



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
Fiocruz Amazônia

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

LORENA FERREIRA DE OLIVEIRA LELES

Avaliação da Diversidade Genética Populacional e Prevalência de Infecção por
***Wolbachia* em *Mansonella ozzardi* no Estado do Amazonas, Brasil**

Manaus - AM

2019

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

LORENA FERREIRA DE OLIVEIRA LELES

Avaliação da Diversidade Genética Populacional e Prevalência de Infecção por
***Wolbachia* em *Mansonella ozzardi* no Estado do Amazonas, Brasil**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, do Instituto Leônidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ – AM, como requisito parcial e obrigatório para a 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: Dr. James Lee Crainey

Manaus - AM

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

L539a

Leles, Lorena Ferreira de Oliveira.

Avaliação da diversidade genética populacional e prevalência de infecção por *Wolbachia* em *Mansonella ozzardi* no estado do Amazonas, Brasil. / Lorena Ferreira de Oliveira Leles. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

64 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof^o. Dr. James Lee Crainey.

1. Mansonelose 2. *Mansonella ozzardi* 3. *Mansonella perstans*
4. *Wolbachia* I. Título

CDU 616.995312 (811.3) (043.3)

CDD 616.9652098113 22. ed

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

LORENA FERREIRA DE OLIVEIRA LELES

**Avaliação da Diversidade Genética Populacional e Prevalência de Infecção por
Wolbachia em *Mansonella ozzardi* no Estado do Amazonas, Brasil**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno Hospedeiro, do Instituto Leônidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ – AM, como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

Defesa em: 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr. James Lee Crainey - Orientador

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Dra. Ana Carolina Paulo Vicente – Membro Interno

Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho – Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

**Dedico este projeto aos meus familiares conexão RJ-UDI,
dentre os que puderam acompanhar o
seu desenvolvimento neste,
ou em outro plano espiritual.
Vocês são magníficos!**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a toda minha família, principalmente aos meus dois pais William Leles e Wilson Mendes, por terem acreditado em mim desde sempre e graduação respectivamente, quando outros não tiveram tanta fé em minhas escolhas. A minha mãe, Cristiane Leles, que sempre esteve à frente de minha educação, e onde encontrei conforto, colo e conselhos. Ao meu bem, Gabriel Alves, que esteve presente em todas crises e dificuldades quando achei que não conseguiria chegar até aqui. Obrigada a todos, caso contrário, não teria chegado e jamais teria imaginado onde sou capaz de chegar.

Ao meu orientador Dr. James Lee Crainey por confiar este projeto a mim, bem como acreditar em minha capacidade e competência de finalizá-lo, dando-me também a oportunidade de aprendizado e capacitação profissional imensuráveis nessa caminhada de orientação. Pela confiança e ensinamentos, de coração: muito obrigada!

Ao Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz, que como já diz o nome, foi luz em todas as reuniões mensais para que o foco do projeto fosse mantido e os prazos cumpridos. Obrigada por todo conhecimento, e pelo carinho e atenção com que fui recebida ao ingressar em seu grupo de pesquisa.

Aos meus colegas de trabalho e equipe de laboratório, Yago Vinícius e Túllio Romão, pela colaboração e auxílio em tudo que precisei, desde onde os reagentes se encontravam até a parte escrita final. Sem eles, as idas ao Roma e conversas diárias no laboratório não teriam graça. Agradeço também a Fernanda Freitas, responsável pela realização do sequenciamento de todo nosso material.

Agradeço ao Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ/ILMD), as funcionárias da Secretária Acadêmica (SECAD/POSGRAD-ILMD) a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo auxílio e pela concessão da bolsa de estudos, respectivamente, bem como ao PPGBio-Interação pela capacitação e desenvolvimento profissional no decorrer desses 24 meses.

A todas as mulheres com quem pude cruzar pelo caminho, que me mostraram que mesmo com todas as dificuldades, é possível se fazer voz necessária no meio em que estamos. Em especial, Dra. Ana Carolina Paulo Vicente, que com certeza nos fez manter o foco em meio a tantas padronizações e sequenciamentos. Enfim, Girl Power!

Aos meus amigos Antônio Vinícius, Beatriz Coelho, Cayo César e Fran Costa que conversaram comigo por horas a fio durante as madrugadas em que achei que nada fosse dar certo. As minhas amigas do grupo de dança Arnaldo Peduto e a própria dança, que foi minha válvula de escape nos momentos necessários (afinal todos precisamos de uma) ainda mais depois de tanto escrever. Vocês me salvaram!

E por fim, aos meus colegas de turma da pós-graduação, que querendo ou não, acabaram se tornando meus irmãos durante esses dois anos. Nós conseguimos! Os cafés, sorvetes e viagens vão deixar saudades.

Aos que eu não tenha percebido, que também não tenham percebido ou que não mencionei aqui e que fizeram parte de alguma forma desta trajetória, meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Um homem não me define, minha casa não me define,
minha carne não me define: Eu sou meu próprio lar.”

- Francisco, El Hombre

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Microfilárias de <i>Mansonella ozzardi</i> (a), <i>Mansonella perstans</i> (b) e <i>Mansonella streptocerca</i> (c). | 18 |
| Figura 2 – Ciclo de Transmissão de <i>Mansonella ozzardi</i> | 20 |
| Figura 3 – Microscopia eletrônica de célula de <i>Aedes albopictus</i> infectada com <i>Wolbachia</i> | 24 |
| Figura 4 – Árvore filogenética baseada na concatenação de sete genes, evidenciado os supergrupos de <i>Wolbachia</i> descritos até a presente data. Em destaque o supergrupo F, contemplando artrópodes e parasitos filariais | 28 |
| Figura 5 – Imagem via satélite do município de São Gabriel da Cachoeira | 31 |
| Figura 6 – Teste de diluições de DNA-estoque para detecção de <i>Wolbachia</i> pelo alvo FTSZ | 32 |
| Figura 7. Árvores representativas de distância construídas com metodologia de <i>Maximum likelihood</i> (ML) implementada pelo programa MEGA utilizando 1000 replicatas/pseudoárvores para os 14 alvos de <i>MLST</i> de <i>Wolbachia</i> | 43 |
| Figura 8. Árvores representativas de distância, montadas conforme descrito anteriormente, referentes a ITS1(A), 12S(B) e COI(C), para identificação de possíveis espécies representante do gênero <i>Mansonella</i> | 51 |
| Figura 9. Árvores representativas de distância, montadas conforme descrito anteriormente, referentes a 16S(A), FTSZ(B), GLTA(C) e GROEL (D) para identificação de <i>Wolbachia</i> que infecta parasitos do gênero <i>Mansonella</i> | 53 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Primers e Protocolos de PCR testados para detecção e análise de diversidade do parasito <i>Mansonella</i> spp. | 34 |
| Tabela 2 – Primers e Protocolos de PCR MLST testados para detecção e análise de diversidade de <i>Wolbachia</i> | 37 |
| Tabela 3 – Primers e protocolos para PCR de elementos transponíveis testados para detecção de alta sensibilidade para <i>Wolbachia</i> | 39 |
| Tabela 4 – Primers e protocolos para PCR de fagos testados para análise a nível populacional de diversidade de <i>Wolbachia</i> | 40 |
| Tabela 5 – <i>MLST</i> Clássico baseado na detecção de <i>Wolbachia</i> em amostras clínicas positivas provenientes de São Gabriel do Cachoeira | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DOX – Doxiciclina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio Enzimático Imunoabsorvente (do inglês “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*”)

ET – Elemento Transponível

GE – Gota Espessa

IVM – Ivermectina

MFs – Microfilárias

nBLAST – Ferramenta de Alinhamento Local de Nucleotídeos (do inglês “*Nucleotide Basic Local Aligment Search Tool*”)

NGS – Sequenciamento de nova geração (do inglês “*Next Generation Sequencing*”)

Pb – Pares de Bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”)

qPCR – PCR em Tempo Real (do inglês “*Quantitative Polymerase Chain Reaction*”)

SGC – São Gabriel da Cachoeira

SNP – Polimorfismo de Único Nucleotídeo (do inglês “*Single Nucleotide Polymorphism*”)

RESUMO

Embora a gravidade da mansonelose ainda não esteja bem caracterizada, a ampla prevalência da doença e sua importância para a saúde pública na Amazônia brasileira estão se tornando cada vez mais aparentes. Em São Gabriel da Cachoeira, o tratamento padrão com ivermectina é ineficaz porque a doença é causada tanto por *M. ozzardi* quanto por *M. perstans*. Ao contrário de todos os demais parasitas filariais humanos infectados com *Wolbachia*, os quais são tratados efetivamente com terapêuticas tendo como alvo a bactéria, as cepas detectadas infectando parasitos do gênero *Mansonella* pertencem ao supergrupo F, sendo as cepas relacionadas a este supergrupo nem sempre necessárias para a sobrevivência dos seus hospedeiros. Como uma investigação preliminar sobre a viabilidade do uso do tratamento anti-*Wolbachia* na Amazônia brasileira, este trabalho validou sete novos ensaios de PCR para detecção de *Mansonella* spp. (*ITS1*, *12S*, *COI*, *mtVR1*, *mtVR3*, *hsp70* e *myoHC*) e 18 novos ensaios de detecção por PCR para *Wolbachia* (*AspC*, *AspS*, *CoxA*, *SucB*, *nadH*, *FabK*, *dnaA*, *HcpA*, *AtpD*, *NuoD*, *NuoG*, *sucB*, *MgChel*, *WD0183*, *WD0198*, *WD0237*, *WD0359* e *WD1005*). Testando cada um desses ensaios individualmente em amostras de sangue positivas para *Mansonella* spp. provenientes de 48 residentes de São Gabriel da Cachoeira, foi possível detectar >3 alvos do parasito *Mansonella* spp. e >5 alvos de *Wolbachia* em todas as amostras, além de evidências de que a quantidade de *Wolbachia* em MFs do gênero *Mansonella* pode ser variável. Análises filogenéticas utilizando sequências recuperadas de três alvos do parasito (*COI*, *12S*, *ITS1*) e sequências gênicas recuperadas para quatro alvos de *Wolbachia* (*16S*, *FtsZ*, *GroEL*, *GltA*) confirmaram a existência de ambos os parasitos *M. perstans* e *M. ozzardi* em São Gabriel da Cachoeira, revelando também a evidência de coinfeções por *M. perstans* e *M. ozzardi* em quatro amostras de sangue. Análises filogenéticas realizadas com todas as sequências-alvo de *Wolbachia* e duas das sequências-alvo do parasito (*12S* e *ITS1*) encontraram poucas evidências da diversidade de parasitos ou *Wolbachia*, entretanto, novos haplótipos mitocondriais de *M. perstans* foram identificados com base nas análises de *COI*. Nossos resultados sugerem que a terapêutica anti-*Wolbachia* pode ser um tratamento efetivo para *Mansonella* spp. em São Gabriel da Cachoeira, porém mais pesquisas são necessárias para confirmar se todos os parasitos de *M. perstans* na área em questão (como por exemplo, as amostras com diferentes haplótipos mitocondriais) são infectados com *Wolbachia* e, portanto, se todas as infecções por mansonelose podem vir a ser tratadas por meio dessas abordagens anti-*Wolbachia*.

Palavras-chave: *Mansonella ozzardi*, *Mansonella perstans*, *Wolbachia*, Diversidade, Prevalência

ABSTRACT

While the disease burden of mansonellosis is still not well-characterised, the disease's wide prevalence and public health importance to the Brazilian Amazon region is becoming increasingly apparent. In Sao Gabriel da Cachoeira the standard Brazilian Amazon region ivermectin treatment for mansonellosis is ineffective because the disease is caused by both *M. perstans* and *M. ozzardi*. Unlike all other human filarial parasites that are infected with *Wolbachia*, which have been effectively treated with therapeutics that target their *Wolbachia*, the *Wolbachia* strains that have been detected infecting *Mansonella* parasites belong to a strain of super clade F – a strain that is not always required for its host's survival. As a preliminary investigation into the viability of using anti-*Wolbachia* treatment in the Brazilian Amazon, this work has validated seven novel *Mansonella* parasite detecting (*ITS1*, *12S*, *COI*, *mtVR1*, *mtVR3*, *hsp70* e *myoHC*) and 18 novel *Wolbachia* detecting PCR assays (*AspC*, *AspS*, *CoxA*, *SucB*, *nadH*, *FabK*, *dnaA*, *HcpA*, *AtpD*, *NuoD*, *NuoG*, *sucB*, *MgChel*, *WD0183*, *WD0198*, *WD0237*, *WD0359* e *WD1005*). Testing each of these assays individually on *Mansonella* positive blood samples taken from 48 Sao Gabriel to Cachoeira residents, we were able to detect >3 *Mansonella* parasite genes and >5 *Wolbachia* genes in every single sample and found evidence that the quantity of *Wolbachia* in *Mansonella* microfilariae could be variable. Phylogenetic analysis using three parasite DNA sequences (*COI*, *12S*, *ITS1*) and four *Wolbachia* gene sequences (*16S*, *FtsZ*, *GroEL*, *GltA*) confirmed the existence of both *M. perstans* and *M. ozzardi* parasites in Sao Gabriel to Cachoeira and revealed evidence of *M. perstans* and *M. ozzardi* coinfections in four blood samples. Phylogenetic analysis performed with all of the *Wolbachia* gene sequences and two of the parasite gene sequences (*12S* and *ITS1*) found very little evidence of parasite or *Wolbachia* diversity, however, novel *M. perstans* mitochondrial haplotypes were uncovered with our *COI* analysis. Our results suggest that anti-*Wolbachia* therapeutics could be a useful *Mansonella* treatment in Sao Gabriel da Cachoeira, but more research is needed to confirm that all *M. perstans* parasites in the area (i.e those with both mitochondrial haplotypes) and beyond are infected with *Wolbachia* and thus if all mansonellosis infections might be effectively treated with anti-*Wolbachia* therapeutics.

Keywords: *Mansonella ozzardi*, *Mansonella* spp., *Wolbachia*, Diversity, Prevalence

SUMÁRIO

| | | |
|------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 18 |
| 2.1. | Mansonelose: Distribuição e Epidemiologia..... | 18 |
| 2.2. | Mansonelose: Ciclo de Transmissão | 21 |
| 2.3. | Mansonelose: Diagnóstico | 22 |
| 2.4. | Mansonelose: Tratamento | 23 |
| 2.5. | <i>Wolbachia</i> Endossimbionte..... | 24 |
| 2.6. | Identificação e Diagnóstico de <i>Wolbachia</i> | 26 |
| 2.7. | Relação <i>Wolbachia</i> – Filárias: Prevalência..... | 27 |
| 2.8. | Relação <i>Wolbachia</i> – Filárias: Diversidade | 28 |
| 3. | JUSTIFICATIVA..... | 30 |
| 4. | OBJETIVOS | 31 |
| 4.1. | Objetivo Geral..... | 31 |
| 4.2. | Objetivos Específicos..... | 31 |
| 5. | METODOLOGIA | 32 |
| 5.1. | Área de Estudo e Aspectos Éticos e Legais da Pesquisa..... | 32 |
| 5.2. | Preparação de DNA-estoque Positivo para <i>Mansonella</i> spp. Utilizado em Experimentos de Otimização de PCR..... | 33 |
| 5.3. | Otimização de PCR para Detecção de Parasito do Gênero <i>Mansonella</i> | 33 |
| 5.4. | Técnicas de Otimização e Validação Inicial de PCR | 36 |
| 5.5. | Otimização de Protocolos de PCR para Alvos Baseados em <i>MLST</i> para Detecção e Análise de Diversidade de <i>Wolbachia</i> | 36 |
| 5.6. | Otimização de Protocolos de PCR para Elementos Transponíveis (ETs) de <i>Wolbachia</i> Testados para Detecção de Alta Sensibilidade..... | 40 |
| 5.7. | Otimização de Protocolos de PCR para Fagos de <i>Wolbachia</i> (WO) para Análise de Diversidade Populacional | 40 |
| 5.8. | Análise de Prevalência de Infecção e Diversidade Genética de <i>Wolbachia</i> | 41 |
| 6. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 6.1. | Desenvolvimento de novas ferramentas para detecção e classificação de parasitemia por <i>Mansonella</i> spp. | 42 |
| 6.2. | Desenvolvimento de novas ferramentas para detecção e classificação de infecções por <i>Wolbachia</i> em parasitemias de <i>Mansonella</i> spp..... | 43 |
| 6.3. | Desenvolvimento de novas ferramentas para detecção de alta sensibilidade (ETs) e análise de diversidade populacional (fagos) de infecções por <i>Wolbachia</i> em parasitemias de <i>Mansonella</i> spp..... | 45 |
| 6.4. | Prevalência de <i>Wolbachia</i> entre as amostras clínicas dos parasitos do gênero <i>Mansonella</i> recuperados de moradores de São Gabriel da Cachoeira..... | 46 |
| 6.5. | Parasitos do gênero <i>Mansonella</i> e diversidade de <i>Wolbachia</i> entre as amostras clínicas de sangue recuperadas de 48 residentes de São Gabriel da Cachoeira..... | 49 |

| | | |
|------|---|----|
| 6.6. | Perspectivas sobre o uso de terapias de tratamento anti- <i>Wolbachia</i> em São Gabriel da Cachoeira | 55 |
| 7. | CONCLUSÕES..... | 56 |
| 8. | MATERIAL SUPLEMENTAR | 57 |
| 8.1. | ANEXO 1 - Esquema básico de ciclagem da reação em cadeia da polimerase (PCR) 57 | |
| 9. | CRONOGRAMA DE ATIVIDADES (2017/2019)..... | 59 |
| 10. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |

1. INTRODUÇÃO

Mansonella perstans e *Mansonella ozzardi* são parasitos filariais humanos com uma ampla distribuição global. Infecções causadas por estes parasitos estão entre as parasitemias humanas mais comuns do planeta, com uma estimativa de mais de 115 milhões de africanos infectados apenas com *M. perstans*. Na região da Amazônia brasileira, *Mansonella perstans* tem uma distribuição bastante restrita ao norte do Estado do Amazonas. Porém *Mansonella ozzardi*, que não ocorre na África, é dito atualmente como parasito filarial mais comum na Amazônia, e encontra-se amplamente distribuído em toda a América Latina, com registros desde o México até a Argentina (Tang et al., 2018; Medeiros et al., 2017; Lima et al., 2016; Silva et al., 2016).

Embora não se tenham estudos suficientes atribuídos aos riscos causados especificamente pelas doenças transmitidas por *M. ozzardi*, pesquisadores brasileiros já iniciaram um programa de controle dessas parasitemias causadas por ambas espécies de *Mansonella* na região amazônica (Medeiros et al., 2017; Basano et al., 2014). Atualmente, estas pesquisas têm como alvo o parasito *M. ozzardi* utilizando em seu tratamento a droga ivermectina (IVM), que também é utilizada por programas de eliminação de outras filariose na Região Africana, como a filariose linfática e a oncocercose (Grillet et al., 2019; Crainey et al., 2017A; Basano et al. 2018). A recente descoberta e verificação molecular de *M. perstans* na Região Norte da Amazônia brasileira, entretanto, chama atenção para a abordagem em questão, visto que a IVM é conhecida por ter pouco ou nenhum efeito sobre este parasito em específico além do tratamento administrado ser de longa duração, em torno de 24-36 meses (Crainey et al., 2017A; Tang et al. 2018; Silva et al., 2017).

Existem outras possibilidades de tratamentos que podem vir a ser utilizados em combinação com a IVM, porém o método de tratamento mais eficaz conhecido para *M. perstans* é baseado em um período de medicação de 4 semanas com o antibiótico doxiciclina (DOX), um tratamento que funciona por se direcionar e eliminar a bactéria endossimbionte *Wolbachia* presente em insetos e parasitos filarias (Medeiros et al., 2017; Coulibaly et al., 2009). Em contraste com a IVM e a maioria dos outros tratamentos conhecidos para estes tipos de infecções, onde apenas os estágios larvais dos parasitos (microfilárias) morrem e as drogas precisam ser readministradas a cada seis meses até

que o parasito adulto também venha ser eliminado; o tratamento com DOX mostrou maiores resultados indicando matar parasitos adultos e, portanto, curar os pacientes infectados com mais eficiência e rapidez (Tang et al, 2018; Crainey et al., 2017A; Coulibaly et al., 2009).

Como demonstrou-se em estudos recentes que *M. ozzardi* da Amazônia brasileira contém *Wolbachia*, há um grande potencial para que o governo brasileiro possa tratar populações infectadas com o parasito através de drogas-alvo que afetem diretamente a bactéria endossimbionte (como DOX, por exemplo) e que desta forma seja possível tratar os pacientes e controlar a parasitemia (Silva et al., 2016; Oliveira et al., 2015). Ainda que o tratamento com DOX em um período de 4 semanas sejam impraticáveis para programas de controle em larga escala, existe atualmente uma gama de fármacos anti-*Wolbachia* em desenvolvimento que podem vir a reduzir drasticamente o tempo de tratamento de 4 semanas para um ou dois dias. Tais terapias mostraram-se muito valiosas para futuros programas de controle ou eliminação de parasitos do gênero *Mansonella*, conforme já utilizado para outros parasitos filariais (Johnston et al., 2017; Clare et al., 2015; Johnston et al., 2014).

Esta técnica visando a depleção da *Wolbachia* endossimbionte tem sido de grande aposta em termos de investimento, pesquisa e política frente ao controle de parasitemias, proporcionando uma gama de estudos no que diz respeito a testes que vão de fármacos já presentes na indústria farmacêutica; a triagem, identificação e priorização de mais de 10.000 compostos que possam vir a ser capazes de agir diretamente na eliminação de *Wolbachia*, podendo conseqüentemente estabelecer o desenvolvimento de novos medicamentos e de novas propostas de tratamento (Johnston et al., 2017; Johnstons et al., 2014; Landmann et al., 2011). O uso desta metodologia se mostra viável pois a bactéria tem sido encontrada no tecido hipodermal dos adultos de ambos os sexos, aparelho reprodutivo das fêmeas adultas e em menor quantidade em microfilárias em desenvolvimento, persistindo ao longo de todos os estágios de vida dos parasitos, até a transferência do mosquito ao hospedeiro humano, comprovando através de diversos estudos que a bactéria possui grande influência no desenvolvimento tanto na fase que ocorre nos insetos vetores quanto nos hospedeiros humanos (Saridaki & Bourtzis, 2010; Casirahgi et al., 2005).

Antes que quaisquer desses fármacos terapêuticos anti-*Wolbachia* possam ser utilizados em programas brasileiros de controle ou eliminação, é importante a priori

esclarecer o papel da *Wolbachia* no desenvolvimento de *M. ozzardi* e *M. perstans* (Crainey et al., 2017A; Geringher et al, 2014). Além disso, existe uma grande diversidade de supergrupos de *Wolbachia* que vão de A-J, onde os indivíduos do gênero *Mansonella* são encontrados no supergrupo F, sendo este o único supergrupo que contempla artrópodes e parasitos filariais, sugerindo assim uma possível transferência lateral da bactéria entre estes indivíduos (Lefoulon et al, 2016). Os resultados de ensaios clínicos realizados em indivíduos infectados com *M. perstans* na África foram semelhantes aos obtidos a partir de estudos realizados com *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti*, indicando que a *Wolbachia* é necessária para a reprodução e sobrevivência dos adultos de *M. perstans*. Ainda é bastante discutido se todos os parasitos de *M. perstans* possuem *Wolbachia*, visto que alguns artigos apontam sua presença (Geringher et al, 2014) enquanto outros apontam sua ausência (Grobush et al, 2003). Existe ainda a possibilidade de existência de uma subespécie de *M. perstans* ou uma nova espécie representante do gênero *Mansonella*, evidenciando o porquê de algumas populações serem infectadas por *Wolbachia* enquanto outras não (Mourembou et al, 2015).

Neste trabalho foi avaliada a diversidade populacional de *Wolbachia*, bem como sua prevalência de infecção em microfilárias dos parasitos *M. ozzardi* e *M. perstans*, para gerar dados referentes a importância da presença da bactéria nos mesmos. Este é um passo de grande importância, visto que pode proporcionar possíveis caminhos para a introdução de estratégias terapêuticas anti-*Wolbachia* no combate a infecções causadas por *Mansonella* spp. tendo como foco a Região Amazônica, conforme já vem sendo feito em outras localidades para o parasito *Onchocerca volvulus* (Albers et al., 2012).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mansonelose: Distribuição e Epidemiologia

A mansonelose é tida como infecção causada por parasitos pertencentes ao filo Nematoda, ordem Spirurida, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae, gênero *Mansonella* spp., contemplando três espécies como agentes etiológicos capazes de ocasionar doenças em humanos: *Mansonella streptocerca*, *Mansonella perstans* e *Mansonella ozzardi*, conforme observado na Figura 1 (Tang et al, 2018; Silva et al., 2017). As infecções causadas pelo gênero *Mansonella* possuem ampla distribuição global, sendo *Mansonella streptocerca* endêmica da Região Africana, encontrada

principalmente a Oeste e Centro da África; *Mansonella ozzardi* com ocorrência no Novo Mundo, atualmente considerado o parasito filarial humano mais comum desta localidade responsável pela mansonelose, com ocorrência reportada do México a Argentina (Silva et al 2017; Medeiros et al, 2016). Assim como *M. streptocerca*, acreditava-se que *M. perstans* fosse endêmica da Região Africana, ocorrendo principalmente na África Ocidental, por ter sido estimado que aproximadamente 115 milhões de pessoas estejam infectadas apenas com *M. perstans* nesta localidade. Porém a espécie teve sua recorrência confirmada por meio de biologia molecular na América Latina com uma distribuição possivelmente restrita, até o momento, a comunidades ao norte do Estado do Amazonas (Silva et al, 2016; Medeiros et al., 2016).

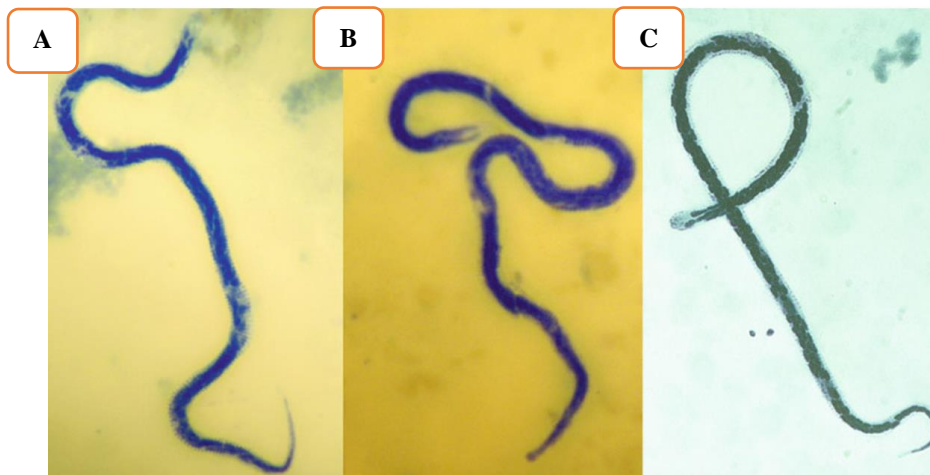


Figura 1. Microfilárias de *Mansonella ozzardi* (a), *Mansonella perstans* (b) e *Mansonella streptocerca* (c). Fonte: Medeiros et al, 2016.

Por conta da escassez de estudos e sobreposição de sintomas, torna-se difícil estabelecer a sintomatologia clínica da doença, visto que os sintomas mencionados por pessoas infectadas não são universais, variando conforme o parasito que a causa e região em que ocorre, como: dores articulares e nas extremidades do corpo, dores de cabeça, febre e lesões oculares (aproximadamente 1% dos casos); sintomas estes que de maneira geral não diferem dos de outras doenças de forte ocorrência na mesma região, como por exemplo mansonelose causada por *Mansonella ozzardi* e malária. No Brasil ocorrem as espécies *M. perstans* e *M. ozzardi*, tendo a última espécie sido enfoque de estudos recentes visto sua endemia na região mencionada, portanto, fazendo-se necessário o preenchimento de lacunas na literatura a respeito da doença principalmente no que diz respeito a programas de controle de parasitemias propostos pelo governo brasileiro. O fato da mansonelose ser apresentada como doença silenciosa e “benigna” por conta de

sua sintomatologia, principalmente quando causada *M. ozzardi* por ser considerada a mais assintomática, é uma das razões que faz com que a doença tenha pouca visibilidade e investimento em termos de ciência e tecnologia (Tang et al, 2018; Medeiros et al, 2017; Basano et. al, 2014;).

Em perspectiva geral de dados epidemiológicos, *Mansonella ozzardi* possui uma ampla distribuição na floresta tropical amazônica se estendendo as ilhas do Caribe, tendo sido distribuída e transmitida pelos países do Novo Mundo por simulídeos e culicídeos. Além disso, a mansonelose causada por *Mansonella ozzardi* é influenciada por alguns fatores de riscos demográficos, demonstrando relação direta dos criadouros próximos aos rios com gênero, ocupação e idade dos moradores de regiões endêmicas. O estudo da epidemiologia da mansonelose transmitida por *M. ozzardi* precisa ser aprofundada, principalmente quando associada a fatores como periodicidade e resposta imunológica, visto que para outros parasitos filariais sabe-se que as microfilárias circulantes no sangue podem variar conforme o período de picada do vetor, e que as mesmas também possuem relação direta com modulação da resposta imune do hospedeiro (Tang et al, 2018; Medeiros et al, 2017; Medeiros et al, 2015).

Quanto aos níveis de prevalência deste parasito, estes variam conforme tempo de estabelecimento de infecção e localidade. As prevalências observadas em alguns municípios do Amazonas são alarmantes, principalmente quando se leva em consideração os fatores demográficos mencionados. Próximo ao Rio Purus, foram observadas prevalências de infecção por *M. ozzardi* através de PCR em Boca do Acre e Lábrea, e por microscopia em Pauini e Canutama, tendo como resultado respectivamente: 41,5%; 15%; 24,6% e 28,8%. Também foi observado que homens entre 58 – 67 anos possuem as maiores prevalências de infecção. Próximo ao Rio Solimões, a prevalência de infecção na área rural e urbana de Coari, resultou em 18,4% e 10,2% no ano de 2010, e em novos estudos realizados em 2018 esta prevalência de infecção foi verificada em 30% por PCR. Em Codajás e Tefé, a prevalência foi de aproximadamente 45% por PCR e 25,7% por GE; e 44,8% por PCR e 22,9% por GE respectivamente. Analisando os dois municípios em conjunto, foi observado em termos de idade que a prevalência de infecção para homens e mulheres foi maior em pessoas acima de 67 anos, 37% e 41%; E que aproximadamente 21% da população de mulheres aposentadas, 40% dos homens aposentados e 38% dos homens que atuam como fazendeiros são positivos para infecção por *M. ozzardi* (Abraham et al, 2018; Medeiros et. al, 2015; Martins et al, 2010). Pouco

se sabe sobre a incidência de infecção por *M. ozzardi*, estimando-se que os índices são maiores para América do Sul do que para as Ilhas do Caribe (Medeiros et al, 2016).

2.2. Mansonelose: Ciclo de Transmissão

O ciclo de transmissão de *Mansonella ozzardi* (Figura 2) conta com seu desenvolvimento a priori em 3 estágios larvais (de L1 a L3) em seus insetos vetores que podem ser do gênero *Simulium* (Diptera: Simuliidae) ou *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae), variando conforme a região de ocorrência da doença, visto que ambos os gêneros suportam o desenvolvimento das larvas até o estágio infectante L3. A transmissão ocorre por meio da picada de vetores hematófagos infectados com larvas em estágio L3, depositando-as na corrente sanguínea ou pele, onde no hospedeiro humano as mesmas vão se diferenciar em vermes adultos machos e fêmeas.

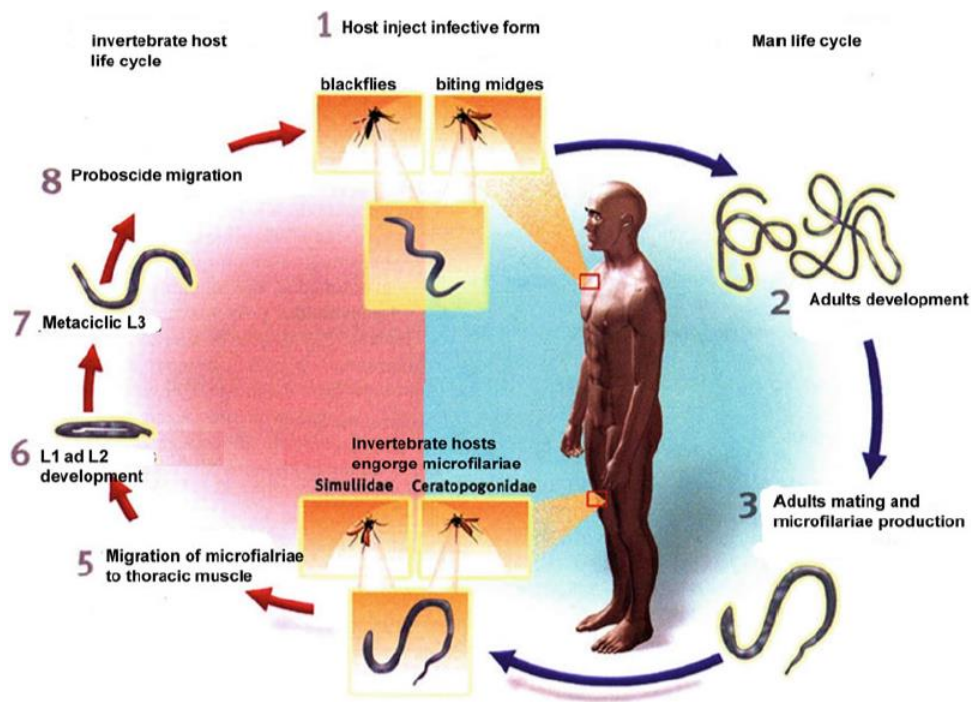


Figura 2. Ciclo de Transmissão de *Mansonella ozzardi*

(fonte: Medeiros et al., 2017)

Esses vermes adultos se reproduzem, e as fêmeas adultas produzem e liberam as microfilárias no sangue, sendo este o estágio onde estas podem ser detectadas no em testes diagnósticos. Quando um novo vetor encontra um hospedeiro humano infectado durante o repasto sanguíneo, o mesmo ingere as microfilárias juntamente com o sangue dando assim continuidade ao ciclo (Abraham et al, 2018; Medeiros et al, 2016).

Na Amazônia Brasileira, os vetores conhecidos pertencem ao gênero *Simulium*, sendo as principais espécies responsáveis pela transmissão do parasito ao hospedeiro humano *Simullium argentiscutum*, *Simullium amazonicum* e *Simulium oyapokense*. Ainda não se sabe a respeito da transmissão de *Mansonella ozzardi* pelo gênero *Culicoides* na Região Amazônica. (Grillet et al., 20109; Shelley and Cósaron, 2001).

2.3. Mansonelose: Diagnóstico

O diagnóstico de *Mansonella ozzardi* pode ser realizado por meio de microscopia óptica e reação em cadeia da polimerase (PCR), ambos com enfoque nas microfilárias encontradas no sangue circulante. O diagnóstico por microscopia de luz, tem enfoque na morfologia espécie-específica das microfilárias (MFs), com as quais se preparam lâminas devidamente coradas para identificação. Em termos morfológicos, pode-se observar que este parasito não possui bainha bem como outras espécies de MFs de outros parasitos filariais, e possuem região da cauda anuclear e pontiaguda, diferindo de *Mansonella perstans*, onde se observa cauda romba (arredondada) e com presença de núcleos. Em casos onde a microfilaremia é baixa, antes da preparação das lâminas é necessário utilizar métodos de concentração, como Knott e filtração por membrana de policarbonato para elevar a sensibilidade da técnica, tendo como ponto negativo a distorção de algumas estruturas morfológicas, o que pode vir a comprometer a identificação correta do parasito (Crainey et al., 2018B; Medeiros et al, 2015).

Outra forma de identificação e diagnóstico tanto em amostras de sangue quanto em vetores, é por meio de PCR, sendo esta a forma mais utilizada por ser baseada em biologia molecular e apresentar altos níveis de sensibilidade e especificidade. O método vem sendo utilizado cada vez com mais frequência com a intenção de aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos por diagnósticos realizados por microscopia óptica de luz, propondo mostrar que os dados de incidência e prevalência reportados podem estar sendo subestimados com relação aos verdadeiros níveis de infecção por *Mansonella* spp. (Tang et al, 2010).

Já existem diagnósticos baseados em ensaios imunológicos envolvendo antígeno e anticorpo, como por exemplo ELISA (do inglês “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*”), para outros parasitos como *Onchocerca volvulus* e *Dirofilaria immitis*. Porém, para esta metodologia ainda não foram encontrados antígenos e anticorpos específicos que sejam efetivos na detecção de infecção por *Mansonella* spp. Portanto, a mesma ainda

precisa ser desenvolvida e padronizada no que diz respeito ao diagnóstico para o gênero *Mansonella* (Tang et. al, 2018).

2.4. Mansonelose: Tratamento

Em termos de tratamento ainda não se conhece uma cura ou abordagem profilática para infecção por *Mansonella ozzardi*. Contudo, na Amazônia Brasileira, Ilhas do Caribe e Argentina já são existentes programas de tratamento em massa para o gênero *Mansonella* utilizando a ivermectina (IVM), droga comumente administrada no tratamento de outras filariose, com base em programas de tratamento já realizados na África para filariose linfática e oncocercose. Esta droga é de tratamento contínuo, administrada via oral e em dose única (sendo esta anual ou semestral), se mostrando altamente efetiva no que diz respeito a eliminação das MFs do sangue circulante, afetando-as num período de 24 horas após a ingestão e permanecendo no organismo em um período de aproximadamente 12 meses. Em estudos realizados com outros parasitos como *O. volvulus*, a IVM mostrou ação na eliminação das MFs e tornou as fêmeas adultas estéreis por um certo período de tempo (Basano et al., 2014, Albers et al., 2012). Para *M. ozzardi*, 3-4 anos após tratamento com IVM, as MFs ainda são observadas em aproximadamente 27% dos pacientes, sugerindo possível reinfecção.

Logo, em termos de tratamento em massa, a IVM é a droga microfilaricida comumente utilizada para a maioria dos parasitos filariais sendo considerada uma droga forte, capaz de causar esterilidade temporária e diminuição da carga parasitária, influenciando diretamente na transmissão da doença. Porém, alguns problemas são correlacionados ao seu uso, como o tratamento de longa duração (em termos de meses e até anos) por conta da retomada da fertilidade dos parasitos, possíveis casos de resistência, caso a droga não seja administrada de forma correta, e a relação com vários efeitos adversos, como febre alta, calafrios, náuseas, vômitos constantes e alguns casos de convulsões durante o período em que o medicamento é administrado (Basano et al., 2014; Medeiros et al., 2008).

A relação existente entre *Wolbachia* e diversos parasitos filariais, incluindo *Mansonella ozzardi*, traz a oportunidade de possíveis novas abordagens terapêuticas, nas quais a bactéria pode vir a ser um alvo promissor para novas estratégias de tratamento com antibióticos. Esta abordagem já é aplicada para tratamento de oncocercose e filariose linfática, nas quais se observa diminuição da carga parasitária e eliminação dos vermes adultos, se mostrando uma abordagem curativa (Clare et al., 2015; Taylor et al., 2014).

Esta seria uma alternativa viável frente aos problemas mencionados quanto as drogas microfilaricidas, como efeitos adversos e longo período de administração (Coulibaly et al., 2009).

A droga mais utilizada para este tipo de abordagem é a doxiciclina (DOX), com a qual se observou que em cachorros infectados com *Dirofilaria imittis* o tratamento resultou na depleção da bactéria e redução da quantidade de vermes adultos em 80% (Kramer and Genchi, 2014); para *O. volvulus*, em tratamento de pacientes com DOX durante 6 semanas na África Central e posterior alimentação de simulídeos do sangue dos mesmos, se observou diminuição da quantidade do DNA de *Wolbachia* e microfílarias em 50 e 80% de amostras de biópsias de pele humana e vetores, respectivamente (Albers et al, 2012); para *B. malayi*, o tratamento com DOX resultou na eliminação da *Wolbachia* e a consequência disto foi a inibição do desenvolvimento larval, viabilidade, mobilidade e fertilidade dos adultos (McGarry et al., 2014; Foster et al., 2005). Para filariose linfática causada por *W. bancrofti*, o tratamento com DOX mostrou após 24 meses que a depleção da *Wolbachia* é responsável pela morte dos parasitos adultos. O tratamento com DOX até agora é tido como o mais seguro no âmbito do uso de antibióticos, já tendo sido testado para *Wolbachia*, como alvo, em diversas infecções filariais (Aljayyousi, 2017; Kramer et al., 2008).

Alguns grupos de pesquisa, como o *A-Wol-Consortium*, têm sido referência e se engajado na busca por drogas macrofilaricidas mais específicas para o tratamento anti-*Wolbachia*, visto algumas restrições relacionadas a doxiciclina (antibiótico mais utilizado neste tipo de abordagem), como a contraindicação para tratamento em gestantes, lactantes e crianças menores de 8 anos. A busca tem sido realizada em meio a diversos compostos para encontrar um ou grupo de medicamentos em potencial, de boa qualidade e alta eficácia, seguro e acima de tudo, com efeito macrofilaricida seletivo para a eliminação da *Wolbachia*; contemplando estudos que partem da triagem de aproximadamente 2700 medicamentos registrados pelas indústrias farmacêuticas (Johnston et al., 2014; Landmann et al., 2011), a estudos que partem do desenvolvimento de drogas baseadas em testes de aproximadamente 10.000 compostos que podem se tornar medicamentos viáveis para tratamentos anti-*Wolbachia* (Johnston et al., 2017; Taylor et al., 2014).

2.5. *Wolbachia* Endossimbionte

A *Wolbachia* é uma bactéria endossimbionte intracelular obrigatória (Figura 3), na maioria dos casos de vida mutualista com diversos parasitos pertencentes a família

Onchocercidae assim como infectando uma vasta gama de artrópodes. Se encontra presente na classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales, tendo sido intitulada a priori como “*Rickettsia-like* bacteria” e posteriormente *Wolbachia pipientis*, por ter mostrado relação próxima aos gêneros *Ehrlichia*, *Cowdria* e *Anaplasma*, da mesma ordem; e tendo sido reportada pela primeira vez em *Culex pipiens*, onde foi finalmente determinada como o gênero *Wolbachia* (Bowman, 2011; Sironi et al, 1995; Hertig and Wolbach, 1924).

Durante décadas de estudo, esta bactéria se mostrou capaz de infectar natural e frequentemente patógenos humanos como nematódeos filariais, mostrando que a mesma promove influência a respeito do desenvolvimento, viabilidade, fecundidade e aumento do tempo de vida de parasitos filariais, conforme observado em estudos com *Onchocerca volvulus* e *Brugia malayi* (Albers et al., 2012; McGarry et al., 2004). Além disso, estudos vem demonstrando a responsabilidade da *Wolbachia* no gatilho de respostas inflamatórias no hospedeiro, ativando seu sistema imune e desencadeando respostas contra a infecção causada pelas filárias (Slatko et al., 2010; Grobusch et. al, 2003).



Figura 3. Microscopia eletrônica de célula de *Aedes albopictus* infectada com *Wolbachia*, indicadas pelas setas em vermelho. (fonte: plosbiology/doi/10.1371 - Scott O'Neill)

Em termos de resposta imune, durante a infecção causada pelo parasito, a *Wolbachia* ocasiona certas características patológicas inflamatórias, nas quais a própria bactéria pode induzir respostas pró-inflamatórias específicas, ter influência em termos de up-regulação de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de neutrófilos e imunoglobinas específicas, além de down-regulação a resposta imune do hospedeiro ocasionando imunotolerância, visto que nos casos em que os parasitos apresentam *Wolbachia* ocorre maior sobrevivência dos vermes adultos e conseqüentemente reações inflamatórias

crônicas nos locais onde os parasitos adultos se alojam (Genchi et al., 2012; Taylor et al., 2005). Esta bactéria endossimbionte foi identificada a priori por meio de microscopia eletrônica de parasitos adultos de *Dirofilaria immitis*, e posteriormente *Onchocerca ochengi*, *Onchocerca volvulus* e *Brugia malayi*, respectivamente (Kramer and Genchi, 2014); posteriormente detectada por meio de técnicas moleculares como imunomarcagem com uso de anticorpos em *D. imittis* e atualmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido utilizada cada vez com mais frequência para comprovar sua presença em diversos parasitos a priori detectada por outras técnicas que não por diagnóstico molecular (Albers et al. 2012, Tang et al., 2010).

Acredita-se que a infecção por *Wolbachia* ocorre por meio de transferência vertical, tendo sido encontrada no tecido hipodermal dos adultos de ambos os sexos, aparelho reprodutivo das fêmeas adultas e em menor quantidade nas microfilárias em desenvolvimento, nas quais se multiplica e persiste em todos os outros estágios de desenvolvimento do parasito, e nas fases que ocorrem tanto no mosquito quanto no próximo hospedeiro. Com base em estudos filogenéticos, já são descritos supergrupos de *Wolbachia* que vão de A-J (tendo sido atualizado recentemente recebendo agora o acréscimo de mais 4 supergrupos) que infectam os mais diversos organismos, de insetos a nematodos filariais (Lefoulon et al., 2016; Casirahgi et al., 2005).

2.6. Identificação e Diagnóstico de *Wolbachia*

Inicialmente a detecção de *Wolbachia* era realizada por meio de microscopia eletrônica de transmissão, tendo sido assim identificada pela primeira vez no inseto *Culex pipiens* e no parasito *Dirofilaria immitis* (Sironi et al., 1995; Hertig and Wolbach, 1924), também tendo sido detectada por esta técnica em *Mansonella perstans*, e tendo sido verificada a presença de *Wolbachia* em *Loa loa* utilizando quatro indivíduos adultos, dois machos e duas fêmeas, nos quais não foi possível detectar a bactéria (Grobusch et. al, 2003). Esta técnica é relativamente mais complicada uma vez que necessita do parasito completo para que seja feita a dissecação e observação em microscopia eletrônica após sua identificação em microscopia óptica. Além disso, sabe-se que os vermes adultos possuem um maior nível de infecção por *Wolbachia*, e alguns deles são de difícil acesso por conta do local onde se alojam, como espécies do gênero *Mansonella*, onde os parasitos adultos se encontram em cavidade peritoneal (Gehring et al., 2014; Kramer and Genchi, 2014).

Para *Wolbachia*, a forma mais comum e utilizada de identificação e diagnóstico ocorre por meio de PCR e sequenciamento, respectivamente, tendo assim sua amplificação e identificação por meio de genes-alvo específicos e diagnóstico por identificação de supergrupos (Lefoulon et al., 2016; Slatko et al., 2010; Casirahgi et al., 2005). Isto é possível pelo fato de a bactéria ser restritamente intracelular e por ser detectada em todos os estágios de desenvolvimento dos parasitos filariais. Os genes utilizados com mais frequência para detecção de *Wolbachia* tem sido: *FtsZ* (do inglês “*filamenting temperature-sensitive mutant Z*”), que codifica uma das proteínas responsáveis pela divisão celular; *WSP* (do inglês “*Wolbachia surface protein*”), que codifica proteína de adesão específica desta bactéria; *16S* rDNA, codifica uma das subunidades que compõe o ribossomo (rRNA), geralmente usado por conta de sua alta conservação em finalidades taxonômicas e filogenéticas; e *GROEL*, que codifica proteína relacionada a estresse celular, caracterizada com proteínas de choque térmico (do inglês *heat-shock protein*); Estes genes tem sido frequentemente utilizados para detecção e identificação de *Wolbachia* em parasitos como *M. perstans*, *O. volvulus*, *W. bancrofti* e *B. malayi*. (Albers et al, 2012; Coulibaly et al., 2009; McGarry et al., 2004).

2.7. Relação *Wolbachia* – Filárias: Prevalência

Sabe-se que a *Wolbachia* é estritamente relacionada a infecções naturais em uma gama de insetos, como mosquitos (a vasta maioria de mosquitos do gênero *Anopheles*; *Culex pipiens* e *Aedes albopictus*), bem como é relacionada a diversas espécies diferentes de patógenos filariais humanos, como *B. malayi*, *W. bancrofti*, *O. volvulus*, *M. perstans* e *M. ozzardi*. A bactéria endossimbionte pode ser detectada em praticamente todos os estágios de desenvolvimento dos mesmos, sendo bastante abundante na fase adulta e principalmente nas fêmeas, localizando-se na maioria dos casos em tecidos reprodutivos, o que sugere transmissão vertical e também demonstra importância quanto ao seu papel no desenvolvimento, viabilidade e fertilidade das filárias. Acredita-se que quanto aos insetos, a *Wolbachia* exerce o papel de parasita reprodutivo, onde os utiliza a fim de potencializar sua própria propagação. Em parasitos filariais, supõe-se que a relação entre a *Wolbachia* e o seu hospedeiro seja de mutualismo obrigatório, visto que em diversos estudos a mesma fora eliminada do hospedeiro através de tratamento com antibióticos, influenciando em diversos fatores relacionados a reprodução, desenvolvimento e tempo de vida do parasito (Caragata e Moreira, 2017; Taylor et al., 2002)

Frente ao fato de a *Wolbachia* causar infecção em diversas espécies de parasitos filariais, não se sabe os valores exatos referentes a prevalência de infecção nesses organismos. No que diz respeito a infecção em *M. ozzardi*, não se tem informações e dados bem estabelecidos. Dentre poucos estudos voltados para prevalência de infecção pela bactéria, com base em estudos filogenéticos foi possível observar a prevalência de infecção em um total de 45 espécies de parasitos diferentes (incluindo *M. ozzardi*), nos quais se observou a presença de *Wolbachia* em 71% das espécies (Lefoulon et al., 2016). Devido aos poucos dados de prevalência de infecção voltados para *M. ozzardi*, outros estudos trazem dados a respeito da prevalência de infecção por *Wolbachia* em outros parasitos, como *M. perstans*, na qual a bactéria foi detectada em 50% dos parasitos (7/14) em Gabon, na África, o que pode sugerir uma infecção recente, onde nem todos os espécimes se encontram infectados (Geringher et al., 2014). Em prevalência de infecção por *Wolbachia* em parasitos que causam oncocercose e filariose linfática, foi possível observar a presença da bactéria em todos os indivíduos de todas as populações dos parasitos analisados (Taylor et al, 2014). Enquanto isso, algumas espécies de parasitos filariais não apresentaram infecção por *Wolbachia* em nenhum espécime estudado até a atualidade, como a espécie *Loa loa*, sugerindo uma possível perda da bactéria em ancestral comum (Bowman, et. al, 2011).

2.8. Relação *Wolbachia* – Filárias: Diversidade

Um ponto-chave relacionado à infecção por *Wolbachia* é a diversidade de cepas e supergrupos sendo responsáveis por causar esse tipo de infecção, podendo ter influência na patogenicidade do parasito (Geringher et al., 2014). O gênero *Wolbachia* tem sido submetido a análises filogenéticas correlacionando diversos genes e atualmente, o mesmo é dividido em supergrupos, conforme observado na Figura 4.

A relação da *Wolbachia* com seu hospedeiro é um tanto complexa, visto que a natureza dessa relação pode variar conforme supergrupo, cepa e tempo de infecção. (Caragata e Moreira, 2017). As análises filogenéticas demonstram pelo menos sete grandes clados ou supergrupos bem estabelecidos, sendo os supergrupos A, B, E e H encontrados apenas em hospedeiros artrópodes; os supergrupos C e D encontrados exclusivamente em parasitos filariais; e o supergrupo F contemplando representantes tanto artrópodes quanto parasitos, incluindo o gênero *Mansonella* (Lefoulon et al., 2016). O supergrupo F se mostra bastante interessante por poder auxiliar na compreensão da origem dessa relação entre *Wolbachia*-hospedeiro, justamente por ser o único supergrupo

descrito que infecta tanto artrópodes quanto parasitos filarias (Taylor et al., 2014; Casiraghi et al., 2005).

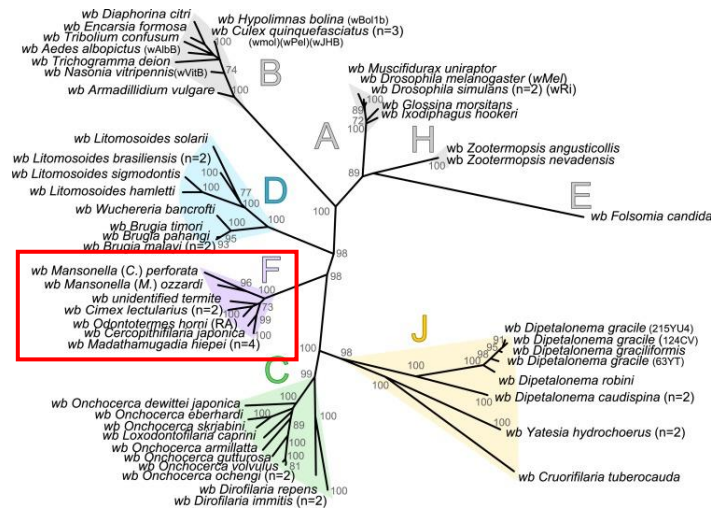


Figura 4. Árvore filogenética baseada na concatenação de sete genes, evidenciando os supergrupos de *Wolbachia* descritos até a presente data. Em destaque o supergrupo F, contemplando artrópodes e parasitos filários (Fonte: Lefoulon et al., 2016)

Além dos supergrupos, as bactérias *Wolbachia* encontradas em parasitos filários possuem genomas compactos e com poucos elementos móveis, porém se mantêm divergentes geneticamente e biologicamente. Por conta dessas variações baseado no que se observa para vetores (tornando viável a possibilidade de que o mesmo possa ocorrer em parasitos filários), casos de diversidade populacional onde se verificaram diferenças entre bactérias *Wolbachia*, logo diferentes cepas infectando uma mesma espécie, sendo estas reconhecidas e descritas frente ao organismo em que são encontradas e sua influência na biologia do mesmo, como as cepas: *wMel*, de *Drosophila melanogaster*; *wPip*, de *Culex pipiens*; *wPel*, de *Culex quinquefasciatus*; *wRi* e *wHa*, ambas de *Drosophila simulans* (Lefoulon et al., 2016; Saridaki and Bourtzis, 2010). Esta diversidade de maneira geral, pode ser um ponto positivo por ocasionar diferentes efeitos na biologia e fisiologia do hospedeiro, como também pode ser um ponto negativo, já que algumas cepas podem vir a ser exploradas como alvo de tratamento com antibióticos, fazendo com que o tratamento não seja totalmente eficaz caso haja diversidade populacional da bactéria frente ao organismo que a mesma infecta (Taylor et al., 2014; Casiraghi et al., 2001).

Na relação *Wolbachia*-filárias, supõe-se uma relação de mutualismo obrigatório, já que estudos filogenéticos demonstram uma relação de coevolução estável entre esses organismos, além da observação de que nas populações de parasitos onde a bactéria é

encontrada (em exceção a *M. perstans*), todos os espécimes possuem infecção por *Wolbachia* (Coulibaly et al., 2009; Taylor et al., 2005). Para *M. perstans*, foi observado que em populações diferentes do parasito em diversas localidades da Região Africana, existem espécimes infectados e não infectados com *Wolbachia*, diferente do que ocorre com outros parasitos da família Onchocercidae onde todos os indivíduos de uma população possuem infecção; o que sugere que pode haver transferência horizontal entre os indivíduos presentes no supergrupo F que contempla artrópodes e parasitos, bem como que esta transferência possa ser recente, e por isso, *M. perstans* ainda não é totalmente dependente da bactéria endossimbionte (Lefoulon et al, 2016; Keiser et al, 2008).

O status de infecção por *Wolbachia* frente ao gênero *Mansonella*, principalmente no que diz respeito ao que já é descrito para *M. perstans*, requer maiores estudos, pois o tipo de relação entre *Wolbachia*-filárias é o que propõe suporte as propostas de programas de controle de parasitemias humanas voltados para tratamentos anti-*Wolbachia*. Para isso, deve-se estabelecer a diversidade e a prevalência total de infecção por *Wolbachia* nas populações estudadas na Região Amazônica, bem como se há diversidade populacional entre as bactérias que infectam *M. ozzardi* nessa região para que o tratamento anti-*Wolbachia* possa funcionar e vir a ser aplicado para mansonelose de forma geral, causada pelos três agentes etiológicos conhecidos.

3. JUSTIFICATIVA

Embora a gravidade da mansonelose ainda não esteja bem caracterizada, a ampla prevalência da doença e sua importância para a saúde pública na Amazônia brasileira estão se tornando cada vez mais aparentes. Estudos recentes na região do Rio Solimões, Amazônia brasileira, onde a doença é causada exclusivamente pelo parasito *M. ozzardi*, mostraram que a ivermectina (IVM) é um tratamento altamente eficaz quando se trata da eliminação de microfilárias, bloqueando assim a transmissão do parasito causador da doença. No entanto, a IVM é ineficaz contra infecções por *M. perstans* e bem como não possui efeito curativo, já que não elimina os adultos de *M. ozzardi*; não sendo uma opção de tratamento nas regiões do norte do Rio Negro, como São Gabriel da Cachoeira, onde se sabe que *M. perstans* e *M. ozzardi* ocorrem em simpatria. Outras infecções por parasitos filariais foram efetivamente curadas com tratamentos direcionados a bactéria *Wolbachia*, os quais são necessários para a reprodução, desenvolvimento e sobrevivência destes parasitos. Este endossimbionte já foi detectado tanto em *M. ozzardi* quanto *M. perstans* em outras localidades e, portanto, a ideia de que todas as

infecções por mansonelose em São Gabriel da Cachoeira poderiam ser tratadas com um único tratamento anti-*Wolbachia* é atraente. Entretanto, a dependência entre os parasitos do gênero *Mansonella* e a bactéria *Wolbachia* ainda não é bem entendida. Ao contrário de todos os outros parasitas filariais humanos que estão infectados com *Wolbachia*, as quais têm sido efetivamente alvos terapêuticos anti-filariais, as cepas de *Wolbachia* que infectam *Mansonella* spp. pertencem a um clado (supergrupo F) que nem sempre são necessários para a sobrevivência de seus hospedeiros. Portanto, pode haver a possibilidade de que *Wolbachia* de *Mansonella* spp. não seja necessária para a sobrevivência dos parasitos, e assim, não ser efetivamente um bom alvo terapêutico. Um forte indicativo de que estratégias anti-*Wolbachia* seriam alvos ineficazes para abordagens terapêuticas seria a existência de infecções parasitárias por *Mansonella* spp. livres de *Wolbachia*. Em contraste, a prevalência total de infecção por *Wolbachia* indicaria que as mesmas poderiam ser bons alvos terapêuticos. Como uma investigação preliminar sobre a viabilidade do uso do tratamento anti-*Wolbachia* na Amazônia brasileira, desenvolvemos uma série de novas ferramentas baseadas em PCR para a detecção e caracterização do parasito do gênero *Mansonella* e da *Wolbachia* que o infecta. Essas ferramentas foram utilizadas para avaliar a prevalência de infecção e diversidade genética populacional de *Wolbachia* nas 48 amostras de sangue positivas para *Mansonella* spp., identificadas em um estudo epidemiológico anterior a respeito da mansonelose em São Gabriel da Cachoeira (Amazonas).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a prevalência de infecção e a diversidade genética populacional de *Wolbachia* em *Mansonella* spp. provenientes do município de São Gabriel da Cachoeira, Estado do Amazonas, Brasil.

4.2. Objetivos Específicos

- ❖ Otimizar e verificar dez ensaios de PCR para detecção e caracterização de parasitos de *Mansonella* spp.;
- ❖ Desenvolver e verificar um conjunto de 21 ensaios de PCR para utilização em análises *MLST* específicas para detecção e análise de diversidade de *Wolbachia* de *Mansonella* spp.;

- ❖ Testar um conjunto de três ensaios de PCR para avaliar a sensibilidade de detecção para elementos transponíveis (ETs) e sete ensaios de PCR para fagos de *Wolbachia* (WO) como potenciais ferramentas para análise de diversidade genética;
- ❖ Aplicar os novos ensaios obtidos para avaliação da prevalência de infecção por *Wolbachia* em amostras provenientes de São Gabriel da Cachoeira;
- ❖ Aplicar os novos ensaios obtidos para avaliação da diversidade genética populacional de *Wolbachia* em amostras provenientes de São Gabriel da Cachoeira;

5. METODOLOGIA

5.1. Área de Estudo e Aspectos Éticos e Legais da Pesquisa

O estudo em questão foi realizado no município de São Gabriel da Cachoeira (0°07'48.0''N 67°05'20.0''W), no Estado do Amazonas. As amostras de sangue utilizadas neste projeto foram provenientes de um estudo anterior intitulado *Mansonelose em área urbana de São Gabriel da Cachoeira*, o qual recebeu aprovação do comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CAAE - 41678515.1.0000.5248).

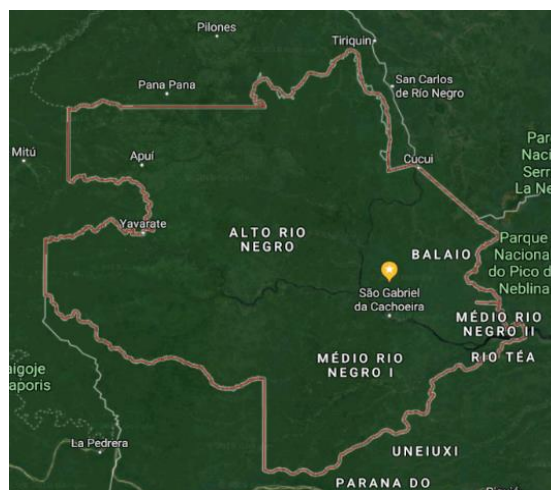


Figura 5. Imagem via satélite do município de São Gabriel da Cachoeira. Fonte: Imagens Via Satélite GoogleMaps (<https://google.com.br/maps/place/>)

5.2. Preparação de DNA-estoque Positivo para *Mansonella* spp. Utilizado em Experimentos de Otimização de PCR

No estudo epidemiológico realizado anteriormente, 48 residentes de São Gabriel da Cachoeira que foram positivos para *Mansonella* spp., tiveram 200µl de sangue venoso utilizados para extração de DNA por meio do kit QIAGEN “*DNeasy Blood & Tissue*”, conforme orientações do fabricante. Inicialmente, 20µl de cada amostra de DNA, positiva para *Mansonella* spp., foi utilizada para criar um *pool* de 960µl. Como o objetivo primário deste estudo tinha por intenção detectar *Wolbachia* em amostras clínicas positivas para *Mansonella* spp., diferentes concentrações do DNA-estoque foram utilizadas. Estes testes foram realizados com a intenção de avaliar a sensibilidade de detecção de *Wolbachia* para realização de diagnóstico utilizando o gene de cópia única (do inglês *single copy*) *FtsZ*, o qual é encontrado em todos os genomas de *Wolbachia* conhecidos atualmente. Com base neste experimento-piloto, o volume de 2µl de DNA foi definido como sendo o volume mínimo necessário para detecção de *Wolbachia*.

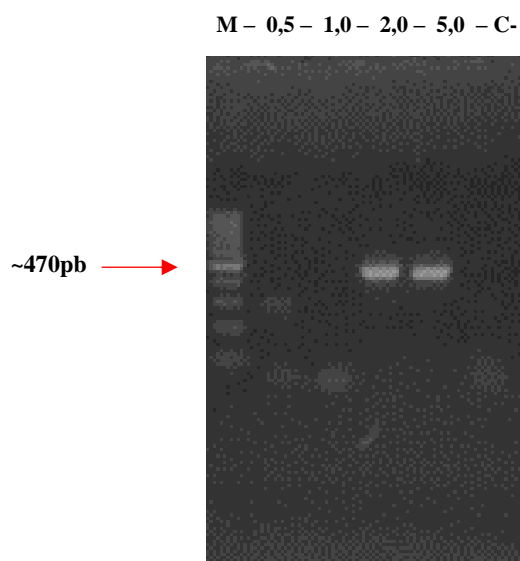


Figura 6. Teste de diluições de DNA-estoque (respectivamente: Marcador molecular 100pb; 0,5µl; 1µl; 2µl; 5µl; C-) para detecção de *Wolbachia* pelo alvo *FTSZ*.

5.3. Otimização de PCR para Detecção de Parasito do Gênero *Mansonella*

Um conjunto de 12 sequências de DNA foram selecionadas como alvo para detecção de *Mansonella* spp. A lista completa de sequências-alvo e primers utilizados seguem descritos na tabela 1. Nove destes alvos foram classificados como alvos de alta sensibilidade, por serem sequências-alvo ribossomais ou mitocondriais, geralmente ocorrendo em abundância após a extração de DNA bem-sucedida por serem genes que

naturalmente possuem mais cópias no genoma. Frente a isto, devem ser facilmente detectáveis mesmo quando a quantidade de DNA extraído de parasitos for baixa. Três alvos de baixa sensibilidade, referentes a DNA-alvo “*single copy*” também foram utilizados, visto que resultados negativos para PCR destes alvos, quando comparados aos resultados obtidos com os alvos de alta sensibilidade podem ser utilizados para identificar amostras de sangue que possuem uma baixa parasitemia, e conseqüentemente, uma pequena quantidade de DNA de parasitos. Tal informação tem grande relevância ao longo deste estudo, visto que ajudaria a identificar potenciais falso-negativos para PCR de *Wolbachia*.

Dos 12 alvos utilizados para detecção e amplificação de parasitos filariais, cinco não amplificaram. Os sete alvos restantes foram sequenciados pelo método Sanger na Plataforma Genômica da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), confirmando a confiabilidade de uso destes alvos para identificar e comprovar a presença de DNA de *M. ozzardi* e *M. perstans* em amostras de sangue. Além disso, outros seis primers adicionais desenhados para amplificar três regiões variáveis do mitogenoma filarial foram selecionados (Yilmaz et al 2016). Estes primers foram desenhados para uso em *Nested-PCR* (quatro primers para cada região alvo) e para amplificar preferencialmente sequências de *Mansonella* spp., os desenhos foram realizados através do software “*Primer 3*”, com base no alinhamento do mitogenoma completo de 21 parasitos filariais e por meio do programa *ClustalX* (Crainey et al 2018A).

As regiões variáveis (VR) de DNA mitocondrial foram apontadas como ferramenta em potencial para validação da existência de parasitos negativos para infecção por *Wolbachia*. Isso é possível pois a mitocôndria e a *Wolbachia* são adquiridas por herança materna, tornando possível correlacionar um haplótipo mitocondrial particular de *Mansonella* spp. com resultados negativos para PCR de *Wolbachia*, evidenciando forte a existência de um parasito verdadeiramente livre de infecção causada pela bactéria.

Tabela 1: Primers e Protocolos de PCR testados para detecção e análise de diversidade do parasito *Mansonella* spp.

| DNA Alvo | Primers | Tamanho de Fragmento Esperado | Tamanho de Fragmento Observado | Protocolo de PCR | Seqüências de Referência |
|---|--|--|---|--|---|
| Cópia Única RNA polimerase subunidade maior II: <i>rpb1</i> | RNApolyLSp_dF1 ^{Leif} : ACTGCAAAACWGCWATTTA RNApolyLSp_dR1 ^{Leif} : ACRGTGATTCATTCRCGTTTC | Ciclo único: ~640pb | SB | PCR Convencional RNApolyLSp_dF1 ^{Leif} + RNApolyLSp_dR1 ^{Leif} + protocolo LEF001 | Menor Fragmento: <i>M. ozzardi</i> (Genbank: KP760294) |
| Cópia Única Proteína de choque térmico 70-kilodaltons: <i>hsp70</i> | FHsp70_dF3 ^{Leif} : TCRGATTTCTTCTGGYA FHsp70_dR1 ^{Leif} : CAGCTATYCTYCTGTGTGAT FHsp70_dR1 ^{Leif} : GTYTYGTTTCATATTGAAYGC | 1º Ciclo: ~790 pb 2º Ciclo: ~610 pb | 610pb | Hemi Nested PCR 1º Ciclo: FHsp70_dF3 ^{Leif} + FHsp70_dR1 ^{Leif} + protocolo LEF002 2º Ciclo: FHsp70_dF1 ^{Leif} + FHsp70_dR1 ^{Leif} + protocolo LEF003 | Menor Fragmento: <i>M. ozzardi</i> (Genbank: KP760441) |
| Cópia Única Proteína miosina de cadeia pesada: <i>myoHC</i> | fil_myoHCp_F1 ^{Leif} : GCATCARGAAGAAATTAATCG fil_myoHCp_R1 ^{Leif} : GCCTCAATTTCTCTCCCAT fil_myoHCpN_F2 ^{Leif} : GAYGATCTTGAGGACAAAYT fil_myoHCpN_R2 ^{Leif} : TCTCAATYTGTTTBCCRAG | 1º Ciclo: ~1060 pb 2º Ciclo: ~785pb | 750pb | Nested PCR 1º Ciclo: fil_myoHCp_F1 ^{Leif} + fil_myoHCp_R1 ^{Leif} + protocolo LEF004 2º Ciclo: fil_myoHCpN_F2 ^{Leif} + fil_myoHCpN_R2 ^{Leif} + protocolo LEF005 | Menor Fragmento: <i>M. ozzardi</i> (Genbank: KP760243) |
| Ribossomal Subunidade de RNA ribossomal 18S: <i>18S rDNA</i> | F18ScF1 ^{Leif} : ACCGCCTAGTCTGACCGTAAA F18ScR1 ^{Leif} : GGTTC AAGCCACTGCGATTAAAGC | Ciclo Único: ~740pb | SB | PCR Convencional F18ScF1 ^{Leif} + F18ScR1 ^{Leif} + protocolo LEF006 | Menor Fragmento: <i>M. ozzardi</i> (Genbank: KP760147) |
| Ribossomal Subunidade de RNA ribossomal 28S: <i>28S rDNA</i> | F28SF1 ^{Leif} : CCTCAACTCAGTCGTGATTACC F28SintdR1 ^{Leif} : TCTYACTTTCATAYGCTT F28SR2 ^{Leif} : CTCTGGCTTCATCCTGCTCA | 1º Ciclo: ~790pb 2º Ciclo: ~610pb | SB | Hemi Nested PCR F28SF1 ^{Leif} + F28SR2 ^{Leif} + protocolo LEF007 F28SF1 ^{Leif} + F28SR1 ^{Leif} + protocolo LEF008 | Menor Fragmento: <i>M. ozzardi</i> (Genbank: KP760390) |
| Ribossomal Espaçador de gene ribossomal 5S: <i>5S</i> | 5SF ^{Mar} : GTTAAGCAACGTTGGGCCTGG 5SR ^{Mar} : TTGACAGATCGGACGAGATG | Ciclo único: ~380 pb | SB | PCR Convencional 5SF ^{Mar} + 5SR ^{Mar} + protocolo MAR001 | Menor Fragmento: <i>M. ozzardi</i> (Genbank: JF412305-JF412316) |
| Ribossomal Espaçador Interno de Seqüência Transcrita 1: <i>ITS1</i> | JM-F-0021 ^{1m} : GTGCTGTAAACCATACCGAAAGG JM-U-0022 ^{2m} : CGCAGCTAGCTGCCTTTCATCG ITS1-F ^{1m} : GGTGAACCTCGGGAAGGATC ITS-FBIS ^{1m} : GGTGAACCTGCRGMWGGATCA JM-F-0022-R ^{1m} : TGCTTATTAAGTCTACTTAA | 1º Ciclo: ~710pb 2º Ciclo: ~305/312pb | 305pb (<i>M. ozzardi</i>) 312pb (<i>M. perstans</i>) | Hemi Nested PCR 1º Ciclo: JM-F-0021 ^{1m} + JM-U-0022 ^{2m} + protocolo TAN001 2º Ciclo: ITS1-F ^{1m} + ITS-FBIS ^{1m} + JM-F-0022-R ^{1m} + protocolo TAN002 | Menor Fragmento: <i>M. ozzardi</i> (Genbank: LT623912) <i>M. perstans</i> (Genbank: LT623911) |
| Mitocondrial Citocromo oxidase I: <i>COI</i> | FCoIextdF1 ^{Leif} : TATAATTCTGTTTDACTA FCoIextdR1 ^{Leif} : ATGAAAATGAGCYACWACATAA COIintF ^{LeifMar} : TGATTGGTGGTTTTGGTAA COIintR ^{LeifMar} : ATAAGTACGAGTATCAATATC | 1º Ciclo: ~970 pb 2º Ciclo: ~650 pb | 650pb | Nested PCR 1º Ciclo: FCoIextdF1 ^{Leif} + FCoIextdR1 ^{Leif} + protocolo LEF009 2º Ciclo: COIintF ^{LeifMar} + COIintR ^{LeifMar} + protocolo LEF010 | Menor Fragmento: <i>M. ozzardi</i> (Genbank: KX822021) <i>M. perstans</i> (Genbank: KU215907) |
| Mitocondrial Subunidade de RNA ribossomal 12S: <i>12S</i> | 12SdegF2 ^{Leif} : ATTACYTATTYTTAGTTTA 12SnemR2 ^{Leif} : CTACCATACTACAACCTACGC 12SF ^{LeifMar} : GTTCCAGAATAATCGGCTA 12SdegR ^{LeifMar} : ATTGACGGATGRTTTGTACC | 1º Ciclo: ~600 pb 2º Ciclo: ~450 pb | 450pb | Nested PCR 1º Ciclo: 12SdegF2 ^{Leif} + 12SnemR2 ^{Leif} + protocolo LEF011 2º Ciclo: 12SF ^{LeifMar} + 12SdegR ^{LeifMar} + protocolo LEF012 | Menor Fragmento: <i>M. ozzardi</i> (Genbank: LT623914) <i>M. perstans</i> (Genbank: LT623913) |
| Mitocondrial Região Variável Mitocondrial 1: <i>mtVR1</i> | VR1_F1: CATTTGGCTGGTHIVCARGG VR1_R1: ACGMACAARKCAACCCAA VR1_int_F2: AACCGBCATAGWCCYGCT VR1_int_R2: TTCTAGCTGAGCCGTAATCAGA | 1º Ciclo: ~1200pb 2º Ciclo: ~750pb | 750pb | Nested PCR 1º Ciclo: VR1_F1 + VR1_R1 + protocolo LOR001 2º Ciclo: VR1_int_F2 + VR1_int_R2 + protocolo LOR002 | Menor Fragmento: <i>D. repens</i> (Genbank: KX260547) Wuchereria bancrofti (Genbank: JN367461) |
| Mitocondrial Região Variável Mitocondrial 2: <i>mtVR2</i> | VR2_F1: TAGCCGATTATTCTGGGAC VR2_R1: ATTGGGACTGGTCTTACATGG VR2_int_F2: TGTRTGRGGKTCTTARKAKT VR2_int_R2: TTAACCCYAAGAATATGAATCTT | 1º Ciclo: ~1200pb 2º Ciclo: ~600pb | SB | Nested PCR 1º Ciclo: VR2_F1 + VR2_R1 + protocolo LOR003 2º Ciclo: VR2_int_F2 + VR2_int_R2 + protocolo LOR004 | Menor Fragmento: <i>D. repens</i> (Genbank: KX260547) Wuchereria bancrofti (Genbank: JN367461) |
| Mitocondrial Região Variável Mitocondrial 3: <i>mtVR3</i> | VR3_F1: GCTTATCTCGTTTTGGTTTTG VR3_R1: CMACYATMCGWCTRTCACTACGC VR3_int_F2: AMAAACCAATGCCATCAAA VR3_int_R2: TGGARRTTTTWKTKRCTTTT | 1º Ciclo: ~1000pb 2º Ciclo: ~570pb | 570pb | Nested PCR 1º Ciclo: VR3_F1 + VR3_R1 + protocolo LOR005 2º Ciclo: VR3_int_F2 + VR3_int_R2 + protocolo LOR006 | Menor Fragmento: <i>D. repens</i> (Genbank: KX260547) Wuchereria bancrofti (Genbank: JN367461) |

SB = Sem observação de banda em gel de agarose;

5.4. Técnicas de Otimização e Validação Inicial de PCR

Após ter sido determinado que 2µl da extração de DNA total são suficientes para detecção de *Wolbachia*, o referido volume foi utilizado para os testes de detecção de *Mansonella ozzardi* e *M. perstans*. Todas as PCRs para detecção de parasitos foram realizadas para um volume de reação de 50 µl, utilizando o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega, EUA), segundo as instruções do fabricante: 10µl de Tampão para PCR [5X]; 0,2µl de cada um dos primers em concentração de 100µM; 4µl de MgCl₂ em concentração de 25mM; 1µl de DNTPs em concentração de 10mM; 0,1µl de GoTaq Polimerase em concentração de 5U/uL; 2µl de DNA do parasito e 33,5µl de água destilada estéril. Todos os primers previamente publicados foram testados juntamente aos protocolos de PCR de suas respectivas publicações. Os primers que não apresentaram bom desempenho ou nenhuma amplificação nas condições de ciclagem publicadas, foram otimizados seguindo o esquema básico de ciclagem conforme descrito no Anexo 1.

As PCRs que apresentaram banda única e tamanho de fragmento conforme esperado foram purificadas através do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega – EUA), conforme instruções do fabricante e sequenciadas conforme descrito anteriormente. As sequências obtidas foram alinhadas e editadas através do programa *BioEdit* (versão 7.2.1).; e a validação de sequências-consenso foi realizada por meio de confronto com bancos de dados *Genbank* através da ferramenta *BLASTn*, onde as sequências consideradas positivas obtiveram identidade $\geq 98\%$ quando comparadas com sequências de referência. Em caso de ausência de sequências de referência, a validação foi realizada através de análises filogenéticas, executadas no programa *MEGA* versão 10.0.4 (Kumar et al., 2017).

5.5. Otimização de Protocolos de PCR para Alvos Baseados em *MLST* para Detecção e Análise de Diversidade de *Wolbachia*

Inicialmente, um conjunto de quatro primers e seus respectivos protocolos já publicados foram testados para amplificação de alvos de *Wolbachia* de *M. ozzardi* e/ou *M. perstans*, para análise de sequências multilocus, sendo estes 16S, *FtsZ*, *GroEL* e *GltA*. Por conta das dificuldades iniciais para amplificação destes alvos seguindo os parâmetros metodológicos publicados anteriormente, um conjunto de 44 pares de primers foi desenhado para amplificar esses quatro alvos, bem como outros 18 alvos para sequências gênicas de *Wolbachia* com protocolos desenvolvidos para nested-PCR.

Os primers utilizados para esta etapa foram desenhados utilizando o software *Primer 3* e alinhamentos com sequências de *Wolbachia* pertencentes ao ao supergrupo F foram realizadas através do programa *ClustalX*. As sequências usadas para este alinhamento foram as mesmas utilizadas na publicação de Bordenstein et al. (2011) e correspondem a sequências recuperadas do genoma de *Wolbachia* de *Cimex lectularius*, o qual é o único representante do supergrupo F que possui seu genoma completo disponível em banco de dados (Nikoh et al. 2015). A lista de primers e protocolos de alvos que amplificaram para essas sequências estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Primers e Protocolos de PCR *MLST* testados para detecção e análise de diversidade de *Wolbachia*

| DNA Alvo | Primers | Tamanho de Fragmento Esperado | Tamanho de Fragmento Observado | Protocolo de PCR | Sequências de Referência |
|---|---|---------------------------------------|--------------------------------|---|---|
| Cópia Única Proteína de membrana para divisão celular bacteriana <i>Z. FtsZ</i> | FtsZ_UNI_F1 ^{Lor} : GGAGCATATAAAAAGATAGTCAT FtsZ_UNI_R1 ^{Cas} : ATCRATRCCAGTTGCAAG FtsZ_int_F2 ^{Lor} : CTTTTCATCACGGCAGGAAT FtsZ_int_R2 ^{Lor} : ATCTTCTCCCTCCGCTTCTC | 1° Ciclo: ~700pb 2° Ciclo: ~430pb | 430pb | Nested PCR 1° Ciclo: FtsZ_UNI_F1 ^{Lor} + FtsZ_UNI_R1 ^{Cas} + Protocolo LOR007 2° Ciclo: FtsZ_int_F2 ^{Lor} + FtsZ_int_R2 ^{Lor} + Protocolo LOR008 | Menor Fragmento: <i>Mansonella ozzardi</i> (Genbank: KU255359) |
| Cópia Única Chaperonina GroEL (Família HSP60): <i>GroEL</i> | Gro_F1 ^{Cas} : GGTGAGCAGTTGCAAGAAGC Gro_Rev1 ^{Cas} : AGATCTTCCATCTTGATTCC Groel_F2: GCCGGAAATGATCGTGTAG Groel_R2: TTAGACCACCACGAGTTTG | 1° Ciclo: ~870pb 2° Ciclo: ~500pb | 500pb | Nested PCR 1° Ciclo: Gro_F1 ^{Cas} + Gro_Rev1 ^{Cas} + Protocolo LOR009 2° Ciclo: Groel_F2 + Groel_R2 + Protocolo LOR010 | Menor Fragmento: <i>Mansonella ozzardi</i> (Genbank: KU255214) |
| Cópia Única Citrato Sintase: <i>GltA</i> | GltA_F1 ^{Cas} : TACGATCCAGGGTTTGTCTAC GltA_wR2 ^{Cas} : CATTTCATACCCTGGGCAA GltA_F2: AAAAAGCTGGCCACCCATATGT GltA_int_R2: GGCTGATCCTACCAACCTGA | 1° Ciclo: ~880pb 2° Ciclo: ~355pb | 355pb | Nested PCR 1° Ciclo: GltA_F1 ^{Cas} + GltA_wR2 ^{Cas} + Protocolo LOR011 2° Ciclo: GltA_F2 + GltA_int_R2 + Protocolo LOR012 | Menor Fragmento: <i>Mansonella ozzardi</i> (Genbank: AJ628413.1) |
| Cópia Única Subunidade de RNA ribossomal 16S: <i>16S rDNA</i> | 16S_F ^{Cas} : GAAGATAATGACGGTACTCAC 16S_wolbR3 ^{Cas} : GTCACCTGATCCCACTTAAATAAC 16S_F2: CAGCCACACTGGAAGCTGAGA 16S_R2: TGCATCGAATGGAACACAT | 1° Ciclo: ~1300pb 2° Ciclo: ~630pb | 630pb | Nested PCR 1° Ciclo: 16S_F ^{Cas} + 16S_wolbR3 ^{Cas} + Protocolo LOR013 2° Ciclo: 16S_F2 + 16S_R2 + Protocolo LOR014 | Menor Fragmento: <i>Mansonella ozzardi</i> (Genbank: AJ279034) <i>Mansonella perstans</i> (Genbank: KJ631374) |
| Cópia Única Aspartato Aminotransferase C: <i>aspC</i> | aspC_F1: AAGCCATCACCTACGATTGC aspC_R1: A(C/T)TCTCCAGCCTGTCAT(T/C)GC aspC_F2: GCGTTTTAGCTGCAGGAGAG aspC_R2: CGTGA(G)GGATATTC(C/A)AGCAAT | 1° Ciclo: ~700pb 2° Ciclo: ~480pb | 480pb | Nested PCR 1° Ciclo: aspC_F1 + aspC_R1 + Protocolo LOR015 2° Ciclo: aspC_F2 + aspC_R2 + Protocolo LOR016 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (631037-632214)] |
| Cópia Única Aspartato Aminotransferase S: <i>aspS</i> | aspS_F1: CCGGAGAAATCGAGGTGATA aspC_R1: ATC(C/T)CC(G/A)GGCTCT(G/A)T(A/G)TTCG aspC_F2: AAAGTGTTCGCCAAATTTTCTC aspC_R2: GAAGCT(G/T)CGTGGTTCCTCT(G/T) | 1° Ciclo: ~920pb 2° Ciclo: ~250pb | 250pb | Nested PCR 1° Ciclo: aspS_F1 + aspS_R1 + Protocolo LOR017 2° Ciclo: aspS_F2 + aspS_R2 + Protocolo LOR018 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (721150-722952)] |
| Cópia Única ATP Sintase subunidade D: <i>atpD</i> | atpD_F1: TCCCATTTTCAGCTATTTGC atpD_R1: TGAGTGTGGT(T/C)CGCTGAAAG atpD_F2: GTTGCAGGAGCTGGATCAGT atp_R2: AGA(A/G)AG(G/A)ACGCGTGAAGGTA | 1° Ciclo: ~730pb 2° Ciclo: ~400pb | 400pb | Nested PCR 1° Ciclo: atpD_F1 + atpD_R1 + Protocolo LOR019 2° Ciclo: atpD_F2 + atpD_R2 + Protocolo LOR020 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (594112-595578)] |
| Cópia Única Citocromo Oxidase A: <i>coxA</i> | coxA_F1: GCCCATTTGAAGAGGTGTA coxA_R1: TCGCTTTACCGGT(G/A)CT(T/C)GCT coxA_F2: GTCGGGTATACGCCTT(A/G)GCA coxA_R2: TTGGTCA(C/T)CC(G/A)GAAAGTTAC | 1° Ciclo: ~850pb 2° Ciclo: ~650pb | 650pb | Nested PCR 1° Ciclo: coxA_F1 + coxA_R1 + Protocolo LOR021 2° Ciclo: coxA_F2 + coxA_R2 + Protocolo LOR022 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (461216-462766)] |
| Cópia Única ATPase iniciadora da replicação: <i>dnaA</i> | dnaA_F1: TCCAATACCAGG(A/C)AGCAACC dnaA_R1: CTTACAAGACC(A/G)CGAAGCCT dnaA_F2: TCTCCTAG(C/T)GATCTTGATGGA dnaA_R2: TCTCCTAG(C/T)GATCTTGATGGA | 1° Ciclo: ~730pb 2° Ciclo: ~375pb | 375pb | Nested PCR 1° Ciclo: dnaA_F1 + dnaA_R1 + Protocolo LOR023 2° Ciclo: dnaA_F2 + dnaA_R2 + Protocolo LOR024 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (153-1535)] |
| Cópia Única Trans-2-enoil-ACP redutase <i>fabK</i> : <i>fabK</i> | fabK_F1: TTGGC(A/G)TAATTGCATGT(T/G)GT fabK_R1: CTTTGGCCTGCCATTAAGA fabK_F2: GG(T/C)GG(A/G)(T/C)TACCGACAAAAC fabK_R2: TGGAAATTACAGGAAAATCAG(C/A)A | 1° Ciclo: ~780pb 2° Ciclo: ~420pb | 420pb | Nested PCR 1° Ciclo: fabK_F1 + fabK_R1 + Protocolo LOR025 2° Ciclo: fabK_F1 + fabK_R2 + Protocolo LOR026 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (419062-420108)] |
| Cópia Única Proteína A rica em cisteína: <i>hcpA</i> | hcpA_F1: TCTCAAAAATTTACGAAGCTCAT hcpA_R1: GCTCTTCGACCAATGCAGAT hcpA_F2: ATCCACGTCTTCTGTTCTGCT hcpA_R2: GCATCACGCACTTTACAAA | 1° Ciclo: ~600pb 2° Ciclo: ~420pb | 420pb | Nested PCR 1° Ciclo: hcpA_F1 + hcpA_R1 + Protocolo LOR027 2° Ciclo: hcpA_F2 + hcpA_R2 + Protocolo LOR028 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 - (477262_477882)] |
| Cópia Única Magnésio Quelatase: <i>MgChel</i> | MgChel_F1: ATAYGCGTGTIRTAGCCTCGATT MgChel_R1: GAACCTCATCAYTCATGYTC MgChel_R2: CTTTCGYGAACCTCATCAYTCATG | 1° Ciclo: 700pb 2° Ciclo: 600pb | SB | Hemi-nested PCR 1° Ciclo: MgChel_F1 + MgChel_R1 + Protocolo LOR029 2° Ciclo: MgChel_F1 + MgChel_R2 + Protocolo LOR030 | Menor Fragmento: <i>WoCauB2</i> (Genbank: NUCLEOTIDE - CP001391.1; PROTEIN - ACN95503) |
| Cópia Única Ubiquinona Oxidorredutase: <i>nadH</i> | nadH_F1: GGTGTACATTGCCACATGA nadH_R1: TCTGGCTGGAAGAGCAATCT nadH_F2: AAGACCCGCCAGGTATCAC nadH_R2: GCCTGTAATCGGCTATGA | 1° Ciclo: ~720pb 2° Ciclo: ~400pb | 400pb | Nested PCR 1° Ciclo: nadH_F1 + nadH_R1 + Protocolo LOR031 2° Ciclo: nadH_F2 + nadH_R2 + Protocolo LOR032 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (669145-670428)] |

| | | | | | |
|--|---|--------------------------------------|-------|---|---|
| Cópia Única NADH-quinona oxidoreductase subunidade D: <i>nuoD</i> | nuoD_F1: TTGGAGCGAT(G/A)ACTCCTCTT nuoD_R1: GCAAGCATGTG(T/C)CCTTTTGA nuoD_F2: TATTAGGCCAGGTGGAGTGG nuoD_R2: GTTTTCATCTC(C/T)GCTCTTGG | 1º Ciclo: ~750pb 2º Ciclo: ~440pb | SB | Nested PCR 1º Ciclo: nuoD_F1 + nuoD_R1 + Protocolo LOR033 2º Ciclo: nuoD_F2 + nuoD_R2 + Protocolo LOR034 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (518224-519396)] |
| Cópia Única NADH-quinona oxidoreductase subunidade G: <i>nuoG</i> | nuoG_F1: TAA(C/T)GCATCTTGACCGATGA nuoG_R1: TT(C/T)GGCCCACTTATTGAAAC nuoG_F2: GCATT(T/C)TCTAT(G/A)CCCT(G/C)A(G/A)(C/T) nuoG_R2: GTGGGAAGTGCATCAGAGT | 1º Ciclo: ~940pb 2º Ciclo: ~410pb | SB | Nested PCR 1º Ciclo: nuoG_F1 + nuoG_R1 + Protocolo LOR035 2º Ciclo: nuoG_F2 + nuoG_R2 + Protocolo LOR036 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (1242818-1244866)] |
| Cópia Única Piruvato desidrogenase subunidade beta: <i>pdhB</i> | pdhB_F1: CGAAAGGATTGCTGAAGGAG pdhB_R1: ACCCTTCTACGCTGACCA pdhB_F2: GGATTThGCTGGTCTTGCTGT pdhB_R2: TT(G/A)CATC(C/T)TTCCCTC(T/C)CGT | 1º Ciclo: ~680pb 2º Ciclo: ~400pb | SB | Nested PCR 1º Ciclo: pdhB_F1 + pdhB_R1 + Protocolo LOR037 2º Ciclo: pdhB_F2 + pdhB_R2 + Protocolo LOR038 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (258950-259948)] |
| Cópia Única Succinato desidrogenase subunidade beta: <i>sucB</i> | sucB_F1: TTGCGGAGGGTTTAT(T/G)ATCG sucB_R1: CTGACAAAACAGCGTTGAA sucB_F2: TC(A/G)GCACTCCGAATAACCGG sucB_R2: GCTGAACA(G/A)CCCTGC(A/G)GT(G/C)(A/G)A | 1º Ciclo: ~850pb 2º Ciclo: ~400pb | 400pb | Nested PCR 1º Ciclo: sucB_F1 + sucB_R1 + Protocolo LOR039 2º Ciclo: sucB_F2 + sucB_R2 + Protocolo LOR040 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (1077428-1078600)] |
| Cópia Única Gene para proteína hipotética_0183: WD_0183 (Possível Família – Oxidoreductase) | WD0183_F1: C(G/A)AGGCTGGAGTTAGTCAGG WD0183_R1: T(G/T)(C/G)(T/C)ACC(C/A)ATTGCAAAATCA WD0183_F2: TTTTGGCTTGG(C/T)GGAGTAGT WD0183_R2: GACGTGA(G/A)TTCCGTTC(C/T)TGT | 1º Ciclo: ~750pb 2º Ciclo: ~500pb | 500pb | Nested PCR 1º Ciclo: WD0183_F1 + WD0183_R1 + Protocolo LOR041 2º Ciclo: WD0183_F2 + WD0183_R2 + Protocolo LOR042 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (735612-737036)] |
| Cópia Única Gene para proteína hipotética_0198: WD_0198 (Possível Metiltransferase) | WD0198_F1: TGGTCTCACGGAATTTCTCC WD0198_R1: TTCCGGTAACCTACAGAA WD0198_F2: CCTCAAGGTAAAGGCCACAA WD0198_R2: CTGTAGCAACACGTGCCATT | 1º Ciclo: ~600pb 2º Ciclo: ~480pb | 480pb | Nested PCR 1º Ciclo: WD0198_F1 + WD0198_R1 + Protocolo LOR043 2º Ciclo: WD0198_F2 + WD0198_R2 + Protocolo LOR044 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (601394-602086)] |
| Cópia Única Gene para proteína hipotética_0237: WD_0237 (Possível Proteína de Membrana Interna – Componente para Translocase) | WD0237_F1: GAATGCTCGACATTGGGTTT WD0237_R1: GGCTGGATCCAAGTG(G/A)TAAA WD0237_F2: TCAGGCTGCAAATTTTCATT WD0237_R2: AATTGGTTTGGTTTCGCTGA | 1º Ciclo: ~900pb 2º Ciclo: ~440pb | 440pb | Nested PCR 1º Ciclo: WD0237_F1 + WD0237_R1 + Protocolo LOR045 2º Ciclo: WD0237_F2 + WD0237_R2 + Protocolo LOR046 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (601394-602086)] |
| Cópia Única Gene para proteína hipotética_0359: WD_0359 | WD0359_F1: TCAGTGGAAAATTATAACAAATCTCTG WD0359_R1: CCGTCTATAACCGGTACGTT WD0359_F2: CCTCACCTATTCAACTACATGCAA WD0359_R2: CAGGATCATAATGTCCCTTGG | 1º Ciclo: ~600pb 2º Ciclo: ~410pb | 410pb | Nested PCR 1º Ciclo: WD0359_F1 + WD0359_R1 + Protocolo LOR047 2º Ciclo: WD0359_F2 + WD0359_R2 + Protocolo LOR048 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (166058_165432)] |
| Cópia Única Gene para proteína hipotética_1005: WD_1005 | WD1005_F1: GTTAGCGGCACTTCAAGAAA WD1005_R1: CAGCGTATAAGCTCTCCAACC WD1005_F2: TGATG(C/T)GCTGGAGAG(A/G)TATG WD1005_R2: AGATTGTGTAGCGGGCAAGT | 1º Ciclo: ~800pb 2º Ciclo: ~400pb | 400pb | Nested PCR 1º Ciclo: WD1005_F1 + WD1005_R1 + Protocolo LOR049 2º Ciclo: WD1005_F2 + WD1005_R2 + Protocolo LOR050 | Menor Fragmento: <i>Cimex Lectularius</i> [Genbank: AP013028.1 – (1114709-1115521)] |

SB = Sem observação de banda em gel de agarose;

5.6. Otimização de Protocolos de PCR para Elementos Transponíveis (ETs) de *Wolbachia* Testados para Detecção de Alta Sensibilidade

A fim de maximizar a sensibilidade da detecção de *Wolbachia*, foram desenhados primers para amplificação de elementos transponíveis, que são frequentemente encontrados com várias cópias nos genomas, e por esse motivo sua detecção pode ser mais eficiente do que a detecção dos alvos *single copy* para análise de MLST. A ferramenta *BLAST* foi utilizada para identificar elementos transponíveis a partir do genoma da *Wolbachia wDam* (Crainey et al. 2017B), identificando assim um conjunto diversificado em bancos de dados de genomas de *Wolbachia*. Alinhamentos a nível de aminoácidos destes ETs foram utilizados para identificar regiões conservadas a partir das quais foram definidas como alvo de amplificação. Com base neste fato, primers degenerados foram então desenhados levando em conta a degeneração do códon de aminoácidos. A lista de primers degenerados para detecção de alta sensibilidade e protocolos padronizados podem ser verificados na tabela 3.

Tabela 3: Primers e protocolos para PCR de elementos transponíveis testados para detecção de alta sensibilidade para *Wolbachia*

| DNA Alvo | Primers | Tamanho de Fragmento Esperado | Tamanho de Fragmento Observado | Protocolo de PCR | Sequências de Referência |
|---|---|-------------------------------|--------------------------------|---|---|
| Elemento Transponível Família 1 Transposase 1 – TE1 | TE_GRP1_F1: TGCAGCAYSAGCRRRTTTTA TE_GRP1_R1: TRTAWTGRCCTGGTTTCRTCA | Ciclo único: ~469pb | SB | PCR Convencional TE_GRP1_F1 + TE_GRP1_R1 + Protocolo LOR051 | Menor Fragmento: sr1WodamA1 (Genbank: KY695240) |
| Elemento Transponível Família 2 Transposase 2 – TE2 | TE_GRP2_F1: TTGACAGAGTYAAGAGGAATGAAAG TE_GRP1_R1: TGGKTCATCYAAAAATTTCCA | Ciclo único: ~328pb | SB | PCR Convencional TE_GRP2_F1 + TE_GRP2_R1 + Protocolo LOR052 | Menor Fragmento: sr1WodamA1 (Genbank: KY695240) |
| Elemento Transponível Família 3 Transposase 3 – TE3 | TE_GRP3_F1: CTTTRTTTCGYAAAATRTTCTGTTT TE_GRP1_R1: TTGCACYRAATRTMAACACTGR | Ciclo único: ~320pb | SB | PCR Convencional TE_GRP3_F1 + TE_GRP3_R1 + Protocolo LOR053 | Menor Fragmento: sr1WodamA1 (Genbank: KY695240) |

*PCR Touchdown

5.7. Otimização de Protocolos de PCR para Fagos de *Wolbachia* (WO) para Análise de Diversidade Populacional

Em uma tentativa de desenvolver marcadores genéticos populacionais para *Wolbachia*, (que pode estar potencialmente ligada a haplótipos mitocondriais) e assim auxiliar na validação de infecções negativas para a bactéria, foram testadas uma série de PCRs para detecção de fagos conforme primers já testados anteriormente para amplificação de *wDAM* (Crainey et al. 2017B) e outros genomas de *Wolbachia* (Crainey et al, dados não publicados). As tentativas de amplificação destes alvos seguiram a mesma abordagem de gradientes de PCR descrita anteriormente para parasitos e *Wolbachia*. Os primers e protocolos utilizados nesta etapa podem ser verificados na tabela 4.

Tabela 4. Primers e protocolos para PCR de fagos testados para análise a nível populacional de diversidade de *Wolbachia*

| DNA Alvo | Primers | Tamanho de Fragmento Esperado | Tamanho de Fragmento Observado | Protocolo de PCR | Sequências de Referência (sr1WodamA) |
|--|--|-------------------------------|--------------------------------|--|--|
| Gene de fago de <i>Wolbachia</i> Serina recombinase de sr1WodamA: WOB2pgp1 | GP1_int_F1: GCCCGTATAAGCGTAATGAG GP1_int_R1: GCCAGAACAACGGTAGTAAAG | Ciclo único: ~1565pb | SB | PCR Convencional FAGO_GP1_F1 + FAGO_GP1_R1 + Protocolo LOR054 | Menor Fragmento: GP1 [GenBank: KY695239 - complement (<1...1565)] |
| Sequência de Fago de <i>Wolbachia</i> Gene para proteína hipotética de sr1WodamA: WOB2pgp3 | GP3_int_F1: CTTTCACGAGCAAATTGCTG GP3_int_R1: GTTTCGCCATTGCGACTAC | Ciclo único: ~1110pb | SB | PCR Convencional FAGO_GP3_F1 + FAGO_GP3_R1 + Protocolo LOR055 | Menor Fragmento: GP3 [GenBank: KY695239 - (3070...4179)] |
| Gene de fago de <i>Wolbachia</i> Gene para proteína hipotética de sr1WodamA: Suposta proteína RepA: WOB2pgp4 | GP4_int_F1: TGCTTCTTCTTGACCTAGCC GP4_int_R1: AGCAAAAATAACACCTGACTCC | Ciclo único: ~2021pb | SB | PCR Convencional FAGO_GP4_F1 + FAGO_GP4_R1 + Protocolo LOR056 | Menor Fragmento: GP4 [GenBank: KY695239 - complement (4185...6205)] |
| Gene de fago de <i>Wolbachia</i> Gene para proteína hipotética de sr1WodamA: WOB2pgp5 | GP5_int_F1: GCTCCACGAATTCTCACTCC GP5_int_R1: GCCAACGCCCACTTACTCTG | Ciclo único: ~1231pb | SB | PCR Convencional FAGO_GP5_F1 + FAGO_GP5_R1 + Protocolo LOR057 | Menor Fragmento: GP5 [GenBank: KY695239 - complement (6211...7441)] |
| Gene de fago de <i>Wolbachia</i> Resolvasse de junção de intervalo de sr1WodamA: WOB2pgp11 | GP11_int_F1: CAACAACGTAAAGGAAATGCTC GP11_int_R1: CCTGTACTGCTCAATAACATC | Ciclo único: ~467pb | SB | PCR Convencional FAGO_GP11_F1 + FAGO_GP11_R1 + Protocolo LOR058 | Menor Fragmento: GP11 [GenBank: KY695239 - complement (10128...10594)] |
| Sequência de Fago de <i>Wolbachia</i> Possível proteína de montagem GpV: WOB2pgp23_24 | GP23_24_int_F1: ACCATTGGGAGAATTGTCTTTG GP23_24_int_R1: CCATAATCTCGGCGCATAAC | Ciclo único: ~329pb | SB | PCR Convencional FAGO_GP23_24_F1 + FAGO_GP23_24_R1 + Protocolo LOR059 | Menor Fragmento: GP23_24 (GenBank: KY695240) |
| Sequência de Fago de <i>Wolbachia</i> Gene para proteína hipotética de sr1WodamA: WOB2pgp29 | GP29_int_F1: AAAAGGAAGAGGGGGAAGTAG GP29_int_R1: TCATACGGCAACAAATGAGG | Ciclo único: ~1922pb | SB | PCR Convencional FAGO_GP29_F1 + FAGO_GP29_R1 + Protocolo LOR060 | Menor Fragmento: GP29 [GenBank: KY695241 - (3492...5413)] |

*PCR Touchdown

5.8. Análise de Prevalência de Infecção e Diversidade Genética de *Wolbachia*

No total, as 48 amostras foram testadas para detecção por PCR de 12 alvos para parasitos filariais e 22 alvos para *Wolbachia* (tabelas 1, 2 e 5). Após as PCRs, as amostras que amplificaram para no mínimo três alvos referentes a parasitos filariais foram validadas por meio de análises filogenéticas e selecionadas para futuros ensaios com enfoque nos alvos de *MLST* para *Wolbachia*. Após essa triagem, as amostras selecionadas foram testadas para detecção de *Wolbachia*, e as consideradas positivas passaram posteriormente por verificação de prevalência total ou não de infecção por *Wolbachia* na população desses parasitos.

A diversidade de *Wolbachia* foi analisada de duas formas, onde a primeira foi baseada na verificação e contagem de *snps* das sequências obtidas para os alvos *16S*, *FtsZ*, *GroEL* e *GltA*; seguido de análises filogenéticas utilizando as sequências dos representantes de cada supergrupo utilizados na etapa de padronização, juntamente com sequências de referências disponíveis em bancos de dados para alvos do gênero *Mansonella*, que já foram utilizados previamente em análises do tipo *MLST*, sendo estes *FtsZ*, *GroEL* e *GltA* (Casiraghi et al, 2005) e *16S* (Lefoulon et al 2016).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimento de novas ferramentas para detecção e classificação de parasitemia por *Mansonella* spp.

Para amplificação de parasitos filariais, 12 alvos foram testados conforme descrito na tabela 1, sendo três deles *single copy*, e portanto de baixa sensibilidade (*rbp1*, *hsp70* e *myoHC*); quatro ribossomais, nucleares e de alta sensibilidade (*18S*, *28S*, *5S* e *ITS1*); e cinco mitocondriais, de herança materna e alta sensibilidade (*COI*, *12S*, *mtVR1*, *mtVR2* e *mtVR3*). Os alvos *ITS1* e de regiões variáveis foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em questão, enquanto os demais foram descritos por Lefoulon et al (2015). Dos 12 alvos testados para detecção de parasitos em *pool* de DNA, sete alvos foram positivos, sendo estes: dois alvos de cópia única (*hsp70* e *myoHC*), um alvo ribossomal (*ITS1*) e quatro alvos mitocondriais (*COI*, *12S*, *mtVR1* e *mtVR3*). Durante a padronização, estes alvos apresentaram bandas bem definidas e conforme tamanho estimado, seguindo os protocolos de reação descritos para os mesmos (Anexo 1). Deste total de sete alvos positivos, quatro aguardam sequenciamento enquanto os três demais, sendo estes *ITS1*, *COI* e *12S*, tiveram suas sequências verificadas através de comparação com sequências disponíveis no banco de dados *Genbank*, tendo sido consideradas como sequências de qualidade e positivas para parasitos do gênero *Mansonella* com identidade entre sequências $\geq 98\%$ (não levando em consideração nesse caso a diversidade do DNA-alvo) quando comparadas com referências de *Mansonella* spp.

Os alvos mitocondriais e ribossomais são considerados alvos de alta sensibilidade, por conta de suas várias cópias no genoma do parasito. Isso sugere uma maior facilidade de amplificação por conta da disponibilidade de cópias desses alvos após extração. Os resultados obtidos com a amplificação de alvos *single copy* foram de grande importância, principalmente para indicar a quantidade de DNA disponível nas amostras, bem como sua qualidade após longo período de armazenamento, visto que por serem alvos de única cópia no genoma, sua amplificação é mais difícil de ocorrer, evidenciando sua baixa sensibilidade. Isto chamou a atenção posteriormente, sugerindo que as amostras negativas para estes alvos poderiam corroborar os alvos negativos de *Wolbachia*, evidenciando novamente que as PCRs negativas para estes alvos podem ser justificadas pela baixa quantidade de DNA disponível.

6.2. Desenvolvimento de novas ferramentas para detecção e classificação de infecções por *Wolbachia* em parasitemias de *Mansonella* spp.

Foram testados 22 alvos baseados em *MLST* para detecção de *Wolbachia* a partir do *pool* de DNA positivo para *Mansonella* spp., visando posterior uso para classificação e análise *MLST* da bactéria nas amostras individuais de São Gabriel da Cachoeira. Deste total, quatro alvos já possuem referências disponíveis no banco de dados *Genbank* para *Wolbachia* de parasitos do gênero *Mansonella* (Lefoulon et al. 2016; Casiraghi et al, 2005), sendo estes alvos: *16S*, *FTSZ*, *GROEL* E *GLTA*. Para estes alvos, foi seguida a mesma lógica utilizada para validação de alvos de filárias (identidade $\geq 98\%$, não levando em consideração a diversidade do DNA-alvo), onde as sequências de referência já se encontram disponíveis no banco *Genbank*.

Os demais alvos, 18 no total (tabela 2), são referentes a sequências de *Wolbachia* que não se encontram disponíveis em banco de dados para nenhuma espécie representante do gênero *Mansonella*, o que determina que as sequências obtidas nesta etapa do estudo, verificadas por análises filogenéticas, confirmam ser as primeiras sequências-alvo de *Wolbachia* de *Mansonella* spp., referentes aos 14 alvos: *AspC*, *AspS*, *CoxA*, *SucB*, *nadH*, *FabK*, *dnaA*, *HcpA*, *AtpD*, *WD0183*, *WD0198*, *WD0237*, *WD0359* e *WD1005*.

Para montagem das árvores filogenéticas, foram selecionados genomas completos de pelo menos um representante de cada supergrupo, que vai de A-F. Os genomas completos selecionados de cada supergrupo, utilizados para análises dos alvos positivos foram: A – *Drosophila melanogaster* e *Drosophila simulans*; B – *Culex quinquefasciatus*; C – *Onchocerca volvulus* e *Onchocerca ochengi*; D – *Brugia malayi*; E – *Folsomia candida*; F – *Cimex lectularius*. Logo, as 14 sequências-alvo recuperadas foram consideradas de *Wolbachia* de *Mansonella* spp. quando agruparam com o supergrupo F juntamente com *C. lectularius*, e com apoio de bootstrap $>50\%$.

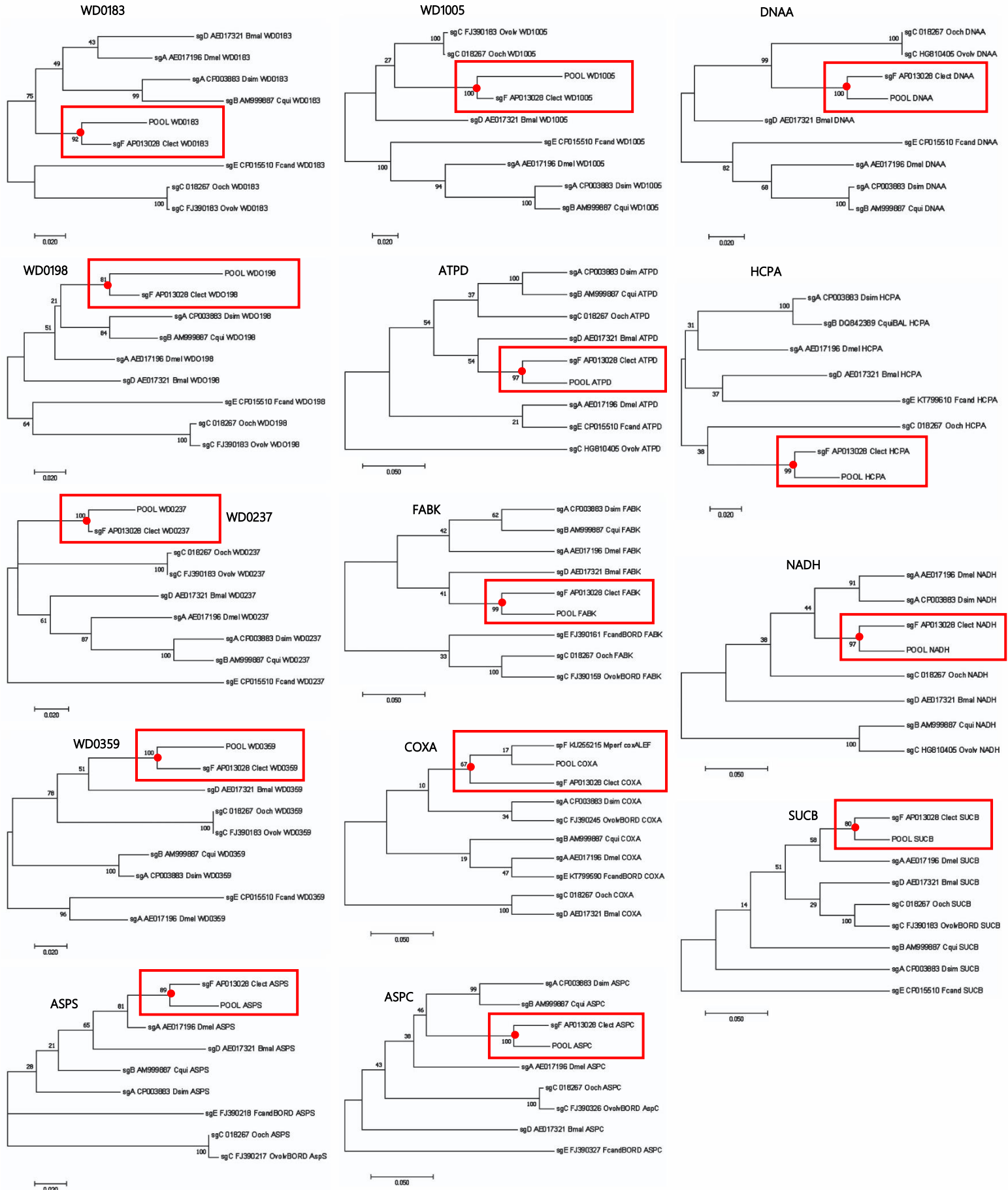


Figura 7. Árvores representativas de distância construídas com metodologia de *Maximum likelihood* (ML) implementada pelo programa MEGA utilizando 1000 replicatas/pseudoárvores para os 14 alvos de *MLST* de *Wolbachia*. Os agrupamentos de seqüências de *Wolbachia* de *Mansonia* spp. com *Wolbachia* de *C. lectularius* (supergrupo F), foram confirmadas com apoio de bootstrap >50%; em destaque o supergrupo F e seus valores de *bootstrap* (vermelho).

6.3. Desenvolvimento de novas ferramentas para detecção de alta sensibilidade (ETs) e análise de diversidade populacional (fagos) de infecções por *Wolbachia* em parasitemias de *Mansonella* spp.

Não foi possível amplificar sequências de alvos de elementos transponíveis (ETs) ou de fago de *Wolbachia* a partir das amostras analisadas, utilizando os protocolos de PCR padronizados nesse trabalho, mesmo após adaptações de algumas condições de reação. Os alvos de ETs foram desenvolvidos para melhorar a sensibilidade de detecção de *Wolbachia*, identificando assim, possíveis amostras falso-negativas para *Wolbachia* a partir dos resultados obtidos por *MLST*. Contudo, para as amostras de São Gabriel da Cachoeira, estes alvos não foram necessários visto que todas as amostras foram positivas para a bactéria por pelo menos quatro alvos de *MLST*. Além disso, nossos dados demonstram a viabilidade do desenvolvimento e otimização de protocolos de PCR baseados em ETs tendo como referência outros genomas de parasitos filariais (Comandatore et al, 2015), o genoma de *Cimex lectularius* (como nesse trabalho) e futuramente o genoma de *Wolbachia* de *M. ozzardi* e *M. perstans* (dados não publicados).

No caso dos fagos, depois que este se integra em um genoma, a maioria de seus genes não são necessários para a sobrevivência da *Wolbachia*, logo, não são conservados da mesma forma que os genes da bactéria, indicando que estes podem evoluir rapidamente se tornando potenciais marcadores populacionais, como ocorre para o profago *sr1WoDam* (Crainey et al., 2017). Para fagos, não se conhece na literatura atual a evidência de sua presença em *Wolbachia* de parasitos filariais, diferentemente do que se conhece para artrópodes, onde já se tem informações a respeito de genes e proteínas relacionadas a estes fagos, bem como acredita-se os mesmos tem se movido através do genoma de bactérias que se encontram em um mesmo filo (Kent et al, 2011; Tanaka et al., 2009). Acredita-se que a ausência do fago de *Wolbachia* possa ser um indicativo de comportamento simbiótico, sugerindo que a bactéria se faz necessária para a sobrevivência do parasito hospedeiro (Fenn e Blaxter, 2006). Nesse aspecto, nossos resultados negativos sugerem ausência de fagos no genoma da *Wolbachia* de *Mansonella* spp. corroborando este argumento; e sugerindo também que o genoma da bactéria é pouco variável e um bom alvo para futuras alternativas de tratamentos.

A não-detecção tanto de ETs quanto de fagos não implicou negativamente a obtenção dos resultados, visto que 18 alvos *single copy* baseados em *MLST* do genoma de *Wolbachia* foram positivos para amplificação em *Mansonella* spp. A amplificação de

ETs e fagos foi verificada durante a padronização de amostras de simulídeos vetores (dados não publicados). Os amplicons obtidos foram sequenciados e quando analisados através de *BLASTn*, as mesmas obtiveram identidade $\geq 97\%$ com sequências de fagos de *Wolbachia* infectando vetores, sugerindo que os protocolos e primers desenhados são funcionais.

6.4. Prevalência de *Wolbachia* entre as amostras clínicas dos parasitos do gênero *Mansonella* recuperados de moradores de São Gabriel da Cachoeira

Os sete alvos positivos na padronização foram utilizados para detecção dos parasitos nas 48 amostras provenientes de São Gabriel da Cachoeira, agora testadas individualmente. Destes sete alvos, todas as amostras foram positivas para o alvo *ITS1*, alvo ribossomal e de alta sensibilidade, e considerado padrão-ouro para diagnóstico de parasitos filariais (Crainey et al., 2019; Tang et al., 2018; Medeiros et al., 2017; Tang et al., 2010); 47 amostras foram positivas tanto para *mtVRI* e *mtVR3*, também alvos de alta sensibilidade e ambos mitocondriais; 45 amostras positivas pra *COI* e 25 amostras positivas para *I2S*, ambos mitocondriais e de alta sensibilidade; 30 amostras positivas tanto para *myoHC* quanto *hsp70*, alvos de baixa sensibilidade (tabela 5). Estes resultados sugerem, conforme o esperado, que as PCRs de alvos mitocondriais e ribossomais foram as reações de melhor desempenho na detecção dos parasitos quando comparados com os alvos de cópia única, exatamente por terem maior número de cópias no genoma. É interessante ressaltar que o alvo *I2S*, mesmo sendo um alvo mitocondrial e de alta sensibilidade, foi o alvo que teve menor desempenho, sendo possível amplificar aproximadamente 52% das amostras estudadas (25/48), menos inclusive do que foi observado para os alvos *single copy*. Uma possível explicação para este fato é a existência de variações genéticas a nível populacional nos sítios de ligação dos primers (interferindo no anelamento), ou por limitações técnicas dos protocolos de PCR mesmo após padronização.

O fatos dos ensaios realizados com base nos alvos *single copy myoHC* e *hsp70* não terem sido capazes de amplificar exatamente as mesmas amostras de DNA, sugerem que sua falha ao não amplificar o DNA do parasito pode ser explicada por uma baixa quantidade de DNA nas amostras em questão. Isto ocorre quando o nível de infecção é leve e a microfilaremia do indivíduo infectado é baixa, e portanto a detecção de microfíliarias no sangue por PCR ou sua contagem em lâminas se torna difícil, podendo resultar em falsos negativos para casos submicroscópicos (Medeiros et al., 2015). Ao

comparar os dados observados na tabela 5, é possível verificar que a baixa parasitemia verificada nas PCRs de alvos *single copy* é suportada pelo diagnóstico microscópico, onde 50% das amostras foram determinadas como negativas (24/48) pela ausência de MFs na lâmina, enquanto 67% (12/18) das PCRs de alvos *single copy* que foram negativas corroboram os dados da microscopia, sugerindo que as amostras negativas para os alvos de baixa sensibilidade *myoHC* e *hsp70* apresentam pouca quantidade de parasitos e consequentemente de seu DNA nas amostras extraídas. Os ensaios de PCR para detecção de parasitos confirmaram que todas as amostras foram positivas, sugerindo que resultados negativos para os alvos de baixa sensibilidade indicam baixa quantidade de DNA disponível para determinadas amostras clínicas.

Para detecção de *Wolbachia*, todas as 48 amostras de sangue foram positivas para pelo menos 4 alvos *single copy* baseados em *MLST* (tabela 5). Das amostras positivas, 39,5% foram positivas entre 4-10 alvos (19/48); 25% foram positivas entre 11-15 alvos (12/48); e 35,5% foram positivas para acima de 15 alvos (17/48) onde 8% das amostras foram positivas para todos os alvos (4/48). Os alvos *16S* e *FTSZ* foram os que mais obtiveram resultados positivos, amplificando 100% e 83% do total de amostras, respectivamente. Para o total de alvos positivos, houve então uma média de 81% de amostras positivas para os 7 alvos de parasitos filariais e 62% de amostras positivas para os 18 alvos baseados em *MLST* para os ensaios de detecção de *Wolbachia*. Os amplicons obtidos para os alvos de *Mansonella* spp. *mtVR1*(47), *mtVR3*(47), *HSP70*(30) e *myoHC*(30); e os amplicons obtidos para os 14 alvos baseados em *MLST* para *Wolbachia* (após validação filogenética dos alvos de padronizados) estão aguardando sequenciamento para que estas sequências possam ser analisadas, validadas e depositadas em bancos de dados. Os demais alvos, que foram sequenciados, tiveram sua confirmação como sendo sequências de qualidade, além do confronto com banco de dados, pela montagem de árvores filogenéticas com apoio de bootstrap superior a 50%. A existência de 19 amostras positivas para mais de 15 alvos de *MLST*, e também a existência de duas amostras positivas para menos de cinco alvos de *MLST* sugerem que a quantidade de *Wolbachia* nas MFs de *Mansonella* spp. pode ser variável. Isto também pode ser verificado visto que um total de cinco amostras foram positivas para os dois alvos *single copy* testados para parasitos e negativas para pelo menos oito alvos de *MLST* de *Wolbachia*.

Tabela 5: *MLST* Clássico baseado na detecção de *Wolbachia* em amostras clínicas positivas provenientes de São Gabriel do Cachoeira

| Amostra | Microscopia/ quantidade de filárias | SPP/Micro- scopia | SPP/PCR | Sensibili- dade | ITS1 | COI | 12S | Hsp70 | MyoHC | VR1 | VR3 | FtsZ | GltA | GroEL | 16S | aspC | aspS | atpD | coxA | dnaA | fabK | hcpA | nadH | sucB | WD 0183 | WD 0198 | WD 0237 | WD 0359 | WD 1005 | | |
|----------|---|----------------------|---------|--------------------|------|-----|-----|-------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|------------|------------|------------|------------|------|------|
| SP1-11 | -ve(0) | MO | MO/MP | Baixa | 001 | 069 | 115 | ---- | ---- | +ve | +ve | 160 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | ---- | +ve | ---- | | |
| SP2-24 | +ve(5) | MO | MO | Média | 002 | 070 | 116 | +ve | +ve | +ve | +ve | 161 | 220 | 228 | 240 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP3-60 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 003 | 071 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 162 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | | |
| SP4-61 | +ve(16) | MO | MO | Alta | 004 | 072 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 163 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | | |
| SP5-84 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 005 | 073 | 117 | +ve | +ve | +ve | +ve | 164 | +ve | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | | |
| SP6-100 | +ve(2) | MO | MO | Baixa | 006 | 074 | 118 | +ve | +ve | +ve | +ve | 165 | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | | |
| SP7-112 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 007 | 075 | 119 | ---- | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | | |
| SP8-113 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 008 | 076 | 120 | ---- | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | | |
| SP9-118 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 009 | 077 | 121 | +ve | +ve | +ve | +ve | 166 | 221 | 229 | 241 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP10-130 | +ve(16) | MO | MO | Alta | 010 | 078 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 167 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | | |
| SP11-136 | +ve(2) | MP | MO/MP | Baixa | 011 | 079 | 122 | +ve | +ve | +ve | +ve | 168 | 222 | 230 | 242 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP12-139 | +ve(12) | MO | MO | Alta | 012 | 080 | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | 169 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | | |
| SP13-140 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 013 | 081 | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | 170 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | | |
| SP14-154 | +ve(1) | MO | MO | Baixa | 014 | 082 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 171 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | ---- | | |
| SP15-155 | +ve(1) | MO | MO | Baixa | 015 | 083 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 172 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP16-157 | +ve(5) | MO | MO | Média | 016 | 084 | 123 | +ve | +ve | +ve | +ve | 173 | 223 | 231 | 243 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP17-159 | +ve(15) | MO | MO | Alta | 017 | 085 | 124 | +ve | +ve | +ve | +ve | 174 | 224 | 232 | 244 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | |
| SP18-160 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 018 | 086 | 125 | +ve | +ve | +ve | +ve | 175 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP19-170 | +ve(9) | MO | MO | Alta | 019 | 087 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 176 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP20-171 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 020 | 088 | 126 | +ve | +ve | +ve | +ve | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP21-172 | +ve(5) | MO | MO | Média | 021 | 089 | 127 | ---- | ---- | +ve | +ve | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP22-173 | +ve(11) | MO | MO | Alta | 022 | 090 | 128 | +ve | +ve | +ve | +ve | 177 | 225 | 233 | 245 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP23-174 | +ve(54) | MO | MO | Alta | 023 | 091 | 129 | +ve | +ve | ---- | ---- | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP24-181 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 024 | --- | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 178 | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP25-200 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 025 | 092 | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP26-205 | +ve(5) | MO | MO | Média | 026 | 093 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 179 | 226 | 234 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | |
| SP27-220 | +ve(9) | MO | MO | Alta | 027 | 094 | 130 | +ve | +ve | +ve | +ve | 180 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP28-264 | +ve(19) | MO | MO | Alta | 028 | 095 | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP29-524 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 029 | 096 | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | 181 | 227 | 235 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP30-525 | +ve(9) | MO | MO | Alta | 030 | 097 | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | 182 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP31-653 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 031 | 098 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | --- | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP32-654 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 032 | 099 | 131 | ---- | ---- | +ve | +ve | 183 | +ve | ---- | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP33-656 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 033 | 100 | 132 | +ve | +ve | +ve | +ve | 184 | +ve | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | |
| SP34-657 | +ve(1) | MO | MO | Baixa | 034 | 101 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 185 | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | |
| SP35-710 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 035 | 102 | 133 | +ve | +ve | +ve | +ve | 186 | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP36-712 | +ve(6) | MO | MO | Média | 036 | 103 | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | 187 | +ve | 236 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP37-723 | +ve(2) | MO | MO | Baixa | 037 | 104 | 134 | +ve | +ve | +ve | +ve | 188 | +ve | 237 | 246 | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | |
| SP38-735 | +ve(1) | MO | MO | Baixa | 038 | 105 | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | 189 | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve | +ve |
| SP39-760 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 039 | 106 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 190 | +ve | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | |
| SP40-763 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 040 | 107 | 135 | ---- | ---- | +ve | +ve | 191 | ---- | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | |
| SP41-769 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 041 | 108 | 136 | ---- | ---- | +ve | +ve | 192 | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | |
| SP42-776 | -ve(0) | MO | MO/MP | Baixa | 042 | 109 | 137 | ---- | ---- | +ve | +ve | 193 | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | |
| SP43-781 | -ve(0) | MO | MO/MP | Baixa | 043 | 110 | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | 194 | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | |
| SP44-783 | +ve(1) | MP | MP | Baixa | 044 | 111 | 138 | +ve | +ve | +ve | +ve | 195 | ---- | 247 | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | +ve | +ve | +ve |
| SP45-786 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 045 | --- | --- | ---- | ---- | +ve | +ve | 196 | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- |
| SP46-787 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 046 | --- | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 197 | +ve | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- |
| SP47-791 | -ve(0) | MO | MO | Baixa | 047 | 112 | --- | +ve | +ve | +ve | +ve | 198 | ---- | +ve | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- |
| SP48-801 | +ve(1) | MO | MO | Baixa | 048 | 113 | 139 | +ve | +ve | +ve | +ve | 199 | +ve | 238 | 248 | +ve | +ve | ---- | +ve | ---- | +ve | ---- | ---- | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- | +ve | ---- | ---- |

MO – *M. ozzardi* (em azul); MP – *M. pertans* (em laranja); - MO/MP – *M. pertans* e *M. ozzardi* (rosa); Amostras Positivas por Alvos (verde);

Houveram seis amostras positivas para pelo menos dez alvos de *MLST* de *Wolbachia* que foram negativas para os dois alvos de baixa sensibilidade de parasitos, corroborando a possibilidade de que pouca quantidade de DNA de parasito não tem influência sobre a quantidade de DNA disponível e conseqüentemente as amplificações para *Wolbachia*, e vice-versa. Para análise quantitativa, se fazem necessários ensaios referentes a qPCRs realizadas com apenas um indivíduo do parasito, utilizando de indivíduos detectados em vetores simulídeos (larvas em fase infectante), porém preferencialmente fêmeas adultas, que possuem maior quantidade de *Wolbachia* visto que sua transferência é materna (Hurst and Jiggins, 2005). Para *M. ozzardi* e *M. perstans* é inviável este tipo de teste já que os vermes adultos são de difícil acesso, localizados na cavidade peritoneal (Tang et al, 2018; Gehringer et al, 2014).

Logo, os resultados obtidos nessa etapa sugerem que todas as MFs de *M. ozzardi* em São Gabriel da Cachoeira possuem infecção por *Wolbachia* (prevalência total de infecção), mas que a quantidade de bactérias em cada parasito não pode ser determinada em valores exatos. Este resultado pode ajudar a explicar relatos anteriores de amostras do gênero *Mansonella* “negativas para *Wolbachia*” na África, além de evidenciar que pelo menos cinco alvos precisam ser utilizados na detecção de *Wolbachia*, visto que a maioria dos artigos utiliza apenas dois alvos, para que os resultados obtidos possam de fato mostrar se estes ou demais parasitos não possuem infecção por *Wolbachia* (Coulibaly et al, 2009; Grobush et al, 2003). Estes resultados são consistentes com o estudo recente baseado na análise de densidade por qPCR de *Wolbachia* de *O. volvulus* (Armoo et al, 2017). Testes baseados em PCR em tempo real (qPCR) podem ser desenvolvidos a partir dos primers e protocolos desenvolvidos neste estudo para evidenciar se o mesmo fato ocorre com *M. ozzardi* e *M. perstans*, corroborando a hipótese aqui sugerida.

6.5. Parasitos do gênero *Mansonella* e diversidade de *Wolbachia* entre as amostras clínicas de sangue recuperadas de 48 residentes de São Gabriel da Cachoeira

Foram utilizadas sequências de DNA do parasito *Mansonella* spp. referente aos alvos *ITS1*, *COI* e *12S* para avaliação de diversidade de parasitos presentes nas amostras de São Gabriel da Cachoeira (figura 8). Para os alvos *ITS1* e *12S*, por meio de análises filogenéticas foi possível observar dois agrupamentos distintos juntamente a sequências de referência dos parasitos *M. perstans* e *M. ozzardi* (sendo este segundo identificado na grande maioria das amostras), com apoio de bootstrap acima de 99% (figura 8A e 8B). Do

total de sequências observadas para estes dois alvos, duas amostras (SP11-136S e SP44 - 783S) formaram clusters com referências de *M. perstans* enquanto as outras 46 agruparam com *M. ozzardi* para *ITS1*, corroborando os dados epidemiológicos obtidos em estudo anterior, baseado em microscopia óptica (Silva et al.; 2017); enquanto as mesmas duas amostras observadas para *ITS1* formaram clusters com referências de *M. perstans*, as 23 demais agruparam com *M. ozzardi* para *I2S*. Significa dizer que 4% das amostras foram identificadas como *M. perstans* enquanto 96% das amostras foram identificadas como *M. ozzardi* para *ITS*; e 8% das amostras foram identificadas como *M. perstans* enquanto 92% das amostras foram identificadas como *M. ozzardi* para *I2S*. Estes resultados convergem com as expectativas de que os dois parasitos são capazes de infectar em uma mesma localidade, e que a maioria dos indivíduos desta região encontram-se infectados com *M. ozzardi* (Silva et al., 2017; Medeiros et al., 2014).

Para *COI* por meio de análises filogenéticas foi possível observar dois agrupamentos bem definidos juntamente a sequências de referência dos parasitos *M. perstans* e *M. ozzardi* com apoio de bootstrap acima de 99%. Do total de sequências observadas, as duas amostras que agruparam com referências de *M. perstans* para *ITS1* e *I2S* também agruparam com o parasito para o alvo *COI*; enquanto outras 37 agruparam com *M. ozzardi*. Três amostras identificadas anteriormente *M. ozzardi* por microscopia óptica, *ITS* e *I2S* (SP1 -11S, SP42 -776 E SP43 -781) agruparam com referências de *M. perstans* com apoio de bootstrap acima de 89%. Isto sugere a existência de indivíduos coinfectados com as duas espécies de parasitos filariais (dados não publicados, confirmados por *NGS*), sugerindo também a existência de haplótipos mitocondriais diferentes para *M. perstans* quando observada em casos de monoinfecção e coinfecção. Portanto, foi possível inferir que 4,4% das amostras foram identificadas como *M. perstans*, 89% como *M. ozzardi*. e 6,6% como possíveis amostras coinfectadas.

Para os três alvos, foi realizada a contagem de *SNPs* encontrados ao longo das sequências, a fim de verificar a diversidade genética entre os parasitos de *M. ozzardi* e *M. perstans*. Para *ITS1*, foi observada a variação de dois *SNPs* tanto para *M. ozzardi* quanto para *M. perstans* analisando as sequências separadamente; quando alinhadas e analisadas em conjunto, este número aumenta para aproximadamente 25 variações. Para *I2S*, não foi observada variação de *SNPs* quando as sequências são analisadas separadamente para *M. ozzardi* e *M. perstans*; quando analisadas em conjunto, este número aumenta para aproximadamente 40 variações. Para *COI*, não foi observada variação de *SNPs* quando

as sequências são analisadas separadamente para *M. ozzardi* e *M. perstans*; porém, quando analisadas em conjunto, levando em consideração os possíveis casos de coinfeção, este número aumenta para aproximadamente 85 variações. Esses resultados confirmam a existência de *M. ozzardi* e *M. perstans* em nossas amostras, verificadas por meio de três alvos de alta sensibilidade. *ITS1* se mostrou ser o melhor alvo para detecção, já conhecido como padrão-ouro de diagnóstico de parasitos filariais (Crainey et al., 2019; Medeiros et al., 2017; Tang et al., 2018; Tang et al., 2010) amplificando DNA de parasitos filariais do total de 48 amostras utilizadas neste estudo; enquanto o alvo *COI*, onde foi possível observar por meio de análises filogenéticas três possíveis haplótipos mitocondriais diferentes, e também verificar a maior contagem de variação de *SNPs*, sugere ser o melhor alvo para análises a nível populacional.

Foram utilizadas sequências de DNA de *Wolbachia* referente os alvos *16S*, *FTSZ*, *GROEL* e *GLTA* para avaliação de diversidade genética populacional da bactéria presente em parasitos filariais recuperados de amostras de São Gabriel da Cachoeira (figura 9). Para o alvo *16S*, visto que o mesmo é bastante conservado entre as bactérias, por meio de análises filogenéticas foi possível observar um único agrupamento das sequências recuperadas com referências de *C. lectularius* e *Mansonella* spp., com valor de bootstrap <60% (figura 9A), o que demonstra que este alvo não possui diversidade suficiente para separar as espécies em questão em agrupamentos bem definidos. Para o alvo *GLTA*, foi possível observar dois agrupamentos bem definidos juntamente a sequências de referência de *Wolbachia* de *M. perstans* e *M. ozzardi*, com apoio de bootstrap acima de 95% e 89%, respectivamente (figura 9B). Do total de 10 sequências observadas, uma delas agrupou com *M. perstans* (10%) enquanto as demais agruparam com referências de *Wolbachia* de *M. ozzardi* (90%). Este resultado corrobora os resultados obtidos para a amostra SP11-136S referente os alvos *ITS1* e *12S*, da qual foi possível recuperar exclusivamente sequência de *Wolbachia* de *M. perstans* para este alvo.

Para o alvo *GROEL*, foi possível observar um único agrupamento bem definido juntamente com as sequências de referência de *Wolbachia* de *M. ozzardi*, *M. perforata* e *C. lectularius*, com apoio de bootstrap de 100% (figura 9C). Do total de 12 sequências recuperadas, todas agruparam com referências de *Wolbachia* de *M. ozzardi*. É interessante ressaltar com base neste resultado, que a amostra SP11-136S classificada para os alvos *ITS1* e *12S* de filária, e *GltA* de *Wolbachia* como *M. perstans*, que para o alvo *GROEL* a mesma agrupou com as sequências de *M. ozzardi*, com apoio de bootstrap igual a 100%.

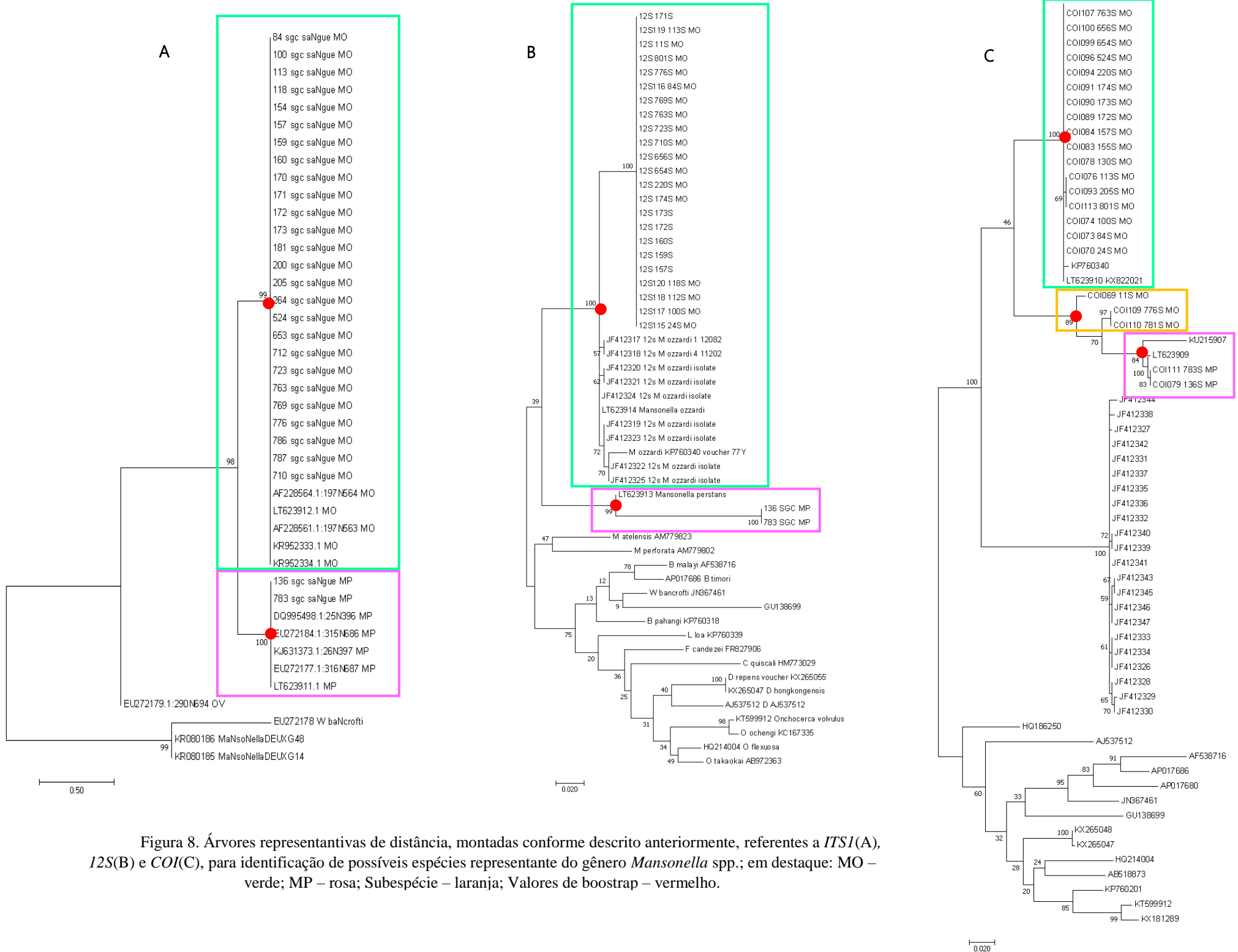


Figura 8. Árvores representativas de distância, montadas conforme descrito anteriormente, referentes a *ITS1*(A), *12S*(B) e *COI*(C), para identificação de possíveis espécies representante do gênero *Mansonella* spp.; em destaque: MO – verde; MP – rosa; Subespécie – laranja; Valores de bootstrap – vermelho.

Evidenciando mais uma vez a existência de coinfeção nas amostras de São Gabriel da Cachoeira. Para *FTSZ*, foi possível observar um único agrupamento bem definido com sequências de referência e apoio de bootstrap de 81%, identificando todas as amostras como *Wolbachia* de *M. ozzardi*, mesmo para as amostras 136 e 783 identificadas por *ITS1*, *12S* e *COI* como *M. perstans* (figura 9D). Do total de 45 sequências recuperadas, todas agruparam com *Wolbachia* de *M. ozzardi*, resultado este que corrobora a existência de casos de coinfeção pelos dois parasitos em São Gabriel da Cachoeira. Estes resultados, sugerem que as sequências recuperadas para os quatro alvos pertencem a *Wolbachia* tanto de *M. ozzardi* quanto de *M. perstans*. Vale ressaltar que as análises filogenéticas para os alvos de parasitos filariais corroboram os resultados obtidos nas análises filogenéticas de alvos de *Wolbachia*, evidenciando mais uma vez a presença de indivíduos monoinfectados por *M. ozzardi* ou *M. perstans*, e indivíduos coinfectados pelos dois parasitos.

Para as sequências recuperadas dos quatro alvos testados para *Wolbachia*, foi realizada a contagem de *SNPs* encontrados ao longo das sequências para verificação de diversidade genética entre a *Wolbachia* de *M. ozzardi* e *M. perstans*. Para *16S*, não foi observada a variação de nenhum *SNP*, confirmando o fato de que este alvo não possui diversidade suficiente para separar as espécies de parasitos em questão em agrupamentos bem definidos, conforme esperado, já que este alvo é utilizado principalmente para detecção por sua alta conservação. Para *GLTA*, entre sequências de *Wolbachia* de *M. ozzardi* foi observada apenas uma única variação. Pelo fato de só haver uma sequência de *Wolbachia* de *M. perstans*, não foi possível realizar uma contagem de *SNPs* significativa para este alvo. Para *GROEL*, foram obtidas apenas sequências referentes a *Wolbachia* de *M. ozzardi*, onde foi observada variação em 13 *SNPs*. Com base neste alvo, é interessante ressaltar que a amostra SP11-136S identificada até o momento como *M. perstans* para os demais alvos tanto de *Wolbachia* quanto de parasitos filariais, foi identificada como *Wolbachia* de *M. ozzardi*, o que sugere fortemente que casos de coinfeção também podem ser detectados com alvos de *Wolbachia*. Para o alvo *FtsZ* foram obtidas apenas sequências de *Wolbachia* de *M. ozzardi*, incluindo as amostras 136 e 783 classificadas anteriormente como *M. perstans*, onde foi possível observar variação em 8 *SNPs* e que evidencia mais uma vez a detecção de coinfeção utilizando alvos de *Wolbachia* de parasitos do gênero *Mansonella*.

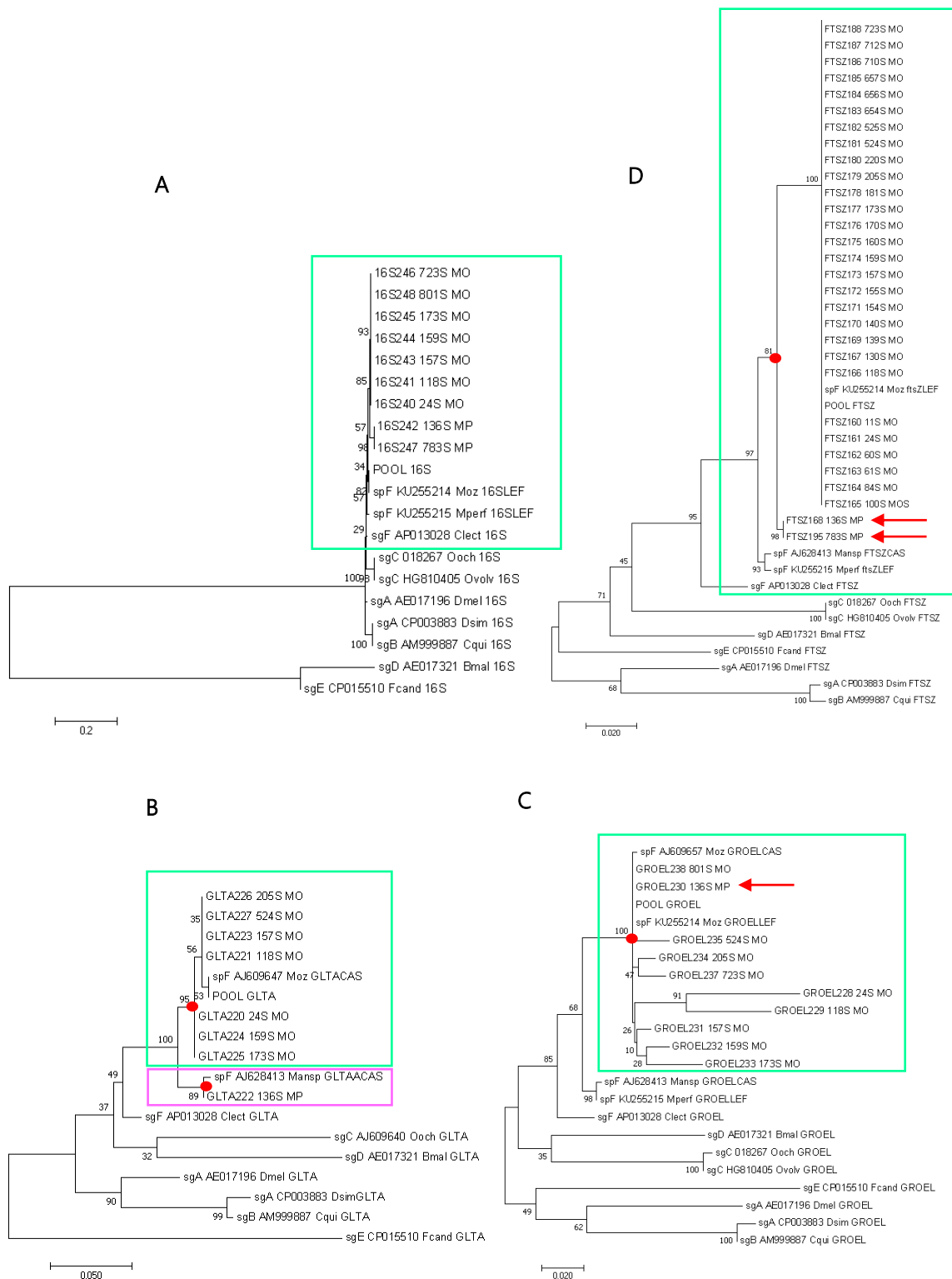


Figura 9. Árvores representativas de distância, montadas conforme descrito anteriormente, para os alvos *16S*(A), *FtsZ*(B), *GltA*(C) e *GroEL*(D), para identificação de *Wolbachia* que infecta parasitos do gênero *Mansonella* spp.; em destaque: MO – verde; MP – rosa; Valores de bootstrap – vermelho

Com os resultados obtidos até o presente momento é possível designar *16S* como o melhor alvo para detecção de *Wolbachia*, pois o mesmo foi capaz de amplificar para o total de amostras utilizadas neste estudo, apesar de não ser capaz de determinar

agrupamentos bem definidos no que diz respeito a *Wolbachia* de *M. ozzardi* e *M. perstans* (conforme já descrito na literatura, por este alvo ser de baixa diversidade e altamente conservado). E *GROEL* é sugerido como melhor alvo para análises a nível populacional por conta da maior contagem de variação de *SNPs*, apesar de só terem sido recuperadas sequências referentes a *Wolbachia* de *M. ozzardi*, este alvo também foi capaz de identificar possíveis amostras coinfectadas, bem como o alvo *FTSZ*. Maiores estudos a respeito deste supergrupo, o qual acredita-se que agrupa sequências de *Wolbachia* de *M. ozzardi*, *M. perstans* e *C. lectularius* (supergrupo F) se fazem necessários, podendo ajudar a compreender de que forma estes parasitos filariais passaram a ser infectados por *Wolbachia*, se a transferência ocorreu lateralmente, bem como se esse tipo de infecção é recente e simbiótico (Lefoulon et al, 2016; Coulibaly et al., 2009; Taylor et al., 2005).

6.6. Perspectivas sobre o uso de terapias de tratamento anti-*Wolbachia* em São Gabriel da Cachoeira

Nossos resultados sugerem que a *Wolbachia* está presente em todas as MFs de residentes acometidos por mansonelose em São Gabriel da Cachoeira. Sugere-se também que alguns daqueles indivíduos que foram diagnosticados com *M. perstans* por meio de PCR, podem ter mais de um tipo de infecção e também estar infectados com *M. ozzardi*. Partindo deste pressuposto, baseado no fato de que o tratamento com IVM para *M. ozzardi* ainda está em fase-teste (Basano et al. 2018); que IVM não possui efeito conhecido no tratamento para *M. perstans* (Geringher et al, 2014) e que alguns antibióticos tem sido efetivos no tratamento da maioria das filarioes (Jacobs et al., 2019; Johnston et al., 2017; Taylor et al, 2017; Albers et al, 2012;), sem a identificação correta do parasito se torna difícil escolher qual tratamento deve ser administrado.

Este estudo sugere que São Gabriel da Cachoeira pode ser um excelente local para teste de abordagens terapêuticas anti-*Wolbachia*, visto que neste município ocorre a coinfeção de *M. perstans* e *M. ozzardi* (dados não publicados). A presença da *Wolbachia* em ambos os parasitos possibilita a reprodução de testes já executados com parasitos como *B. malayi*, *W.bancrofti*, *O.volvulus* e *M. perstans*, utilizando a bactéria como alvo promissor de abordagens que visam sua eliminação por meio de tratamentos com antibióticos, sendo a DOX o mais utilizado atualmente (Johnston et al 2017; Taylor et al., 2017; Taylor et al., 2014; Geringher et al, 2014).

O grupo *A-Wol-Consortium* tem desenvolvido vários testes em busca novos compostos, que vão de medicamentos naturais a fármacos registrados visando otimizar o

tratamento para filaríoses tendo a *Wolbachia* como alvo (Jacobs et al., 2019; Johnston et al., 2017; Taylor et al., 2010). Em São Gabriel da Cachoeira, mais estudos se fazem necessários a respeito do tipo de relação da bactéria com os parasitos do gênero *Mansonella*. Caso esta relação venha a ser de simbiose ou mutualismo obrigatório como já descrito para maioria dos representantes da família Onchocercidae, o tratamento eliminando a *Wolbachia* de *M. perstans* e *M. ozzardi* ocasionando a morte dos adultos pode ser combinado com o tratamento atual feito com IVM, que tem como principal função o bloqueio da transmissão por meio da eliminação das MFs no sangue.

7. CONCLUSÕES

Portanto, com base nos resultados apresentados, é possível concluir que:

- Corroborar-se a existência de pelo menos dois parasitos do gênero *Mansonella* spp. no município de São Gabriel da Cachoeira, necessitando de maiores estudos, e que devem ser encorajadas a fazer parte de programas de políticas de tratamento;

- Sugere-se prevalência de infecção total por *Wolbachia* em MFs dos parasitos de *M. ozzardi* no município de São Gabriel da Cachoeira;

- Há na localidade em questão indivíduos monoinfectados e coinfectados (*M. perstans* e/ou *M. ozzardi*), detectados tanto por PCRs com alvos de parasitos filariais quanto alvos da *Wolbachia* que os infectam;

- Pode se verificar a presença de mais de um haplótipo mitocondrial no que diz respeito ao parasito *M. perstans*;

- Pode-se afirmar com base nas análises filogenéticas que a população de *Wolbachia* infectando parasitos filariais em São Gabriel da Cachoeira pertence ao supergrupo F;

- Foi observada uma baixa diversidade genética na população de *Wolbachia* estudada, com base nos alvos *FTSZ*, *GLTA* e *GROEL*;

- A presença de *Wolbachia* em parasitos de *M. perstans* e *M. ozzardi*, sendo estas pouco variáveis geneticamente, dão suporte para futuros estudos e experimentos de terapêuticas anti-*Wolbachia*, visto que apenas *M. ozzardi* se mostrou responsiva ao tratamento com IVM, e que em São Gabriel da Cachoeira existem fortes evidências de casos de coinfeção, se fazendo necessárias outras formas de tratamento para *M. perstans*;

8. MATERIAL SUPLEMENTAR

8.1. ANEXO 1 - Esquema básico de ciclagem da reação em cadeia da polimerase (PCR)

O esquema de ciclagem das PCRs e os protocolos otimizados mencionados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, determinados a partir dos experimentos descritos ao longo da metodologia, encontram-se descritos na tabela abaixo.

Tabela de Protocolos de Otimização de PCR

| ESQUEMA BÁSICO DE CICLAGEM DE REAÇÃO EM CADEIA A POLIMERASE | | | | | | | |
|---|------------------|-------------|------------------|-------------|------------------|-------------|------------------|
| Etapa 1: 2 minutos por 95-96°C; | | | | | | | |
| Etapa 2: 5-10 ciclos de 95-96°C por 50 segundos; 55-65°C por 50 segundos e 72°C por 50-75 segundos; | | | | | | | |
| Etapa 3: 30-35 ciclos de 95-96°C por 50 segundos; 50-55°C for 50 segundos seguido de 72°C por 75 segundos; | | | | | | | |
| Etapa 4: 72°C por 10 minutos | | | | | | | |
| PCRs para Detecção de Filárias | | | | | | | |
| PROTOCOLO | Ciclagem 1 | | Ciclagem 2 | | Ciclagem 3 | | Número de Ciclos |
| | Temperatura (°C) | Tempo (seg) | Temperatura (°C) | Tempo (seg) | Temperatura (°C) | Tempo (seg) | |
| LEF001 | 95 | 30 | 53 | 30 | 72 | 90 | 38X |
| LEF002 | 95 | 30 | 52 | 60 | 72 | 120 | 38X |
| LEF003 | 95 | 30 | 55 | 30 | 72 | 90 | 40X |
| LEF004 | 95 | 30 | 59 | 45 | 72 | 90 | 38X |
| LEF005 | 95 | 30 | 52 | 30 | 72 | 90 | 40X |
| LEF006 | 95 | 30 | 58 | 45 | 72 | 90 | 40X |
| LEF007* | 95 | 60 | 61.5 | 60 | 72 | 180 | 2X |
| LEF008 | 95 | 30 | 61.5 | 60 | 72 | 120 | 38X |
| MAR001 | 94 | 30 | 55 | 45 | 68 | 60 | 40x |
| TAN001 | 94 | 20 | 60 | 20 | 72 | 30 | 40X |
| TAN002 | 94 | 20 | 50 | 20 | 72 | 20 | 35X |
| LEF009 | 95 | 30 | 51.5 | 45 | 72 | 120 | 35X |
| LEF010 | 95 | 30 | 52 | 45 | 72 | 90 | 40X |
| LEF011 | 95 | 30 | 50 | 30 | 72 | 90 | 35X |
| LEF012 | 95 | 30 | 50 | 45 | 72 | 90 | 40X |
| LOR001* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 50 | 10X |
| LOR002* | 96 | 50 | 53 | 50 | 72 | 50 | 30X |
| LOR003* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| LOR004* | 96 | 50 | 54 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR005* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 50 | 10X |
| LOR006* | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 50 | 30X |
| LOR007* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| LOR008* | 96 | 50 | 53 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR009* | 96 | 45 | 60 | 45 | 72 | 75 | 5X |
| LOR010* | 96 | 45 | 53 | 45 | 72 | 75 | 35X |
| LOR011* | 94 | 45 | 60 | 45 | 72 | 80 | 10X |
| LOR012* | 94 | 45 | 55 | 45 | 72 | 80 | 30X |
| LOR013* | 96 | 45 | 60 | 45 | 72 | 75 | 5X |
| LOR014* | 96 | 45 | 53 | 45 | 72 | 75 | 35X |
| LOR015* | 94 | 45 | 60 | 45 | 72 | 90 | 10X |
| LOR016* | 94 | 45 | 52 | 45 | 72 | 90 | 30X |
| LOR017* | 96 | 45 | 58 | 45 | 72 | 70 | 5X |
| LOR018* | 96 | 45 | 50 | 45 | 72 | 70 | 35X |
| LOR019* | 94 | 30 | 65 | 30 | 72 | 120 | 10X |
| LOR020* | 94 | 30 | 55 | 30 | 72 | 120 | 30X |
| LOR021* | 95 | 30 | 68 | 45 | 72 | 120 | 5x |
| LOR022* | 95 | 30 | 60 | 45 | 72 | 75 | 35X |
| LOR023* | 96 | 50 | 54 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| LOR024* | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR025* | 96 | 50 | 54 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| LOR026* | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR027* | 96 | 50 | 63 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| LOR028* | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR029* | 96 | 50 | 63 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| LOR030* | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR031* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| LOR032* | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR033* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| LOR034* | 96 | 50 | 54 | 50 | 72 | 75 | 35X |

| | | | | | | | |
|---|----|----|----|----|----|----|-----|
| LOR021* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 53 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR022* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR023* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 55 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR024* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR025* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR026* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR027* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR028* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR029* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR030* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 55 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR031* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 54 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR032* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 53 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR033* | 96 | 50 | 60 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 53 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR034* | 96 | 50 | 60 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR035* | 96 | 50 | 60 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR036* | 96 | 50 | 60 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR037* | 96 | 50 | 60 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR038* | 96 | 50 | 60 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR039* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR040* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 57 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR041* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR042* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR043* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 53 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR044* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 54 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR045* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR046* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR047* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR048* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| LOR049* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 10x |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 75 | 30X |
| LOR050* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 75 | 5x |
| | 96 | 50 | 53 | 50 | 72 | 75 | 35X |
| PCRs para Detecção de Elementos Transponíveis de Wolbachia | | | | | | | |
| LOR051* | 96 | 50 | 63 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR052* | 96 | 50 | 58 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR053* | 96 | 50 | 60 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 50 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| PCRs para Detecção de Fagoss de Wolbachia | | | | | | | |
| LOR054* | 96 | 50 | 63 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR055* | 96 | 50 | 63 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR056* | 96 | 50 | 63 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR057* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 54 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR058* | 96 | 50 | 60 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR059* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 51 | 50 | 72 | 50 | 35X |
| LOR060* | 96 | 50 | 65 | 50 | 72 | 50 | 5X |
| | 96 | 50 | 52 | 50 | 72 | 50 | 35X |

*PCR Touchdown

9. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES (2017/2019)

| Atividades | 2017 | | | | 2018 | | | | | | | | | | | | 2019 | |
|---|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| | Set | Out | Nov | Dez | Jan | Fev | Mar | Abr | Mai | Jun | Jul | Ago | Set | Out | Nov | Dez | Jan | Fev |
| Revisão de Literatura | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Disciplinas | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | |
| Coleta de Amostras | | | | | | | | | X | X | | | | | | | | |
| Diagnósticos Moleculares para <i>Mansonella ozzardi</i> | | | | | | | | | X | X | X | X | X | X | | | | |
| Exame de Qualificação | | | | | | | X | | | | | | | | | | | |
| Desenho de Alvos Específicos para <i>Wolbachia</i> | | | | | | | | | | | | X | X | X | | | | |
| Padronização de Alvos para <i>Wolbachia</i> | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | X | X | |
| Diagnósticos Moleculares para <i>Wolbachia</i> | | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X | |
| Sequenciamento e Análise de Dados | | | | | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Análises Filogenéticas | | | | | | | | | | | | | | | | X | X | X |
| Elaboração da Dissertação | | | | | | | | | | | | | | | | X | X | X |
| Defesa da Dissertação | | | | | | | | | | | | | | | | | | X |

10. 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. <https://doi.org/10.1111/trf.15101>
- Albers, A; Esum, ME; Tendongfor, N; Enyong, P; Klarmann, U; Wanji, S; Hoerauf, A; Pfarr, K. (2012). Retarded *Onchocerca volvulus* L1 to L3 larval development in the *Simulium damnosum* vector after anti-*wolbachial* treatment of the human host. *Parasit Vectors*.
- Aljayyousi, G.; Tyrer, HE.; Ford, L.; Sjoberg, H.; Pionnier, N.; Waterhouse, D.; Davies, J.; Gamble, J.; Metugene, H.; Cook, DAN.; Steven, A.; Sharma, R.; Guimaraes, AF.; Clare, RH.; Cassidy, A.; Johnston, KL.; Myhill, L.; Hayward, L.; Wanji, S.; Turner, JD.; Taylor, MJ.; Ward, AS. (2017) Short-course, high-dose rifampicin achieves *Wolbachia* depletion predictive of curative outcomes in preclinical models of lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Scientific Reports*.
- Armoo, S.; Doyle, SR.; Osei-Atweneboana, MY.; Grant, WN. (2017) Significant heterogeneity in *Wolbachia* copy number within and between populations of *Onchocerca volvulus* Armoo et al. *Parasites & Vectors* (2017) 10:188 DOI 10.1186/s13071-017-2126-4
- Basano, AB.; Aranha Camargo, JS.; Fontes, G.; Pereira, AR.; Medeiros, JF.; Laudisse, COM.; Ferreira, RGM.; Aranha Camargo, LM (2018) Phase III Clinical Trial to Evaluate Ivermectin in the Reduction of *Mansonella ozzardi* infection in the Brazilian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 98, Issue 3, Mar 2018, p. 786 – 790. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0698>
- 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*.
- Bordenstein, SR; Paraskevopoulos, C; Julie C. Dunning Hotopp Panagiotis Sapountzis Nathan Lo Claudio Bandi Hervé Tettelin John H. Werren Kostas Bourtzis (2009) Parasitism and Mutualism in *Wolbachia*: What the Phylogenomic Trees Can and Cannot Say *Molecular Biology and Evolution*, Volume 26, Issue 1, 1 January 2009, Pages 231–241, <https://doi.org/10.1093/molbev/msn243>.
- Bowman, DD. (2011) Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia* and *Anaplasma*. *Topical Review*.
- Caragata, EP. and Moreira LA. (2017) *Wolbachia*: Influence on pathogeny, treatment and control of arthropod-borne diseases. In: *Arthropod borne disease*, Springer, Heidelberg, Germany Marcondes, C.B. (Ed.) In press.
- Casiraghi, M; Bordenstein, SR; Baldo, L; Lo, N; Beninati, T; Wernegreen, JJ; Werren, JH; Bandi, C. (2005) Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology Res*.
- Clare, RH; Cook, DA; Johnston, KL1; Ford, L; Ward, AS; Taylor, MJ. (2015) Development and validation of a high-throughput anti-*Wolbachia* whole-cell screen: a route to macrofilaricidal drugs against onchocerciasis and lymphatic filariasis. *J Biomol Screen*.
- Comandatore, F.; Cordaux, R.; Bandi, C.; Blaxter, M; Darby, A.; Makepeace, BJ.; Montagna, M.; Sasser, D.(2015) Supergroup C *Wolbachia*, mutualist symbionts of filarial nematodes, have a distinct genome structure. *The Royal Society*. 01 December 2015. doi.org/10.1098/rsob.150099

- Coulibaly, YI; Dembele, B; Diallo, AA; Lipner, EM; Doumbia, SS; Coulibaly, SY; Konate, S; Diallo, DA; Yalcouye, D; Kubofcik, J; Doumbo, OK; Traore, AK; Keita, AD; Fay, MP; Traore, SF; Nutman, TB; Klion, AD. (2009) A randomized trial of doxycycline for *Mansonella perstans* infection. *New England Journal Med.*
- Crainey, JL; Marín, MA; Silva, TRR; Medeiros, JF; Pessoa, FAC; Santos, YV; Vicente, ACP; Luz, SLB. *Mansonella ozzardi* mitogenome and pseudogene characterization provides new perspectives on filarial parasite systematics and CO-1 barcoding. *SCIENTIFIC RePortS* | (2018) 8:6158 | DOI:10.1038/s41598-018-24382-3. 2018 (A)
- Crainey, JL. e Luz, SLB. (2018). Light Microscopic Detection of *Mansonella ozzardi* Parasitemias. *Clinical Infectious Diseases*. DOI:10.1093/cid/ciy1055 (B)
- Crainey, JL; Medeiros, JF; Pessoa, FAC; Luz, SLB. *Arthropode-Borne Diseases*. Chapter 25: Onchocerciasis. p. 383-404. 2017 (A).
- Crainey JL, Hurst J, Lamberton PHL, Cheke RA, Griffin CE, Wilson MD, de Araújo CPM, Basáñez MG, Post RJ. The Genomic Architecture of Novel *Simulium damnosum* Wolbachia Prophage Sequence Elements and Implications for Onchocerciasis Epidemiology. *Front Microbiol.* 2017 May 29;8:852. doi: 10.3389/fmicb.2017.00852. eCollection 2017(B).
- Crainey JL; M.D. Wilson b, R.J. Post; Phylogenetically distinct Wolbachia gene and pseudogene sequences obtained from the African onchocerciasis vector *Simulium squamosum*. *International Journal for Parasitology* doi:10.1016/j.ijpara.2009.10.017. 2010
- Fenn, K. and Blaxter, M.: Wolbachia genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism (2006). VOLUME 22, ISSUE 2, P60-65, Trends in parasitology FEBRUARY 01, 2006
- Foster, J.; Ganatra, M.; Kamal, I. (2005) The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PloS Bio.*
- Gehring, C; Kreidenweiss, A; Flamen, A; Antony, JS; Grobusch, MP; B elard, S. (2014) Molecular Evidence of Wolbachia Endosymbiosis in *Mansonella perstans* in Gabon, Central Africa. *The Journal of Infectious Diseases*
- Genchi, C; Kramer, LH; Sasser, D; Bandi, C. (2012) Wolbachia and its implications for the immunopathology of filariasis. *Endocr. Metab. Immune Disord.*
- Grillet ME.; Villena, JVH.; Llewellyn, MS.; Mondofi, AEP.; Tami, A.; Gonzalez, MFV.; Marquez, M.; et al (2019) Venezuela's humanitarian crisis, resurgence of vector-borne diseases, and implications of spillover in the region. *The Lancet.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30757-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30757-6). 2019
- Grobusch, MP; Kombila, M; Autenrieth, I; Mehlhorn, H; Kremsner, PG. (2003) No evidence of Wolbachia endosymbiosis with *Loa Loa* and *Mansonella perstans*, *Parasitol. Res.*
- Hall, TA. BioEdit: A User Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98NT. Atualiza o: 2010.
- Hertig, M. and Wolbach, SB. (1924) Studies on Rickettsia-like Microorganisms in insects. Department of Pathology, Harvard University Medical School.
- Hurst, GDD. And Jiggins, FM.;(2015) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. R. Soc. B* (2005) 272, 1525–1534 - doi:10.1098/rspb.2005.3056 July 2005
- Keiser PB, Coulibaly Y, Kubofcik J, Diallo AA, Klion AD, Traore SF, Nutman TB. (2008) Molecular identification of Wolbachia from the filarial nematode *Mansonella perstans*. *Mol Biochem. Parasitol.*

- Kramer, L. and Genchi, C. (2014) Where are we with Wolbachia and doxycycline: and in-depth review of the current state of knowledge. *Vet. Parasitol.*
- Kramer, L; Grandi, G; Leoni, M; Passeri, B; McCall, J; Genchi, C; Mortarino, M; Bazzochi, C; (2008) Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaris immitis* infection. *Veterinary Parasitology.*
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. 2017;33(7):1870–4.
- Jacobs, RT.; Lunde, CS.; Freund, YR; Hernandez, V.; Li, X.; Xia, Y. Carter, DS; Berry, P.; Halladay, J.; Rock, F.; Stefanakis, R.; Easom, EE.; Jacob J. Plattner, Louise Ford, Kelly L Johnston, Darren A.N. Cook, Rachel Clare, Andrew Cassidy, Laura Myhill, Hayley Tyrer, Joanne Gamble, Ana F Guimaraes, Andrew Steven, Franziska Lenz, Alexandra Ehrens, Stefan J Frohberger, Marianne Koschel, Achim Hoerauf, Marc P Hübner, Case McNamara, Malina A Bakowski, Joseph D Turner, Mark J Taylor, and Stephen A. Ward (2019) Boron-Pleuromutilins as Anti-Wolbachia Agents with Potential for Treatment of Onchocerciasis and Lymphatic Filariasis. *J. Med. Chem.*, Accepted Manuscript • DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01854 • 07 Feb 2019
- Johnston, KL; Cook, DAN.; Berry, NG; Hong, WD.; Clare, RH.; Goddard, M.; Ford, L; Nixon, GL.; O'Neil, PM.; Ward, AS.; Taylor, MJ. (2017) Identification and prioritization of novel anti-Wolbachia chemotypes from screening a 10,000-compound diversity library. *Sci. Adv.*
- Johnston, KL; Ford, L; Umareddy, I; Townson, S; Specht, S; Pfarr, K; Houerauf, A; Altmeyer, R; Taylor, MJ. (2014) Repurposing of approved drugs from the human pharmacopoeia to target Wolbachia endosymbionts of onchocerciasis and lymphatic filariasis. *International journal for parasitology: Drugs and drug resistance.*
- Johnston, KL; Ford, L; Taylor, MJ. (2014) Overcoming the challenges of drug Discovery for neglected tropical disease: The A-WOL Experience. *Journal of Biomolecular Screening.*
- Kent, BN.; Funkhouser LJ, Setia S, Bordenstein SR. (2011) Evolutionary genomics of a temperate bacteriophage in an obligate intracellular bacteria (Wolbachia). *PLoS One.* 2011;6(9):e24984. doi: 10.1371/journal.pone.0024984.
- Landmann, F.; Voronin, D.; Sullivan, W. Taylor, MJ. (2011) Anti-filarial activity of antibiotic therapy is due to extensive apoptosis after Wolbachia depletion from filarial nematodes. *PLoS Pathogens.*
- Lefoulon, E.; Bain, O; Makepeace, BL; d'Haese, C.; Uni, S; Martin, C; Gavotte, L. (2016) Breakdown the coevolution between symbiotic bacteria Wolbachia and their filarial hosts. *PeerJ.*
- Lefoulon E, Bain O, Bourret J, Junker K, Guerrero R, et al. (2015) Shaking the Tree: Multi-locus Sequence Typing Usurps Current Onchocercid (Filarial Nematode) Phylogeny. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9(11): e0004233. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004233>
- Lima, NF; Veggiani Aybar, CA; Dantur Juri, MJ; Ferreira, MU¹. (2016) *Mansonella ozzardi*: a neglected New World filarial nematode. *Pathog Glob Health.* 2016 May;110(3):97-107. doi: 10.1080/20477724.2016.1190544
- Marcos, LA.; Arrospide, N.; Recuenco, S.; Cabezas, C.; Weil, GJ.; Fischer, PU. (2012) Report: Genetic characterization of atypical *Mansonella (Mansonella) ozzardi* microfilariae in human blood samples from northeastern Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
- McGarry, HF; Egerton, GL; Taylor, MJ. (2004) Population dynamics of Wolbachia bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology.*

- Medeiros JF, Py-Daniel V, Barbosa, UC. (2009) *Mansonella ozzardi* in Brazil: prevalence of infection in riverine communities in the Purus region, in the state of Amazonas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.
- 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
- Medeiros JF, Crainey JL, Pessoa FAC, Luz, SLB. (2017) *Mansonelliasis* In: *Arthropod borne disease*, Springer, Heidelberg, Germany Marcondes, C.B. (Ed.) In press.
- Mourembou G.; Fenollar F.; Lekana-Douki JB; Ndjoyi Mbiguino A; Maghendji Nzondo S; Matsiegui PB; Zoleko Manego R; Ehounoud CH; Bittar F; Raoult D; Mediannikov O. (2015) *Mansonella*, including a Potential New Species, as Common Parasites in Children in Gabon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Oct 20;9(10):e0004155. doi: 10.1371/journal.pntd.0004155. eCollection 2015.
- Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T. Evolutionary origin of insect-Wolbachia nutritional mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 15;111(28):10257-62. doi: 10.1073/pnas.1409284111.
- Oliveira, KWS.; Silva, TRR.; Luz, SLB.; Medeiros, JF; Pessoa, FAC.; Crainey, J L. (2015) The development of MLST-typing for the identification and classification of *M. ozzardi* derived Wolbachia from Brazilian Amazon.
- Saridaki, A.; Bourtzis, K. (2010) Wolbachia: more than just a bug in insects genitals. *Curr Opin Microbiol*.
- 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*.
- Silva, LBT. (2016) *Mansonelose* no Município de São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brasil. *Dissertação de Mestrado. ILMD/Fiocruz-AM*.
- Silva, LBT; Crainey, JL; Ribeiro da Silva, TR; Suwa, UF; Vicente, ACP; Medeiros, JF; Pessoa, FAC; Luz, SLB. (2017) Molecular Verification of New World *Mansonella perstans* Parasitemias. *Emerging Infectious Diseases*.
- Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C. (1995) Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont Wolbachia in a filarial worm. *Molecular and Biochemical Parasitology*.
- Slatko, BE.; Taylor, MJ; Foster, JM. (2010) The Wolbachia endosymbiont as an antifilarial nematode target. *Symbiosis – Molec. Parasitol. Div*.
- Tanaka, K.; Furukawa, S.; Nikoh, N.; Sasaki, T; Fukatsu, T. Complete WO Phage Sequences Reveal Their Dynamic Evolution Trajectories and Putative Functional Elements Required for Integration into the Wolbachia Genome. *Applied and Environmental Microbiology*. P. 5676-5686. 2009
- Tang, T-HT; Crainey, JL; Post, RJ; Luz, SLB; Rubio, JM; *Mansonellosis: current perspectives*. *Research and Reports in Tropical Medicine*. (1-16), January, 2018.
- Tang T-HT, López-Vélez R, Lanza M, Shelley AJ, Rubio JM, Luz SLB (2010). Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans*.
- Taylor, MF. (2002) Wolbachia bacterial endosymbionts. In: Klei, TR, Rajan, TV; *The filaria*. Kluwer Academic Publishers.

Taylor, MJ.; Bandi, C.; Hoerauf, A. (2005) Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv. Parasitol.*

Taylor, MJ.; Hoerauf, A.; Townson, S.; Slakto, BE.; Ward, AS. (2014) Anti-Wolbachia drug Discovery and development: safe macrofilaricides for onchocerciasis and lymphatic filariasis. *Parasitology.*

Yarzabal L, Basáñez MG, Ramírez-Pérez J, Ramírez A, Botto C, Yarzabal A. (1985) Experimental and natural infection of *Simulium sanchezi* by *Mansonella ozzardi* in the Middle Orinoco region of Venezuela.

Yilmaz E, Fritzenwanker M, Pantchev N, Lendner M, Wongkamchai S, Otranto D, Kroidl I, Dennebaum M, Le TH, Anh Le T, Ramünke S, Schaper R, von Samson-Himmelstjerna G, Poppert S, Krücken J. The Mitochondrial Genomes of the Zoonotic Canine Filarial Parasites *Dirofilaria (Nochtiella) repens* and *Candidatus Dirofilaria (Nochtiella) Honkongensis* Provide Evidence for Presence of Cryptic Species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Oct 11;10(10):e0005028. doi: 10.1371/journal.pntd.0005028. eCollection 2016 Oct.