCTGGGTCTTCACTATTACTCAAGCCA
TTGTGACCACCAGCAAGCCACGGATCCTCATATACTACTCCACCAAGTAA
AAAAGAAGATATTTTTTGGTAAGCACGTTTCCACAACGCTTTAAAAGCGC
GCGCCGATGAGATAATAGGGTAGTAATAAACTTGATATTTAGCTGCAATT
TCTCCAAACCTGTAAGGCATACCAGCACCGCAAGTGATGCCATGAACTAA
GCC

>293FR_CONS_WD_0183_JN006

CCTGTTGGACTAAATTTGTTTAAAATACATCACCTTCTTCTAAAGTAAG
TAATTTCTTTTTCCATTCTGTAGAAATCGGACTTTCTTTTGTAAAAGTG
GACGAGTGCCAAACTGAAAAGCTATTGGTCCGATTTGTAAATTGTCAAAC
CAATGTTCCCAATCCTTCAAATGCCATACTCCCCCTGCCATAACAATTGG
CGTTTCAGTAAGACCAATCTCATTGAAAGATCTAAGCTCTGCAACTC
TTTCAAATGGAGCCTGCGGTAATTCTGGGTCTTCACTATTACTCAAGCCA
TTGTGACCACCAGCAAGCCACGGATCCTCATATACTACTCCACCAAGTAA
AAAAGAAGATATTTTTTGGTAAGCACGTTTCCACAACGCTTTAAAAGCGC
GCGCCGATGAGATAATAGGGTAGTAATAAACTTGATATTTAGCTGCAATT
TCTCCAAGCCTGTAAGGCATACCAGCACCGCAAGTGATGCCATGAACTAA
GCC

>331FR_CONS_WD_0183_JN012

CCTGTTGGACTAAATTTGTTTAAAATACATCACCTTCTTCTAAAGTAAG
TAATTTCTTTTTCCATTCTGTAGAAATCGGACTTTCTTTTGTAAAAGTG
GACGAGTGCCAAACTGAAAAGCTATTGGTCCGATTTGTAAATTGTCAAAC
CAATGTTCCCAATCCTTCAAATGCCATACTCCCCCTGCCATAACGATTGG

CGTTTCAGTAAGACCAATCTCATTTCATGAAAGATCTAAGCTCTGCAACTC
 TTTCAAATGGAGCCTGCGGTAATTCTGGGTCTTCNCTATTACTCAAGCCA
 TTGTGACCACCAGCANGCCNCGGATCCTCANANACTACTCCACCANGTAA
 AAAAGAAGATATTTTTGGTAAGCACGTTTCCACAACGCTTTAAAAGCGC
 GCGCCGATGAGATAATAGGGTAGTAATAAACTTGATATTTAGCTGCAATT
 TCTCCAAGCCTGTAAGGCATACCAGCACCGCAAGTGATGCCATGAACTAA
 GCC

8.8. ANEXO 8

Tabela 4. Indivíduos utilizados para formação de grupo externo nas análises de Máxima Verossimilhança.

| Referência* | Número de Acesso | Fragmento | Organismo hospedeiro |
|-------------|------------------|-------------------|-----------------------------------|
| CP051157 | CP051157.1 | (995603-996071) | <i>Ctenocephalides felis</i> |
| CP046579 | CP046579.1 | (523629-524097) | <i>Cruorifilaria tubero cauda</i> |
| NC_018267 | HE660029.1 | (506084-506552) | <i>Onchocerca ochengi</i> |
| NZ_HG810405 | HG810405.1 | (142268-142736) | <i>Onchocerca volvulus</i> |
| CP021120 | CP021120.1 | (949502-949970) | <i>Chrysomya megacephala</i> |
| CP034335 | CP034335.1 | (744609-745077) | <i>Drosophila mauritiana</i> |
| NZ_CP050521 | CP050521.1 | (455931-456399) | <i>Brugia pahangi</i> |
| CP003883 | CP034335.1 | (744609-745077) | <i>Drosophila simulans</i> |
| AM999887 | AM999887.1 | (78440-78908) | <i>Culex quinquefasciatus</i> |
| NC_006833 | CP034333.1 | (818476-818944) | <i>Brugia malayi</i> |
| CP001391 | CP037426.1 | (583095-583563) | <i>Wolbachia pipientis</i> |
| AP013028 | AP013028.1 | (461484-461952) | <i>Cimex lectularius</i> |
| CP031221 | CP041924.1 | (781237-781705) | <i>Wolbachia pipientis</i> |
| CP015510 | CP015510.2 | (82947-83415) | <i>Folsomia candida</i> |
| CP046577 | CP046577.1 | (459086-459554) | <i>Litomosoides sigmodontis</i> |
| .CP046578 | CP046578.1 | (450834-451302) | <i>Dirofilaria immitis</i> |
| CP046580 | CP046580.1 | (536668-537136) | <i>Dipetalonema caudispina</i> |
| CP042445 | CP042445.1 | (281290-281758) | <i>Wolbachia pipientis</i> |
| CP011148 | CP042445.1 | (281290-281758) | <i>Wolbachia pipientis</i> |
| LK055284 | LK055284.1 | (312956-313424) | <i>Drosophila simulans</i> |
| CP003884 | CP054598.1 | (894599-895067) | <i>Ceratosolen solmsi</i> |
| CP016430 | CP016430.1 | (41059-41527) | <i>Bemisia tabaci</i> |
| CP041215 | CP041215.1 | (789063-789531) | <i>Carposina sasakii</i> |
| CP051156 | CP051156.1 | (1337849-1338315) | <i>Ctenocephalides felis</i> |
| FN563974 | FN563974.1 | (1-1030) | <i>Simulium squamosum</i> |
| KJ631375 | KJ631375.1 | (1-521) | <i>Mansonela perstans</i> |
| KU255359 | KU255359.1 | (1-521) | <i>Mansonela ozzardi</i> |
| KU255360 | KU255360.1 | (1-521) | <i>Mansonela perforata</i> |

*Número de referência para acesso ao Genbank

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, MMC.; Py-Daniel, V.; Luz, SLB.; Fraji, NA.; Stefani, MMA. (2018) Detection of *Mansonella ozzardi* among blood donors from highly endemic interior cities of Amazonas state, northern Brazil. Original Research: The Journal of AAB Transfusion.

Adler, Peter H.; Mccreadie, John W.. Black Flies (Simuliidae). Medical And Veterinary Entomology, S.I., p. 237-259, 2019.

Albuquerque, AL. Diversidade genética de *Wolbachia pipientis* em populações de culicídeos vetores e no parasito *wuchereria bancrofti*. Tese. Fiocruz 2011.

Bain, O., Uni, S., Takaoka, H., 2002. A Synthetic Look at a Twenty Years Old Taxon, *Cercopithifilaria*; Its Probable Evolution. MEDIMOND 365–368.

Basano, SD; Fontes, G; Medeiros, JF; Camargo, JSA; Vera, LJS; Araújo, MPP; Parente, MSP; Mattos, FRG; Barreto, PDC. (2014) Sustained clearance of *Mansonella ozzardi* infection after treatment with ivermectin in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med.

Bakowski et al., Advances in Antiwolbachial Drug Discovery for Treatment of Parasitic Filarial Worm Infections. Tropical medicine and infectious disease, USA, 2019, 4, 108; doi:10.3390/tropicalmed4030108.

Baldwin, w. f.; west, a. s.; Gomery, john. Dispersal pattern of black flies (diptera: simuliidae) tagged with 32p. The canadian entomologist, ottawa, v. 102, n. 2, p. 113-118, fev. 1975.

Bordenstein Seth R. et al. Parasitism and mutualism in *wolbachia* what the phylogenomic trees can and cannot say_BIOMOL RV_2009.

Bowman, DD. Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia* and *Anaplasma*. Topical Review, 2011.

- Butler, J. F.; Hogsette, J. A. Black flies, *Simulium* spp. (Insecta: Diptera: Simuliidae). 1998.
- Crainey, J. L.; Medeiros, J. F.; Pessoa, F. A. C.; Luz, S. L. B. Arthropod-borne Diseases. Chapter 25: Onchocerciasis. p. 383-404. 2017.
- Crainey, J. L., Costa, C. H. A., de Oliveira Leles, L. F., Ribeiro da Silva, T. R., de Aquino Narzetti, L. H., Serra dos Santos, Y. V., Bessa Luz, S. L. (2020). Deep-sequencing reveals occult mansonellosis co-infections in residents from the Brazilian Amazon village of São Gabriel da Cachoeira. *Clinical Infectious Diseases*.
- Coscarón, S. and C. L. Coscarón-Arias. 2007. Neotropical Simuliidae (Diptera: Insecta). In J. Adis, J. R. Arias, G. Rueda-Delgado, and K. M. Wantzen, eds. *Aquatic Biodiversity in Latin America*, Vol. 3. Pensoft, Sofia, Bulgaria. 685 pp.
- Crainey J. L.; Wilson M. D.; Post R. J. Phylogenetically distinct *Wolbachia* gene and pseudogene sequences obtained from the African onchocerciasis vector *Simulium squamosum*. *International Journal for Parasitology* doi:10.1016/j.ijpara.2009.10.017. 2010.
- Dumler, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2001), 51, 2145–2165.
- Dutra H. L. et al. *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016 Jun 8;19(6):771-4.
- Ferreira, M. U., Crainey, J. L., & Luz, S. L. B. (2020). *Mansonella ozzardi*. *Trends in Parasitology*.
- Figueiredo S. G. et al., *Reação de sequenciamento de DNA e purificação – Protocolos otimizados*. Circular técnica. Brasília, 2003.

Floch, h. & Abonnenc, E. Simulidés de la Guyane Française (II) *S. cauchense* n. sp., *S. oyapockense* n.sp., *S. iracouboense* n. sp. Publ. Inst. Pasteur Guyane, 137:1-19, 1946.

Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.

Gesto J. S. M. et. al., Large-Scale Deployment and Establishment of *Wolbachia* Into the *Aedes aegypti* Population in Rio de Janeiro, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 2021.

Gomes, F. M., Hixson, B. L., Tyner, M. D. W., Ramirez, J. L., Canepa, G. E., Alves e Silva, T. L., Barillas-Mury, C. (2017). Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(47), 12566–12571.

Guégan et al. The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*, 2018, 6:49.

Hoerauf A, Rao RU (eds): *Wolbachia*. *Issues Infect Dis*. Basel, Karger, 2007, vol 5, pp I-VIII.

Hunter, D. Bruce; Rohner, C.; Currie, D. C.. Mortality in fledgling great horned owls from black fly hematophaga and leucocytozoonosis. *Journal Of Wildlife Diseases*, S.I., v. 33, n. 3, p. 486-491, jul. 1997.

Lane, Richard P.; Crosskey, Roger W. *Medical insects and arachnids*. London: Chapman & Hall, 1993.

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

Lefoulon, E. et al., Pseudoscorpion Wolbachia symbionts. diversity and evidence for a new supergroup S. BMC Microbiology_2020

Lima, NF; Veggiani Aybar, CA; Dantur Juri,MJ; Ferreira, MU . Mansonella ozzardi: a neglected New World filarial nematode. Pathog Glob Health,110(3):97-107, 2016.

Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., ... Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(6), 3140–3145

Magurram, A.E. 2004. Measuring biological diversity. Blackwell, Oxford, p. 256.

Sabat AJ, et al. Visão geral dos métodos de tipagem molecular para detecção de surtos e vigilância epidemiológica. Euro Surveill. 18: 20380.

McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W. C., Sidhu, M., Wang, Y.-F., & O'Neill, S. L. (2009). Stable Introduction of a Life-Shortening Wolbachia Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. Science, 323(5910), 141–144.

Medeiros, JF et al., Mansonella ozzardi in Brazil, prevalence of infection in riverine communities in the purus region_ Mem Inst Oswaldo Crus, 2009

Medeiros JF, Crainey JL, Pessoa FAC, Luz, SLB. Mansonelliasis In: Arthropod borne disease. Ed. Springer, c. 26 p.405, In press, 2017.

Medeiros JF, Almeida TA, Silva LB. (2015) A field trial of a PCR-based Mansonella ozzardi diagnosis assay detects high-levels of submicroscopic M. ozzardi infections in both venous blood samples and FTA card dried blood spots. Parasit Vectors 8:1–8

Meyers WM, Moris R, Neafi e RC et al (1978) Streptocerciasis: degeneration of adult Dipetalonema streptocerca in man following diethylcarbamazine therapy. Am J Trop Med Hyg 27:1137–1147

Morales-Hojas R (2009) Molecular systematics of filarial parasites, with an emphasis on groups of medical and veterinary importance, and its relevance for epidemiology. *Infect Genet Evol* 9:748–759.

Moreira LA, et. al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*. 2009

OMS. WHO | World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. Disponível em: < <https://www.who.int/news/item/16-08-2021-neglected-tropical-diseases-enhancing-safe-treatment-for-more-than-1-billion-people-annually>>. Acesso em: 20 de agosto 2021.

Orihel TC, Eberhard ML (1998) Zoonotic filariasis. *ClinMicrobiol Rev* 11:366–381

Paige J. A. et. al., Comparison of classical multi-locus sequence typing software for next-generation sequencing data. *Microbial Genomics* 2017;3.

Platt, R.W. 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*, 43: 58–62.

Romão RST, Crainey JL, Costa Pessoa FA, Vinicius Serrados Santos Y, Pereira Silva JW, Ferreira de Oliveira Leles L, et al. (2019) Blackflies in theointment: *O.volvulus* vector biting can be significantly reduced by the skin application of mineral oil during human landing catches. *PLoS Negl Trop Dis*13(4): e0007234.

Romão RST et. al. 2021. Molecular Detection of *Mansonella mariae* incriminates *Simulium oyapockense* as a potentially important bridge vector for Amazon-region zoonoses. *Infection, Genetics and Evolution*.

Sambrook, J.; Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor, Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Shelley AJ, Coscarón S (2001) Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and ceratopogonid midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in northern Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz.

Shelley AJ, Shelley AJ, Lowry CA, Maia-Herzog M, Dias APAL, Moraes MAP. Biosystematic studies on the Simuliidae (Diptera) of the Amazonia onchocerciasis focus. Bull Natl History Museum Entomol Ser. 1997;66:1–121.

Shelley, A.J.; Hernández, L.M.; Maia-Herzog, M.; Luna Dias, A. P. A.; Garritano, P.R. 2010. The Blackflies of Brazil (Diptera, Simuliidae). In: “Aquatic Biodiversity in Latin America (ABLA Series)”, Eds. Adis, J.; Arias, J.; Golovatch, S.; Mantzev, K.M.; Rueda-Delgado, G.; Domínguez, E. Pensoft, Bulgaria, 6: 814 p.

Silva, LBT et al. Molecular Verification of New World *Mansonella perstans* Parasitemias. Emerging Infectious Diseases, 2017.

Simonsen, Paul E.; ONAPA, Ambrose W.; ASIO, Santa Maria. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. Acta Tropica, v. 120, n. SUPPL. 1, 2011.

Smith, Roger N.; CAIN, Steven L.; Anderson, Stanley H.; Dunk, Jeffrey R.; Williams, Elizabeth S.. Blackfly-induced mortality of nestling red-tailed hawks. The Auk, S.I., v. 115, n. 2, p. 368-375, abr. 1998

Tang, THT et al., Mansonellosis: current perspectives. Research and reports in Tropical Medicine. 2018. 9-24.

Taylor, M. J., Bandi, C., & Hoerauf, A. (2005). *Wolbachia*. Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. Advances in Parasitology, 245–284.

Tang, THT et al. Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 105(6): 823-828, September 2010.

Tang THT et al., An Overview of the Management of Mansonellosis. Research and reports in tropical medicine. 2021.

Tortora, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12ed. Porto Alegre, Artmed, p.297. 2017.

Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP. Immune activation by life-shortening Wolbachia and reduced filarial competence in mosquitoes. Science. 2009 Oct 2;326(5949):134-6.

Kambris Z, et al. Wolbachia stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in Anopheles gambiae. PLoS Pathog. 2010 Oct 7;6(10):e1001143.

Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). Wolbachia master manipulators of invertebrate biology. Nature Reviews Microbiology, 6(10), 741–751.