

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

LUÍSA MARIA INÁCIO DA SILVA

DETECÇÃO MOLECULAR DA BACTÉRIA *WOLBACHIA PIPIENTIS* EM
MOSQUITOS SILVESTRES NO MUNICÍPIO DE RECIFE

RECIFE

2021

LUÍSA MARIA INÁCIO DA SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DA BACTÉRIA *WOLBACHIA PIPIENTIS* EM
MOSQUITOS SILVESTRES NO MUNICÍPIO DE RECIFE**

Dissertação apresentada ao Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do grau de Mestre em ciências.

Orientador: Dr. Gabriel da Luz Wallau

Coorientador: Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva

RECIFE

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

- S586d Silva, Luísa Maria Inácio.
Detecção molecular da bactéria *Wolbachia pipientis* em mosquitos silvestres no município de Recife / Luísa Maria Inácio da Silva. — Recife: [s.n.], 2021.
103 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) — Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.
Orientador: Gabriel da Luz Wallau; coorientador: Marcelo Henrique Santos Paiva.
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.
1. *Wolbachia* - genética. 2. Culicidae - microbiologia. 3. Controle de Mosquitos - métodos. 4. Controle de vetores. 5. Ecologia de insetos. 6. Mosquitos Vetores. 7. Controle Biológico de Vetores. 8. Filogenia. I. Wallau, Gabriel da Luz. II. Paiva, Marcelo Henrique Santos. III. Título.

LUÍSA MARIA INÁCIO DA SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DA BACTÉRIA *WOLBACHIA PIPIENTIS* EM
MOSQUITOS SILVESTRES NO MUNICÍPIO DE RECIFE**

Dissertação apresentada ao Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do grau de Mestre em ciências.

Data de aprovação: 21 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Drº Marcelo Henrique Santos Paiva
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Drº Elgion Lucio da Silva Loreto
Universidade Federal de Santa Maria

Drº Danilo Elias Xavier
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Aos meus pais, Dinaldo e Edineide, pelo apoio
e amor incondicional

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Gabriel Wallau, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por todo conhecimento transmitido.

Ao meu coorientador, Dr. Marcelo Henrique, pelos ensinamentos, apoio, cuidado e por ser uma inspiração.

À Larissa, Júnior e Filipe cujo companheirismo foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho, através das discussões e contribuições científicas, e das inúmeras vezes que me apoiaram, ouviram e incentivaram. Obrigada por toda ajuda.

À minha família, que sempre me incentivou, apoiou, acreditou em mim, e comemorou todas as pequenas e grandes conquistas, mesmo nem sempre as entendendo muito bem.

Às amigas que construí na turma do Mestrado que compartilharam comigo as dificuldades e alegrias desse processo.

A Alexandre pela companhia nas coletas e por compartilhar o amor por mosquitos.

A todos que constituem o departamento de Entomologia, sempre dispostos a ajudar e compartilhar conhecimento.

Aos professores das disciplinas de Mestrado que contribuíram para a construção do conhecimento científico e pensamento crítico.

Ao Instituto Aggeu Magalhães e a FIOCRUZ pela infraestrutura e por ser fonte de inspiração e resistência.

À FACEPE e CNPq pela bolsa, infraestrutura e incentivo à pesquisa científica.

INÁCIO DA SILVA, Luísa Maria. **Detecção molecular da bactéria *Wolbachia pipientis* em mosquitos silvestres no município de Recife**. 2021. Dissertação (Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

Wolbachia pipientis é uma bactéria endossimbionte de artrópodes e nematóides filariais, presente naturalmente em cerca de 76% das espécies de insetos. Essa bactéria pode ser transmitida verticalmente (da fêmea para a prole) e horizontalmente (entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes). Nos últimos anos, diferentes linhagens de *Wolbachia* tem sido utilizadas como ferramenta biotecnológica para redução da transmissão de arbovírus, através da liberação de mosquitos transfectados na natureza. A cidade do Recife é um possível alvo para aplicação da técnica devido a sua situação epidemiológica, sendo imprescindível o estudo da diversidade da população natural de *Wolbachia* em culicídeos presentes na cidade antes da implementação de tal programa. Assim, o objetivo deste trabalho foi de caracterizar a diversidade de linhagens de *Wolbachia*, bem como calcular a taxa de infecção e sua distribuição em populações naturais de mosquitos silvestres em Recife. Para tanto, foram realizadas coletas de culicídeos em duas áreas de resquício de mata atlântica do município, durante o ano de 2019. A detecção das linhagens de *Wolbachia* foi realizada a partir da extração de DNA, PCR para o gene *wsp* e regiões específicas para os supergrupos A e B; seguida de sequenciamento de um fragmento do gene *wsp*. Ao todo 195 amostras de mosquitos foram avaliadas quanto à presença de *Wolbachia*. Estas amostras foram pertencentes a 10 espécies, de cinco gêneros distintos de culicídeos. Das espécies analisadas, oito não haviam sido avaliadas até o momento quanto à presença de *Wolbachia* no mundo, e duas delas ainda não foram reportadas em circulação no município de Recife. Cerca de 67% das amostras analisadas foram consideradas positivas para *Wolbachia*, sendo encontrados os supergrupos A e B e uma taxa de infecção média de 49%. Os resultados obtidos neste trabalho são inéditos e contribuem para a ampliação do conhecimento sobre diversidade de *Wolbachia* em culicídeos.

Palavras-chave: *Wolbachia*; Culicidae; Bactéria.

INÁCIO DA SILVA, Luísa Maria. **Molecular detection of *Wolbachia pipientis* bacteria in wild mosquitoes in the city of Recife.** 2021. Dissertação (Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

ABSTRACT

Wolbachia pipientis is an endosymbiont bacterium from arthropods and filarial nematodes and naturally present in about 76% of insect species. This bacterium can be transmitted both vertically (from female to offspring) and horizontally (between individuals of the same or different species). In recent years, different *Wolbachia* strains have been used as a biotechnological tool to reduce arbovirus transmission, through the release of transfected mosquitoes into natural populations. The city of Recife is a possible target for the application of the technique due to its epidemiological situation, being essential to study the diversity of the natural population of *Wolbachia* in culicids present in the city before the implementation of the program. Thus, the objective of this work was to characterize the diversity of *Wolbachia* strains, as to evaluate the infection rate and its distribution in natural populations of sylvatic mosquitoes in the city of Recife. For this purpose, collections of culicids were carried out in two remnants areas of Atlantic Forest in the city in 2019. The detection of *Wolbachia* strains was carried out through DNA extraction, PCR for the *wsp* gene and specific regions for supergroups A and B; followed by sequencing of the *wsp* gene. In total, 195 samples were analyzed for the presence of *Wolbachia*. This samples belongs to 10 species of five different genera of culicids. Of the species analyzed, eight had not yet been evaluated for the presence of *Wolbachia* in the world, and two of them had not been reported in the city of Recife. About 67% of the analyzed samples were considered positive for *Wolbachia*, with supergroups A and B being found and an average infection rate of 49%. The results obtained in this work are unprecedented and contribute to the expansion of knowledge about *Wolbachia* diversity in culicids.

Key-words: *Wolbachia*, Culicidae, Bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	<i>Wolbachia pipientis</i> nos ovários de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .	16
Figura 2-	Ordens do filo Arthropoda e Nematoda onde já foram encontradas espécies infectadas naturalmente com a bactéria <i>Wolbachia</i> . Figura representando <i>Wolbachia</i> no centro e ao redor exemplos de espécies das ordens infectadas com <i>Wolbachia</i> .	17
Figura 3-	Árvores filogenéticas dos supergrupos de <i>Wolbachia</i> .	20
Figura 4-	Árvore filogenética não-enraizada dos supergrupos de <i>Wolbachia</i> relacionados aos seus hospedeiros.	21
Figura 5 -	Filogenia datada de <i>Wolbachia</i> demonstrando a origem dos supergrupos A e B e do último ancestral comum.	22
Figura 6-	Espectro de simbioses realizadas por <i>Wolbachia</i> .	23
Figura 7-	Fenótipos induzidos por <i>Wolbachia pipientis</i> em artrópodes.	25
Figura 8-	Esquema detalhando situações que podem ou não gerar incompatibilidade citoplasmática em insetos infectados com <i>Wolbachia</i> .	26
Figura 9-	Mapa do genoma da cepa wMel de <i>Wolbachia</i> , mostrando a localização de cinco genes conservados e do gene <i>wsp</i> .	29
Figura 10-	Gêneros da família Culicidae avaliados quanto à presença de <i>Wolbachia</i> .	31
Figura 11-	Esquema ilustrando a redução de uma determinada população de mosquitos após a liberação de machos infectados com <i>Wolbachia</i> .	35
Figura 12	Esquema ilustrando a substituição de uma população de mosquitos após a liberação de mosquitos infectados com <i>Wolbachia</i> .	37
Figura 13-	Mapa do município de Recife demonstrando os locais de coleta de culicídeos.	45
Figura 14-	Puçá entomológico utilizado para coletas de mosquitos em ambientes silvestres.	46
Figura 15-	Fluxograma metodológico.	47
Figura 16-	Proporção de espécimes das diferentes espécies de culicídeos coletadas nos dois locais de coleta do município de Recife.	55
Figura 17-	Espécies analisadas quanto a presença de <i>Wolbachia</i> e o número de amostras positivas para o gene <i>wsp</i> .	56
Figura 18-	Gel de agarose a 1,5 % demonstrando o padrão de banda encontrado para o gene <i>wsp</i> , com amplificação de 550 pb.	57

Figura 19-	Gel de agarose a 1,5 % demonstrando o padrão de banda encontrado para os fragmentos específicos dos supergrupos A e B de <i>Wolbachia</i> .	58
Figura 20-	Gel de agarose a 1,5% revelando diferentes tamanhos de fragmentos amplificados para a PCR realizada para a região que caracteriza <i>Wolbachia</i> do supergrupo A.	59
Figura 21-	Árvore filogenética com sequências do gene <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> .	63
Figura 22-	Árvore filogenética com sequências do gene <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> em maior aumento destacando os ramos I e II.	64
Figura 23-	Árvore filogenética com sequências do gene <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> em maior aumento destacando o ramo III.	65
Figura 24-	Árvore filogenética com sequências do gene <i>wsp</i> de <i>Wolbachia</i> em maior aumento destacando os ramos IV e V.	66
Figura 25-	Distribuição dos supergrupos de <i>Wolbachia</i> por local de coleta de acordo com análise filogenética das sequências.	68
Figura 26-	Árvore filogenética do genoma mitocondrial dos culicídeos positivos para <i>Wolbachia</i> e a respectiva proporção de positividade para o gene <i>wsp</i> .	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	Microlitro
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
COI	Citocromo C Oxidase subunidade I
DENV	<i>Dengue virus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IC	Incompatibilidade Citoplasmática
JBR	Jardim Botânico do Recife
kb	Kilobases
Ma	Milhões de anos
MAYV	<i>Mayaro virus</i>
mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mM	Milimolar
NCBI	<i>National Centers of Biotechnology Information</i>
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEDI	Parque Ecológico de Dois Irmãos
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Rotação por minuto

rRNAs	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
sRNA	<i>Small Ribonucleic acid</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TH	Transmissão horizontal
TIE	Técnica do Inseto Estéril
TLG	Transferência lateral de genes
tmRNA	<i>Transfer-messenger RNA</i>
tRNAs	<i>Transfer RNA</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow Fever virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 <i>Wolbachia pipientis</i>	16
2.2 Classificação de <i>Wolbachia pipientis</i>	18
2.3 Fenótipos induzidos por <i>Wolbachia</i>	23
2.4 Características genômicas de <i>Wolbachia pipientis</i>	27
2.5 Distribuição de <i>Wolbachia pipientis</i> em culicídeos	30
2.6 Histórico do uso de linhagens do gênero <i>Wolbachia</i>	34
2.6.1 Utilização de <i>Wolbachia</i> para redução de população de culicídeos	34
2.6.2 Utilização de <i>Wolbachia</i> para redução da transmissão de arbovírus por culicídeos	36
3 JUSTIFICATIVA	41
4 PERGUNTA CONDUTORA	42
5 HIPÓTESE	43
6 OBJETIVO GERAL	44
6.1 Objetivos específicos	44
7 MATERIAIS E MÉTODOS	45
7.1 Área de estudo	45
7.2 Coleta e amostragem	46
7.3 Extração de DNA	48
7.4 Análises moleculares para detecção de <i>Wolbachia pipientis</i>	48
7.5 Sequenciamento	49
7.6 Análise dos dados	50
8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	52
9 RESULTADOS	53
9.1 Coleta e amostragem	53
9.2 Detecção e identificação molecular de <i>Wolbachia</i>	56
9.2.1 Amplificação do gene <i>wsp</i>	56
9.2.2 Caracterizações das linhagens de <i>Wolbachia</i>	57
9.2.2.1 Análises moleculares	57
9.2.2.2 Análises filogenéticas	61

9.3 Correlação entre <i>Wolbachia</i> e seus hospedeiros	70
10 DISCUSSÃO	72
11 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE - MATRIZ DE DISTÂNCIA NUCLEOTÍDICA CALCULADA PARA AS SEQUÊNCIAS UTILIZADAS PARA CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA	
ANEXO - AUTORIZAÇÃO DO ICMBIO PARA REALIZAÇÃO DE COLETA DE CULICÍDEOS	

1 INTRODUÇÃO

Wolbachia pipientis é uma bactéria endossimbionte da ordem das Rickettsiales, presente naturalmente em diversas ordens de insetos e nematóides filariais. Linhagens do gênero *Wolbachia* são transmitidas através da transmissão vertical (da fêmea para a prole) e horizontal (entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes) entre indivíduos de uma população (HILGENBOECKER *et al.*, 2008; JEYAPRAKASH; HOY, 2000). As interações simbióticas realizadas por *Wolbachia* e o hospedeiro variam de mutualismo a parasitismo e algumas linhagens são conhecidas devido a sua capacidade de manipular o sistema reprodutivo do hospedeiro, beneficiando sua transmissão para as próximas gerações (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

Apesar de ser considerada como uma única espécie, *W. pipientis* apresenta uma grande diversidade genômica e uma variedade de efeitos nos seus hospedeiros (WERREN; BALDO; CLARK, 2008). Estudos baseados em filogenômica e distribuição em táxons de hospedeiros sugerem que *W. pipientis* seja dividida em 17 supergrupos (A-R), dos quais as linhagens dos supergrupos A e B apresentam-se como as mais prevalentes e distribuídas em artrópodes, incluindo insetos, enquanto que os os supergrupos C e D estão presentes em nematóides filariais (AUGUSTINOS *et al.*, 2011; CASIRAGHI *et al.*, 2005; GLOWSKA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014).

Linhagens do gênero *Wolbachia* são reportadas em diversos gêneros de mosquitos, incluindo *Culex* com a cepa wPip (KARAMI *et al.*, 2016; WIWATANARATANABUTR, 2013), *Mansonia* e *Coquillettidia* com as cepas encontradas wRiv e wCon, e wHaw e wCon, respectivamente (KITAYAPONG *et al.*, 2000). No gênero *Aedes*, algumas espécies são consideradas hospedeiras naturais de *Wolbachia*, como o *Aedes albopictus* com as cepas wAlbA e wAlbB (CARAGATA; DUTRA; MOREIRA, 2016; KITAYAPONG; BAIMAI; O'NEILL, 2002). Dados discordantes são encontrados na literatura para a espécie *Aedes aegypti*, uma vez que na maioria das populações de mosquitos estudadas até o momento não foi possível observar a presença de *Wolbachia*. Entretanto, dois estudos recentes reportaram a presença da bactéria em diversos órgãos do mosquito, provenientes da Índia e Filipinas (BALAJI; JAYACHANDRAN; PRABAGARAN, 2019; CARVAJAL *et al.*, 2019). Em *Anopheles*, a maioria dos trabalhos mostra que não há infecção natural de *Wolbachia* no gênero, entretanto, outros estudos já descreveram a presença da bactéria em *Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles moucheti* e *Anopheles funestus* (BALDINI *et al.*, 2014, 2018; SHAW *et al.*, 2016). Do total de espécies de culicídeos

registrados, apenas 6% foram investigadas quanto à presença de *Wolbachia* (INÁCIO DA SILVA *et al.*, 2021).

A infecção por algumas cepas de *Wolbachia* pode gerar uma variedade de efeitos fenotípicos em seus hospedeiros, tais como partenogênese e feminização da prole (CLARK, 2007; VANDEKERCKHOVE; WATTEYNE; BONNE, 2003). Diante dessas características, linhagens específicas do gênero *Wolbachia* passaram a ser utilizadas como uma ferramenta biotecnológica para redução da população de mosquitos ou redução da transmissão viral. A primeira abordagem foca na liberação somente de machos infectados por *Wolbachia* e se baseia no fenômeno denominado incompatibilidade citoplasmática, que ocorre quando há o cruzamento de machos infectados com *Wolbachia* com fêmeas selvagens (sem *Wolbachia*) e resulta na morte da prole ou em uma prole infértil (ATYAME, *et al.*, 2011). A cepa *wMel* de *W. pipientis*, que pertence ao supergrupo A e foi originalmente descrita infectando *Drosophila melanogaster* é capaz de limitar ou suprimir a transmissão dos vírus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) quando transfectada em *Ae. aegypti* (DUTRA *et al.*, 2016; HOFFMANN, *et al.*, 2011; MOREIRA, *et al.*, 2009). Assim, a segunda abordagem é baseada na liberação de machos e fêmeas de *Ae. aegypti* infectados com a bactéria, visando a substituição das populações naturais (não infectadas pela *wMel* e com maior capacidade de transmissão viral) por populações infectadas com *wMel* com pouca ou nenhuma capacidade de transmissão viral (NGUYEN, *et al.*, 2015; O'NEILL, *et al.*, 2019). A liberação de *Ae. aegypti* infectado artificialmente com *Wolbachia* ocorre atualmente em cinco cidades brasileiras (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2021).

Apesar de avanços no conhecimento básico sobre biologia de *Wolbachia*, e na aplicação das tecnologias em campo, aspectos importantes ainda não foram elucidados, como em quais espécies de mosquitos a bactéria está presente naturalmente, se a presença nessas espécies varia por região, a diversidade de cepas existentes e em que frequência ocorre o fenômeno de transmissão horizontal (BROWN; LLOYD, 2015; HEATH *et al.*, 1999; LI, *et al.*, 2017; RAYCHOUDHURY *et al.*, 2009). Tais questões são primordiais para o manejo correto e eficiente das tecnologias baseadas na liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia*, uma vez que podem comprometer o sucesso dos programas.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade de cepas e linhagens de *Wolbachia*, avaliar a taxa de infecção e sua distribuição em populações naturais de mosquitos silvestres presentes em resquícios de mata atlântica do município de Recife.

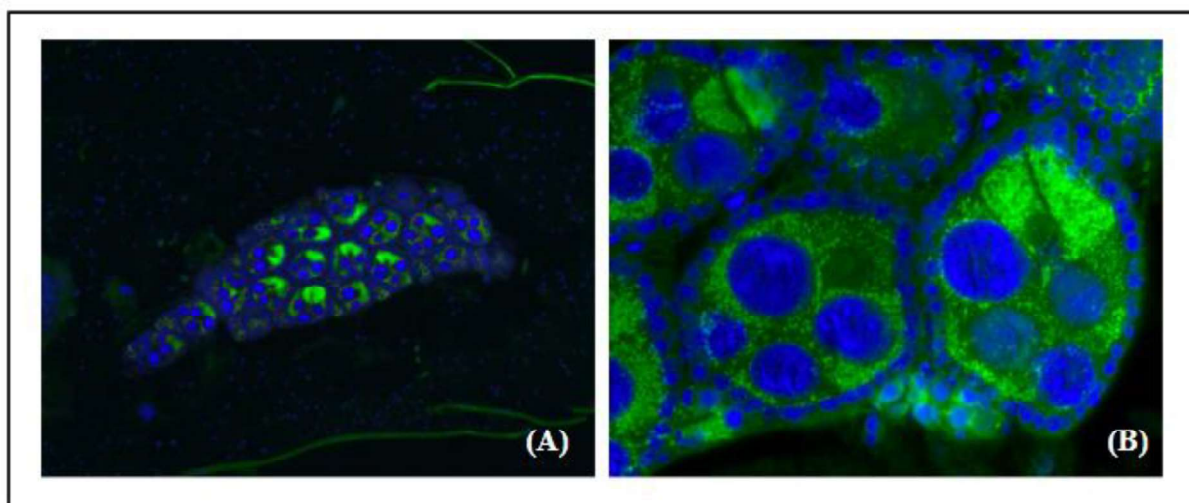
2-REFERENCIAL TEÓRICO

No presente referencial teórico serão abordados os principais tópicos relacionados ao estudo desenvolvido.

2.1 *Wolbachia pipientis*

Wolbachia pipientis é uma bactéria intracelular obrigatória Gram negativa da Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales e Família Anaplasmataceae, identificada pela primeira vez em ovários de mosquitos da espécie *Culex pipiens* (HERTIG; WOLBACH, 1924) e posteriormente descrita formalmente como espécie por Hertig em 1936 (HERTIG, 1936) (**Figura 1**). Linhagens do gênero *Wolbachia* infectam naturalmente invertebrados do filo Arthropoda e Nematoda, e em ambas essas linhagens podem estabelecer diversas relações, variando do mutualismo ao parasitismo (**Figura 2**). Nos artrópodes, estima-se que a *Wolbachia* está presente em uma frequência que varia de 66% a 76%, enquanto nos nematóides filariais, a bactéria é encontrada em uma taxa de aproximadamente 100% (FOSTER, *et al.*, 2005; HILGENBOECKER *et al.*, 2008; JEYAPRAKASH; HOY, 2000). A transmissão de *Wolbachia* pode ocorrer de forma vertical, entre indivíduos da mesma espécie, e de forma horizontal entre indivíduos de espécies distintas (AHMED; BREINHOLT; KAWAHARA, 2016).

Figura 1 - *Wolbachia pipientis* nos ovários de mosquitos *Aedes aegypti*

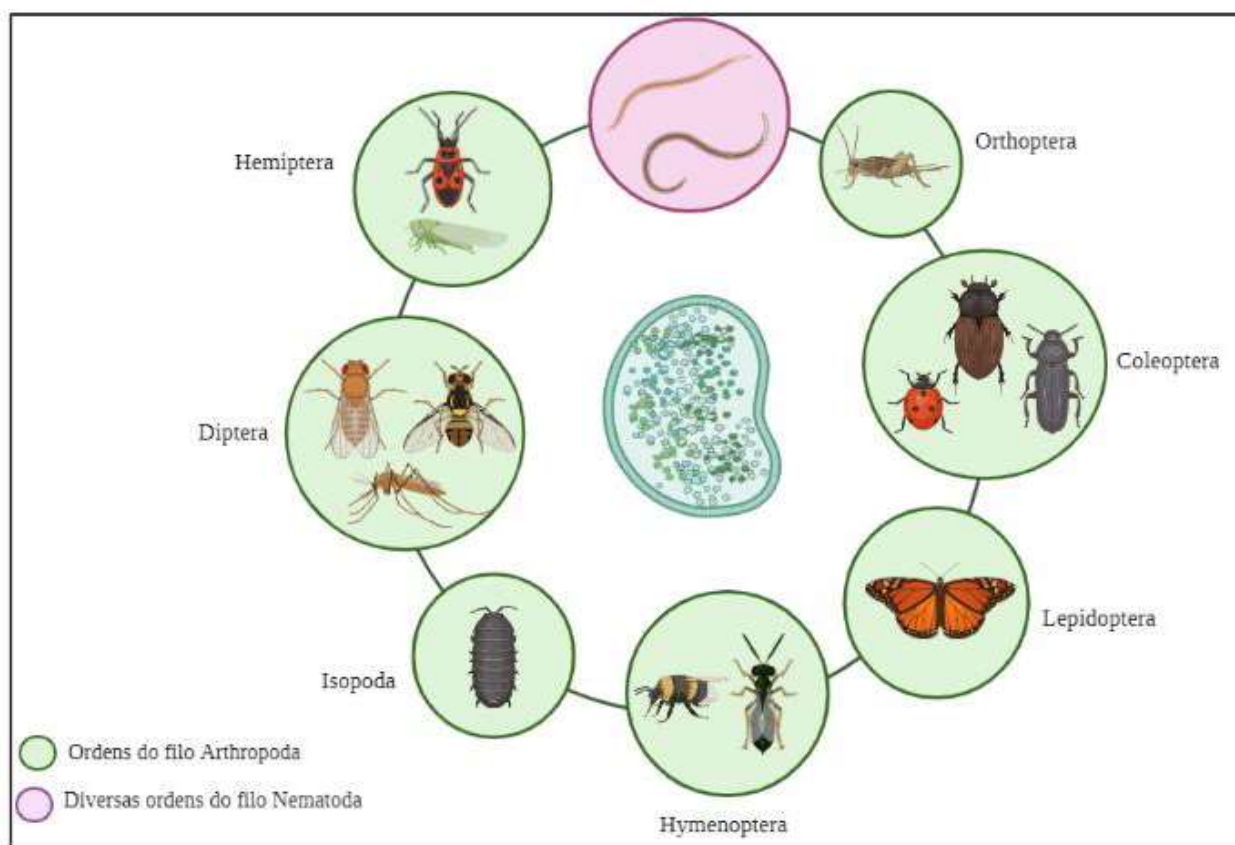


Fonte: Iñaki Iturbe-Ormaetxe (2016)

Legenda: Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH) mostra a localização de *Wolbachia* (em verde) em um tecido ovariano de um mosquito *Ae. aegypti*. o DNA foi marcado com DAPI (em azul) (A). Grande aumento mostrando as células de *Ae. aegypti* infectadas com *Wolbachia* (em verde) (B).

A maioria das espécies de nematóides filariais que infectam humanos abrigam *Wolbachia* naturalmente, incluindo espécies como *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti* e *Onchocerca volvulus* que podem causar a filariose linfática. Nessas espécies, as linhagens de *Wolbachia* possuem uma relação de simbiose mutualística obrigatória necessária para fertilidade, desenvolvimento e sobrevivência (PLICHART; LEGRAND, 2005; SLATKO, *et al.*, 2014). Algumas exceções de nematóides filariais não infectados com *Wolbachia* são *Loa loa* e algumas espécies do gênero *Mansonella* que também são causadores de doenças em humanos (FOSTER *et al.*, 2013).

Figura 2 - Ordens do filo Arthropoda e Nematoda onde já foram encontradas espécies infectadas naturalmente com a bactéria *Wolbachia*



Fonte: A autora (2021).

Legenda: Figura representando *Wolbachia* no centro e ao redor exemplos de espécies das ordens infectadas com *Wolbachia*.

Em artrópodes, as linhagens do gênero *Wolbachia* são caracterizadas como parasitas reprodutivos, pois na maioria das espécies em que está presente, manipula o sistema reprodutivo de seus hospedeiros para o desenvolvimento, multiplicação e perpetuação na prole (SICARD; BONNEAU; WEILL, 2019). Os fenótipos gerados por *Wolbachia* variam de acordo com a ordem do hospedeiro infectado e a cepa de *Wolbachia* e dentre eles estão: feminização

de machos, partenogênese e incompatibilidade citoplasmática (JEFFRIES; WALKER, 2015). Em geral, esses fenótipos selecionam ou favorecem os hospedeiros fêmeas, aumentando a capacidade de transmissão da bactéria para a prole. Dessa maneira, essas características demonstram a alta eficiência de *Wolbachia* na transmissão vertical e pode explicar a alta prevalência dentro da mesma espécie (LANDMANN, 2019).

Nos artrópodes, as linhagens do gênero *Wolbachia* estão presentes principalmente na Classe Insecta, em todas as principais ordens, incluindo Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Homoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, e Orthoptera (WERREN; WINDSOR; GUO, 1995). Apesar da principal forma de transmissão da *Wolbachia* entre indivíduos ser a vertical, ocorre também a transmissão horizontal entre indivíduos não relacionados, tais como entre diferentes gêneros, famílias e ordens de hospedeiros (AHMED; BREINHOLT; KAWAHARA, 2016; ZUG; KOEHNCKE; HAMMERSTEIN, 2012). Essa transmissão ocorre principalmente entre hospedeiros que compartilham nichos ou em animais que se alimentam de outros animais infectados com *Wolbachia* (NILSSON *et al.*, 2018). Entretanto, a frequência com que a transmissão horizontal da bactéria ocorre ainda é desconhecida (SHAIKEVICH *et al.*, 2019).

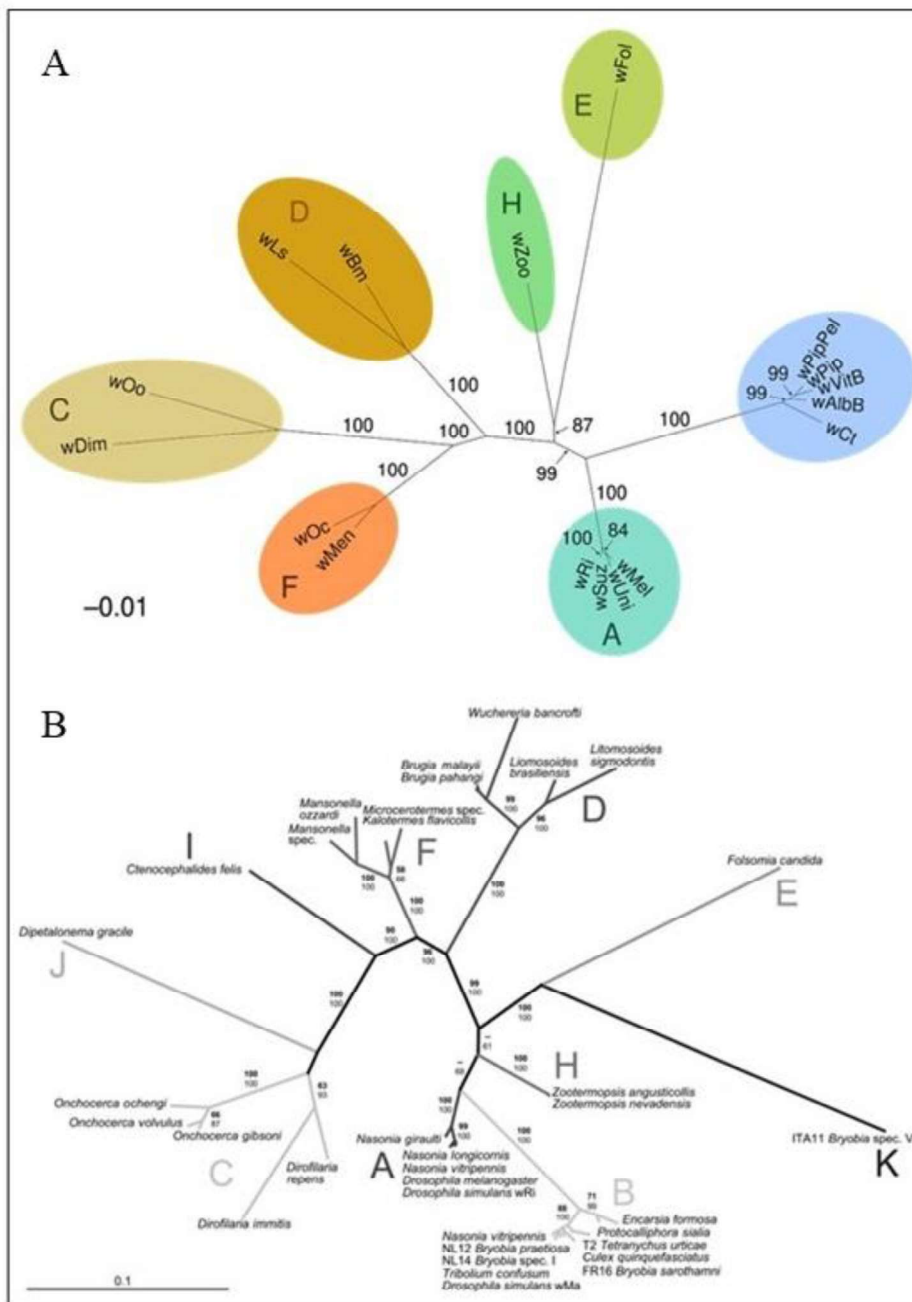
Um outro fenômeno que ocorre comumente entre *W. pipientis* e seus hospedeiros é a transferência lateral de genes (TLG), na qual sequências da bactéria são incorporadas no genoma do hospedeiro (DUNNING HOTOPP, 2011). Até 2007, oito dos 11 genomas de artrópodes e nematóides disponíveis continham sequências de *Wolbachia*, evidenciando a TLG (DUNNING HOTOPP *et al.*, 2007). Os fenômenos de transmissão horizontal e TLG levam a uma não-concordância entre a filogenia do hospedeiro e a filogenia de *Wolbachia*, dificultando a compreensão entre essas relações.

2.2 Classificação de *Wolbachia pipientis*

Apesar de ser considerada a única espécie do gênero, *Wolbachia pipientis* apresenta uma grande diversidade genômica e a partir de análises filogenéticas a espécie foi classificada em outros diferentes níveis não taxonômicos. Através da técnica de tipagem de sequências de múltiplos locus (*Multilocus sequence typing* - MLST), que analisa os marcadores de RNA ribossomal 16S e dos genes *ftsZ*, *groEL*, *gltA*, *Wolbachia* foi inicialmente classificada em oito linhagens distintas denominadas supergrupos (de A a H) (BALDO *et al.*, 2006; CASIRAGHI *et al.*, 2005). Com o avanço de técnicas moleculares e a análise de outros organismos, atualmente são descritos 18 supergrupos de *Wolbachia* classificados de A-R, sendo estes novos presentes exclusivamente em alguns grupos ou espécies de hospedeiros, como o supergrupo H

presente em cupins, M e N em afídeos, P e Q em ácaros e R em aranhas (AUGUSTINOS *et al.*, 2011; GLOWSKA *et al.*, 2015; WANG, *et al.*, 2016) (**Figura 3a e 3b**). Apesar dos esclarecimentos quanto à filogenia dos supergrupos de *Wolbachia* esta ainda não se encontra resolvida, devido à supergrupos raros ou com baixa amostragem, ausência de padronização na classificação, e Transferência Lateral de Genes (TLG) que ocorre entre *Wolbachia* e seu hospedeiros que gera uma não-concordância entre as filogenias desses organismos (GERTH *et al.*, 2014).

Figura 3 - Árvores filogenéticas dos supergrupos de *Wolbachia*



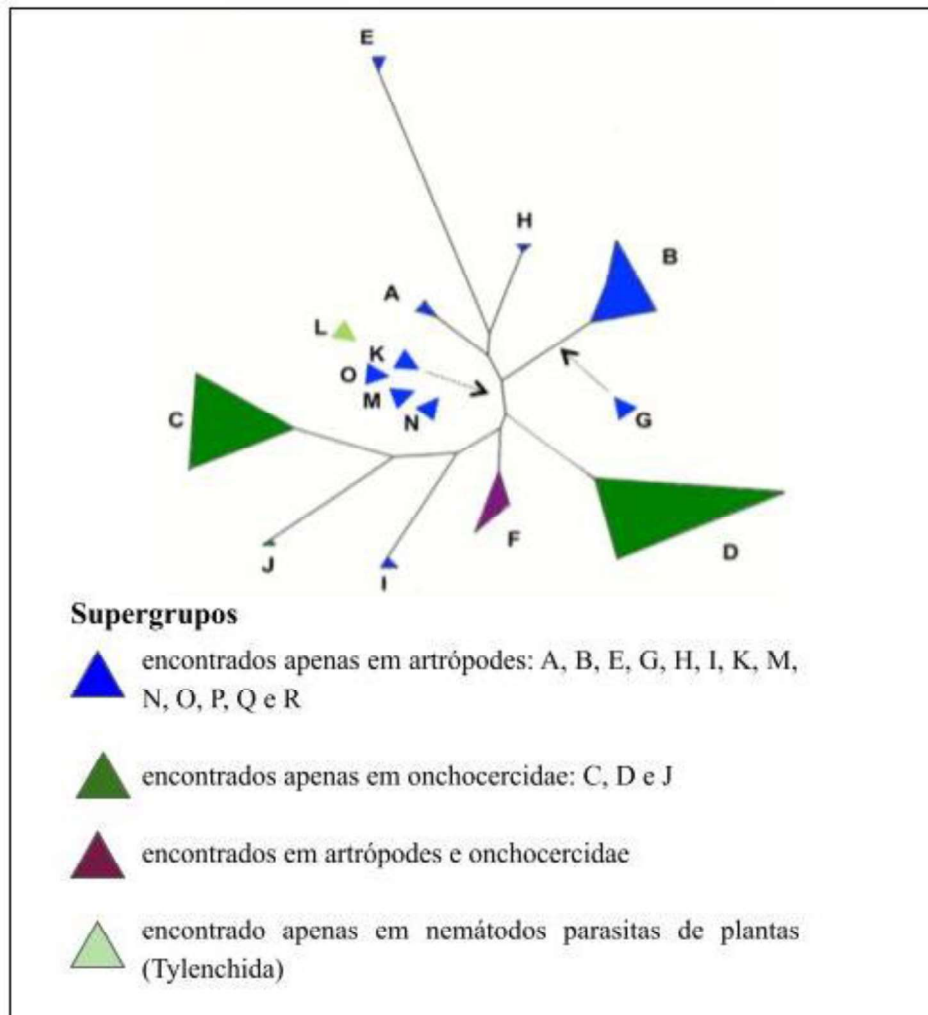
Fonte: Gerth *et al.* (2014) e Ros *et al.* (2009).

Legenda: A) Filograma não-enraizado construído com diferentes cepas de *Wolbachia* de hospedeiros distintos, demonstrando a relação dos sete principais supergrupos. B) Árvore filogenética mostrando a relação de 10 supergrupos distintos de *Wolbachia* e suas respectivas espécies hospedeiras.

Alguns desses supergrupos de *Wolbachia* são exclusivos de determinados filos, como exemplo, os supergrupos C, D e J que são encontrados apenas na família Onchocercidae, enquanto que A e B são exclusivos de artrópodes. É importante apontar que os supergrupos A e B são os mais comumente encontrados, ao passo que o supergrupo F apesar de raro é

encontrado tanto em artrópodes quanto nematóides e pode estabelecer relações mutualísticas ou induzir IC (**Figura 4**) (ROS *et al.*, 2009; WERREN; WINDSOR, 2000).

Figura 4 - Árvore filogenética não-enraizada dos supergrupos de *Wolbachia* relacionados aos seus hospedeiros



Fonte: Landmann (2019, tradução nossa)

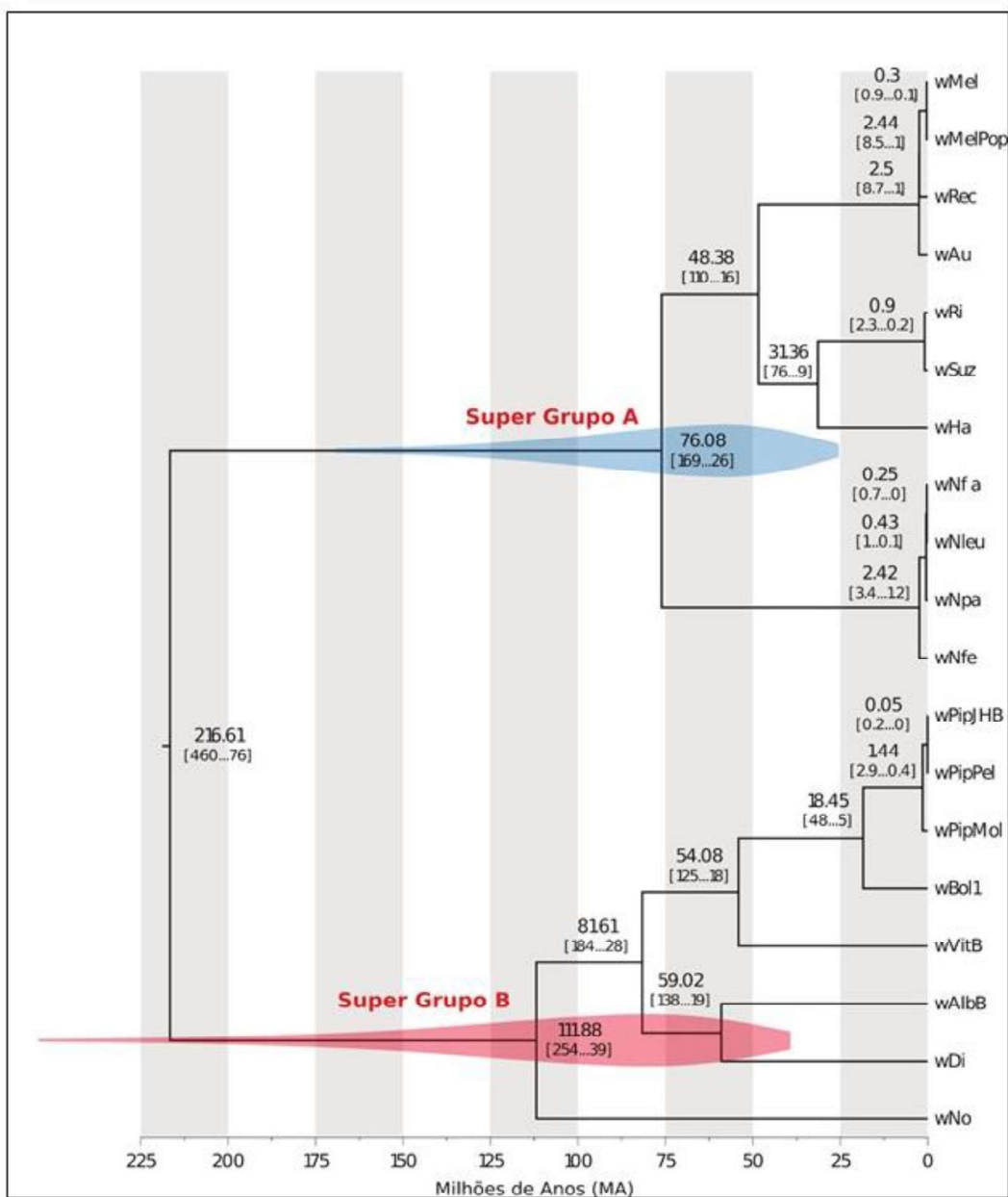
Legenda: O tamanho dos triângulos representa a diversidade de *Wolbachia* encontrada por supergrupo. Alguns supergrupos são exclusivos de determinados filós, enquanto outros podem ser encontrados em mais de um.

Além da classificação em supergrupos, *Wolbachia* é classificada em cepas a partir de divergências genômicas e dos diferentes efeitos que causam nos seus hospedeiros. Portanto, a nomenclatura de *Wolbachia* é constituída da sigla de sua cepa, baseada na espécie do seu hospedeiro, e no supergrupo a qual pertence, por exemplo, *wAlbB* observada em *Ae. albopictus* e que pertence ao supergrupo B (BRAIG *et al.*, 1998; ROUSSET; STORDEUR, 1994). Até o

momento, não há uma padronização ou critério a ser seguido para caracterização de novas cepas seguindo algum limiar de similaridade de sequência.

De acordo com Gerth e Bleidorn (2016), a origem dos supergrupos A e B de *Wolbachia* é estimada em 76 a 112 Ma (milhões de anos), respectivamente, enquanto que o último ancestral comum é estimado em 216 Ma (Figura 5) (GERTH; BLEIDORN, 2016).

Figura 5 - Filogenia datada de *Wolbachia* demonstrando a origem dos supergrupos A e B e do último ancestral comum

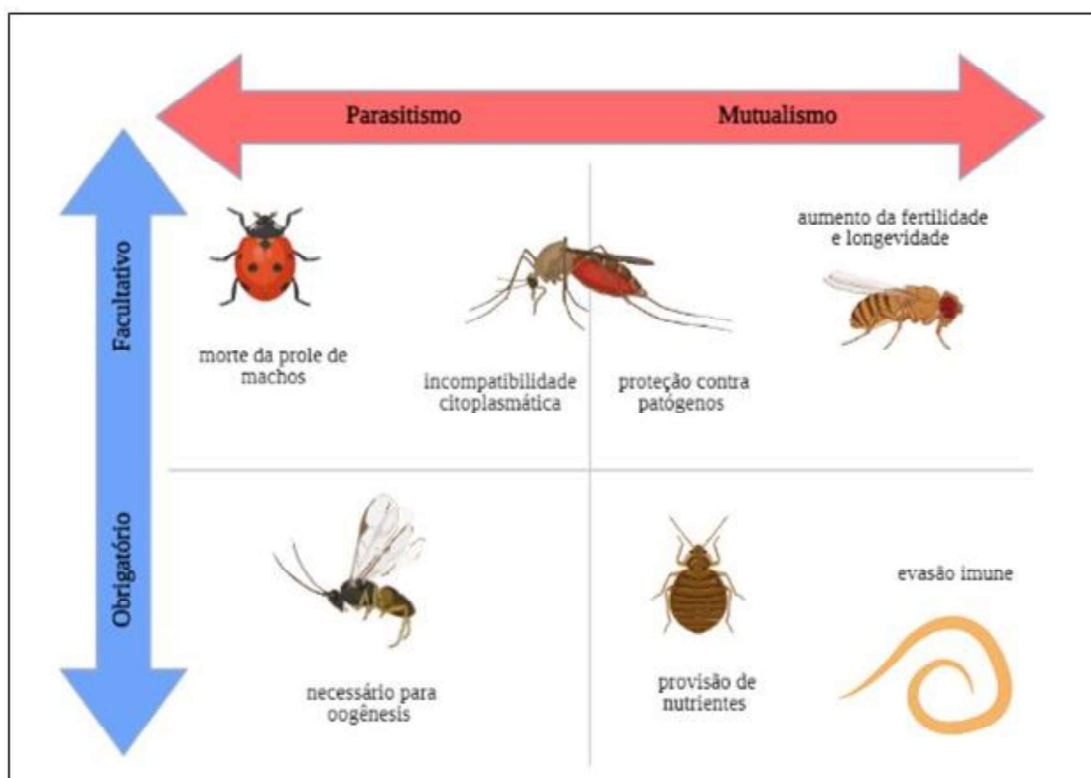


Fonte: Gerth e Bleidorn (2016, tradução nossa)

2.3 Fenótipos induzidos por *Wolbachia*

As relações simbióticas estabelecidas entre a bactéria *Wolbachia* e seus hospedeiros variam de mutualismo ao parasitismo sendo estes facultativos ou obrigatórios, além de depender de fatores como cepa e espécie do hospedeiro (GILL; DARBY; MAKEPEACE, 2014) (**Figura 6**).

Figura 6 - Espectro de simbioses realizadas por *Wolbachia*



Fonte: Gill *et al.* (2014, tradução nossa)

Nota: *Wolbachia* estabelece diferentes relações com seus hospedeiros que variam entre parasitismo e mutualismo, podendo estas serem do tipo obrigatórias ou facultativas. O tipo de relação estabelecida varia de acordo com a cepa de *Wolbachia* e o hospedeiro, sendo encontrado na natureza diferentes formas de simbiose. O tipo de relação que *Wolbachia* estabelece está diretamente relacionado como fenótipo gerado em seu hospedeiro, como mostra a figura.

A relação simbiótica do tipo parasitismo facultativo pode ser vista em espécies da ordem Coleoptera, como a que ocorre na espécie *Adalia bipunctata*, e leva à morte da prole de machos (HURST, *et al.*, 1999). A simbiose realizada de *Wolbachia* também pode ser do tipo mutualística, como ocorre na espécie *Drosophila melanogaster* em que a presença da bactéria leva ao aumento na fecundidade e longevidade do hospedeiro (FRY; PALMER; RAND, 2004).

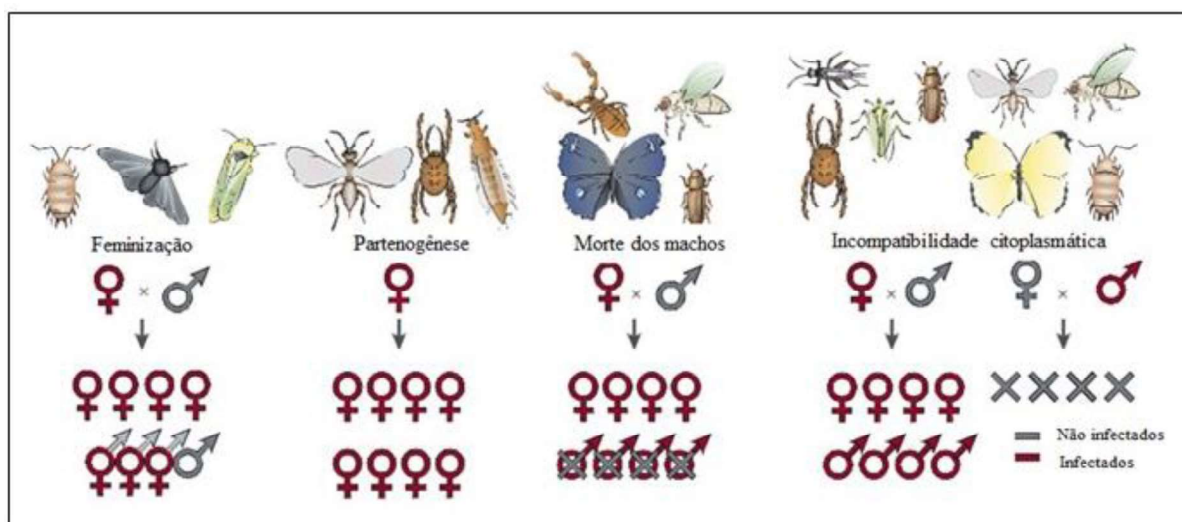
Wolbachia também pode estabelecer uma relação mutualística com o hospedeiro, ao manipular o sistema reprodutivo, como ocorre em *Culex pipiens*, onde uma cepa da bactéria pode gerar IC e também fornecer proteção contra *Plasmodium relictum* (ZÉLÉ *et al.*, 2012). Em algumas espécies da ordem Hemiptera, *Wolbachia* estabelece uma relação de mutualismo obrigatório, como ocorre no percevejo *Cimex lectularius*, em que a bactéria fornece vitaminas essenciais para a sobrevivência do hospedeiro (HOSOKAWA *et al.*, 2010). O mesmo ocorre em algumas espécies de nematóides, como no parasita filarial *Onchocerca ochengi*, onde a presença da bactéria contribui para uma resposta imune ineficaz pelo hospedeiro vertebrado (HANSEN, *et al.*, 2011). Já em algumas populações da vespa parasita *Asobara tabida*, da ordem Hymenoptera, a linhagem *wAtab3* é essencial para a oogênese, sendo indispensável para reprodução da espécie (KREMER *et al.*, 2009).

Esses fenômenos podem variar dentro de uma mesma espécie hospedeira, em que diferentes cepas de *Wolbachia* podem gerar efeitos distintos, assim como uma mesma cepa em hospedeiros diferentes pode gerar diferentes fenótipos.

Em nematóides filariais da família Onchocercidae, as linhagens de *Wolbachia* interagem com o hospedeiro através de uma relação mutualística obrigatória. A análise do genoma de linhagens de *Wolbachia* presentes nesses hospedeiros revelou a incapacidade da bactéria de realizar síntese *de novo* de várias enzimas essenciais para seu metabolismo (FOSTER *et al.*, 2005). Estas vias bioquímicas incompletas em *Wolbachia* a tornam dependente do seu hospedeiro (KAUR *et al.*, 2021). Ao mesmo tempo, estudos revelam que a eliminação de *Wolbachia* por antibióticos nesses hospedeiros impede o desenvolvimento normal, fertilidade e vitalidade de vermes adultos, sugerindo a dependência de *Wolbachia* por mecanismo ainda desconhecido (COULIBALY *et al.*, 2009; TAYLOR *et al.*, 2019). Nesses hospedeiros, *Wolbachia* não induz outros fenótipos como acontece na maioria dos artrópodes (FOSTER *et al.*, 2005).

Em artrópodes, *Wolbachia* apresenta grande capacidade de manipular as células e o sistema reprodutivo de seus hospedeiros, induzindo fenótipos que aumentam a frequência de fêmeas infectadas e conseqüentemente, aumentam sua capacidade natural de transmissão vertical (CLARK, 2007) (**Figura 7**).

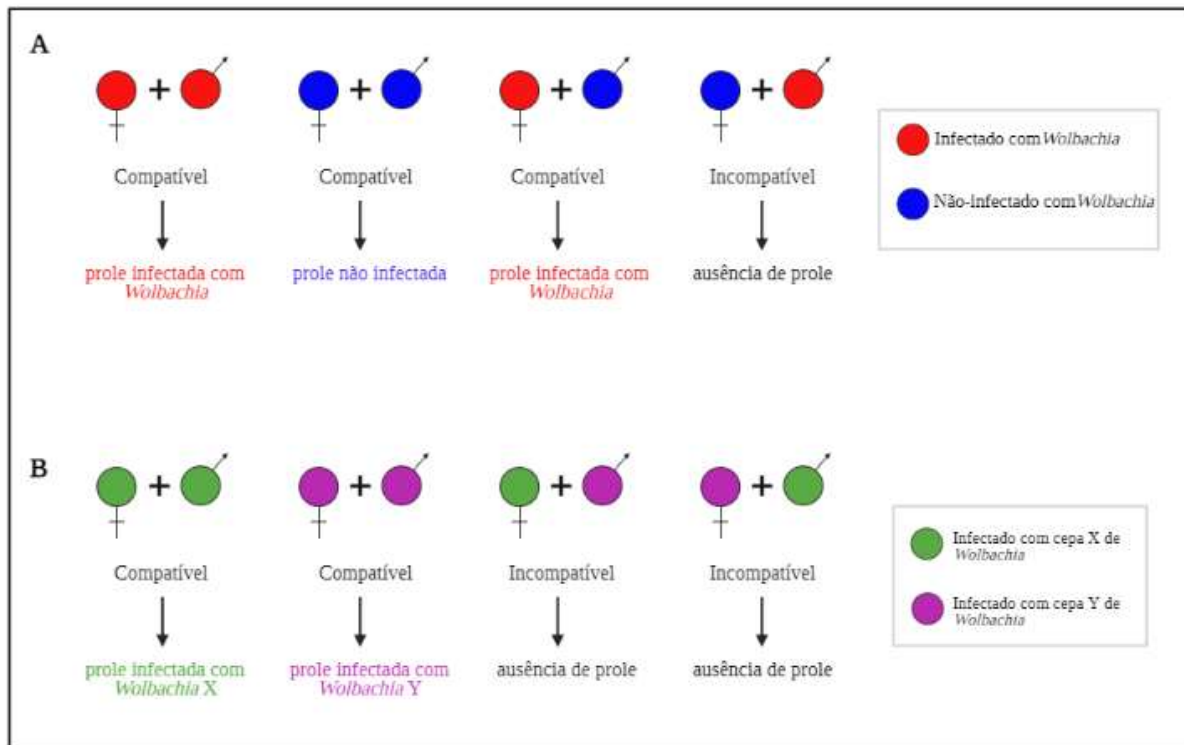
Figura 7 - Fenótipos induzidos por *Wolbachia pipientis* em artrópodes



Fonte: Werren, Baldo e Clark (2008, tradução nossa)

A incompatibilidade citoplasmática (IC) é o fenótipo mais comum e melhor caracterizado, encontrado em oito ordens de artrópodes, incluindo Diptera. Este fenômeno ocorre quando um espermatozóide de um hospedeiro infectado com uma cepa específica de *Wolbachia* fertiliza um óvulo não infectado (IC unidirecional) ou fertiliza um óvulo infectado por uma cepa diferente (IC bidirecional) (**Figura 8**) (BECKMANN; RONA; HOCHSTRASSER, 2017; MORETTI *et al.*, 2018; WERREN; BALDO; CLARK, 2008). Este mecanismo leva à morte da prole e evita principalmente que machos infectados tenham sucesso no cruzamento com fêmeas que não são infectadas, impedindo a geração de uma prole sem a presença da mesma linhagem de *Wolbachia* nos dois progenitores (POINSOT; CHARLAT; MERÇOT, 2003).

Figura 8 - Esquema detalhando situações que podem ou não gerar incompatibilidade citoplasmática em insetos infectados com *Wolbachia*



Fonte: Johnson, K. (2015, tradução nossa)

Legenda: A) Incompatibilidade citoplasmática unidirecional. B) Incompatibilidade citoplasmática bidirecional.

Apesar de diversos trabalhos documentarem este fenômeno, os mecanismos que a bactéria utiliza ainda não foram bem esclarecidos, sabe-se, porém, que a IC se manifesta na primeira divisão zigótica onde ocorre uma falha na sincronização entre os pronúcleos masculinos e femininos nos embriões (LANDMANN, *et al.*, 2012). Essa ausência de sincronização ocorre no atraso para quebra do envelope nuclear e como resultado, os cromossomos femininos se separam normalmente durante a anáfase, enquanto os cromossomos masculinos se separam tardiamente, resultando em parada embrionária durante o início da embriogênese (TRAM; SULLIVAN, 2002). Sabe-se que o mecanismo envolve os genes que codificam as proteínas cifA e cifB produzidas pelo prófago WO, sendo, portanto, um fenótipo exclusivo de cepas de *Wolbachia* que possuem o prófago (BECKMANN; RONAU; HOCHSTRASSER, 2017; LEPAGE *et al.*, 2017; BONNEAU *et al.*, 2018; CHEN; ZHANG; HOCHSTRASSER, 2020).

Um outro fenômeno induzido pela *Wolbachia* em alguns hospedeiros é a partenogênese que leva as fêmeas infectadas pela bactéria a produzir uma prole somente de fêmeas sem a necessidade da fertilização dos machos (STOUTHAMER; KAZMER, 1994). A consequência

desse efeito é o aumento da transmissão de *Wolbachia* para a próxima geração, uma vez que toda a progênie é constituída por fêmeas (WERREN; BALDO; CLARK, 2008). Tal fenômeno é menos frequentemente encontrado do que a IC, sendo observada em três diferentes ordens de artrópodes, Thysanoptera, Acari e Hymenoptera (CLARK, 2007).

Além disso, algumas linhagens de *Wolbachia* também podem induzir a feminização da prole, gerada por hipertrofia da glândula androgênica, que converte machos genéticos em fêmeas funcionais (VANDEKERCKHOVE; WATTEYNE; BONNE, 2003). Diferentes linhagens de *Wolbachia* também podem induzir a morte da prole de machos durante a embriogênese, o que favorece a prole de fêmeas do hospedeiro, visto que a diminuição da quantidade de indivíduos na população torna os recursos disponíveis mais abundantes (WERREN; BALDO; CLARK, 2008). Kageyama *et al.*, (2002) observaram que toda a prole de machos consegue se desenvolver quando as fêmeas da ordem Lepidoptera são tratadas com tetraciclina (KAGEYAMA *et al.*, 2002). Tetraciclina é um antibiótico que leva a inibição da síntese de proteínas em algumas bactérias, incluindo em *Wolbachia*, e, portanto, usado para eliminar a presença da bactéria em um hospedeiro. Além da ordem Lepidoptera, esse fenômeno já foi descrito em outras três diferentes ordens de artrópodes: Coleóptera, Diptera e Pseudoscorpiones (DYER; JAENIKE, 2004; FIALHO; STEVENS, 2000; ZEH; ZEH; BONILLA, 2005).

De forma geral, esses fenótipos são referidos como parasitismo reprodutivo e facultativo, os quais contribuem para o aumento de fêmeas infectadas e a permanência da bactéria na natureza, dependendo da cepa e do tipo de associação estabelecida com o hospedeiro (CARAGATA; DUTRA; MOREIRA, 2016).

2.4 Características genômicas de *Wolbachia pipientis*

Wolbachia possui um genoma circular que varia em tamanho entre 1.08 e 1.7 megabases (SINHA *et al.*, 2019). O tamanho e a constituição do genoma de *Wolbachia* varia de acordo com a cepa, e no trabalho de Sinha *et al.*, 2019 a cepa wAlbB natural de *Aedes albopictus* apresenta 1205 genes de proteínas codificantes, além de 34 tRNAs, 3 rRNAs (16S, 23S e 5S), além de outros três RNAs não codificantes (6S RNA, RNase P RNA e uma partícula de reconhecimento de sinal sRNA de tipo pequeno) e um gene tmRNA (SINHA *et al.*, 2019).

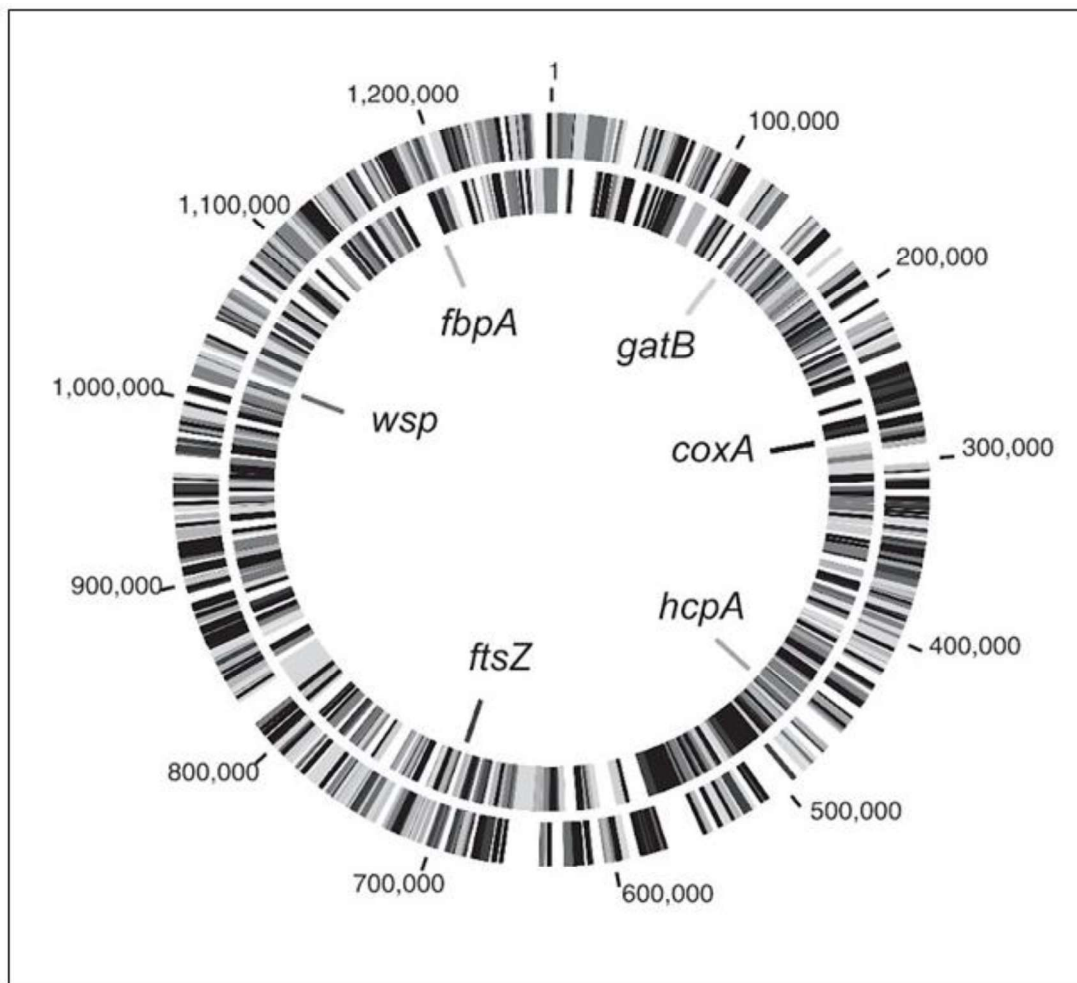
As linhagens mutualísticas de *Wolbachia* em geral apresentam um genoma menor (0,9-1,1 Mb), são herdadas exclusivamente por herança vertical e não mostram evidência de recombinação (BORDENSTEIN; WERNEGREN, 2004; SUN *et al.*, 2001). O contrário

ocorre em genomas de cepas de *Wolbachia* que estabelecem relações parasitárias com seus hospedeiros, que possuem genomas significativamente maiores (1,3-1,6 Mb), realizam recombinação e apresentam também transmissão horizontal (BORDENSTEIN; WERNEGREN, 2004; SUN *et al.*, 2001).

Em geral, o genoma das cepas de *Wolbachia* apresenta 30% de conteúdo GC, e ao contrário da maioria das Rickettsiales, *Wolbachia* contém um alto número de elementos móveis repetitivos, compreendendo mais de 15% do genoma da cepa *wMel*, e 13% do genoma da cepa *wAlbB* (ISHMAEL *et al.*, 2009; SINHA *et al.*, 2019).

No genoma de *Wolbachia*, os genes conservados *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA*, e *fbpA* apresentam grande importância para o estudo da bactéria tanto para detecção, quanto para análises filogenéticas e classificação em supergrupos (BALDO *et al.*, 2006) (**Figura 9**). O gene *wsp* que codifica uma proteína da superfície da *Wolbachia*, também é frequentemente estudado e utilizado em classificações da bactéria.

Figura 9 - Mapa do genoma da cepa *wMel* de *Wolbachia*, mostrando a localização de cinco genes conservados e do gene *wsp*



Fonte: Baldo *et al.* (2006)

Um outro elemento presente nos genomas de cepas de *Wolbachia* é o bacteriófago WO, que apresenta em média 20 kb, e está relacionado principalmente ao fenótipo de IC (MASUI *et al.*, 2000). De acordo com a detecção realizada por Bordenstein e Wernegreen, 2004 para o gene *orf7* que codifica o capsídeo, o bacteriófago WO está presente em 89% das cepas de *Wolbachia* e apresenta altas taxas de transmissão lateral entre diferentes cepas, visto que as topologias das árvores gênicas de *Wolbachia* e do bacteriófago WO não são concordantes, além de outras evidências (BORDENSTEIN; WERNEGREN, 2004). O bacteriófago WO está presente em cepas de *Wolbachia* do supergrupo A e B e ausente nos supergrupos C e D (GAVOTTE *et al.*, 2007). Entretanto, vestígios de DNA do prófago permanecem nos genomas de *Wolbachia* dos supergrupos C e D, sugerindo que em algum ponto da história evolucionária esse grupo também pode tê-los abrigado (KENT; BORDENSTEIN, 2010).

As linhagens do gênero *Wolbachia* possuem uma grande diversidade genética, com divergência nucleotídica de 6% a 9% nos cinco genes conservados, de até 30% no *orf7* do prófago e maior que 43% no gene *wsp* (BALDO *et al.*, 2006; BALDO; LO; WERREN, 2005; BORDENSTEIN; WERNEGREN, 2004). Essa diversidade está diretamente relacionada a processos de recombinação de cepas e TLG, e afetam várias regiões do genoma, incluindo os genes conservados, genes do prófago, regiões intergênicas e genes das proteínas de superfície (como *wsp*) (WERREN; BALDO ; CLARK, 2008).

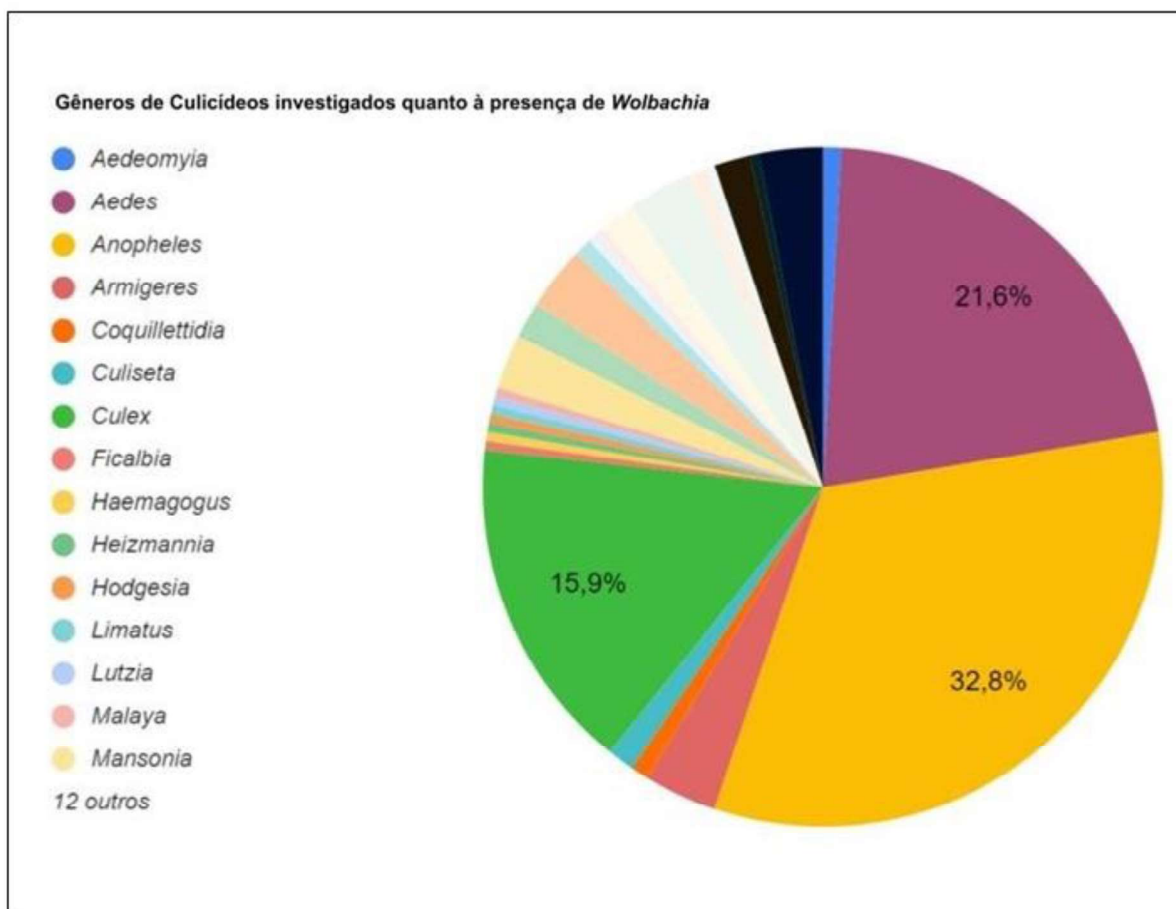
Aproximadamente um terço dos genomas de invertebrados sequenciados e disponíveis em bancos de dados contém inserção de genes de *Wolbachia*, os quais variam de pequenos segmentos (<600 pares de bases) a quase todo o genoma (>1 megabases) (DUNNING HOTOPP *et al.*, 2007). A evidência da TLG entre cepas de *Wolbachia* e seus hospedeiros já foi encontrada em nematóides filariais como *Dirofilaria immitis* e *Brugyia malayi*, em mosquitos como *Culex quinquefasciatus*, e em diferentes espécies de *Drosophila* como *D. ananassae* e *D. simulans* (DUNNING HOTOPP, 2011; DUNNING HOTOPP *et al.*, 2007).

Até o momento, de acordo com dados publicados na plataforma National Centers of Biotechnology Information (NCBI), foram sequenciados 36 genomas completos de cepas de *Wolbachia* de diversos hospedeiros e 184 genomas rascunhos (National Centers of Biotechnology Information, 2021). Dos genomas completos disponíveis, 80% correspondem a cepas de hospedeiros artrópodes, em que 40% são de espécies de *Drosophila* e apenas um é de Culicídeo (NCBI, 2021).

2.5 Distribuição de *Wolbachia pipientis* em culicídeos

A família Culicidae é constituída de diversas espécies de importância médica e sanitária, divididas em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae (HARBACH; KITCHING, 1998). Atualmente, 3.583 espécies de Culicidae são reconhecidas formalmente (HARBACH, 2013) e de acordo com Inácio da Silva *et al.* (2021), apenas 6% das espécies de culicídeos foram avaliadas quanto à presença de *Wolbachia*. Das espécies investigadas, 75% pertencem aos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (**Figura 10**) (INÁCIO DA SILVA *et al.*, 2021). Ao total, foram descritas 44 cepas de *Wolbachia* presentes em culicídeos, sendo 36% pertencentes ao supergrupo A e 45% pertencentes ao supergrupo B, as demais não foram identificadas quanto ao supergrupo (INÁCIO DA SILVA *et al.*, 2021).

Figura 10 - Gêneros da família Culicidae avaliados quanto à presença de *Wolbachia*



Fonte: Inácio da Silva *et al.* (2021, adaptação nossa)

Os mosquitos do complexo *Anopheles* destacam-se por sua importância médica, e o primeiro relato de infecção natural por *Wolbachia* no gênero foi realizado em 2014 em populações de *An. gambiae* provenientes de Burkina Faso, cuja cepa foi denominada *wAng* (BALDINI *et al.*, 2018). Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram infecção da bactéria em outras espécies de *Anopheles* como *An. coluzzii*, *An. arabiensis*, *An. moucheti* e *An. funestus* (BALDINI *et al.*, 2018; JEFFRIES *et al.*, 2018; NIANG *et al.*, 2018). Entretanto, alguns autores questionam a baixa quantidade de amostras analisadas, baixa prevalência da bactéria e a falta de diversidade nas populações de *Anopheles* onde a bactéria foi observada (CHROSTEK; GERTH, 2019; ROSS; CALLAHAN *et al.*, 2020). Portanto, estes autores sugerem que apenas a presença da sequência de DNA de *Wolbachia* nos mosquitos não indica a infecção pela bactéria, e ressaltam a necessidade de utilização de ferramentas mais robustas (CHROSTEK; GERTH, 2019).

Uma outra espécie de grande importância médica e sobre a qual também existe uma discussão quanto à presença ou ausência da bactéria como endossimbionte é *Ae. aegypti*. Considerado como um dos principais vetores de arbovírus, *Ae. aegypti* é capaz de transmitir patógenos como vírus dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) e febre amarela (YFV), e até recentemente era considerado livre de *Wolbachia* (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956; LI *et al.*, 2012; POWELL; TABACHNICK, 2013). Entretanto, em 2016 o primeiro relato de *Wolbachia* foi registrado, demonstrando a infecção natural larvas de *Ae. aegypti* nos Estados Unidos (COON; BROWN; STRAND, 2016). Posteriormente, através do uso de marcadores específicos de *Wolbachia*, tais como *16S rRNA*, *wsp* e *ftsZ*, diversos outros trabalhos observaram a bactéria em adultos de *Ae. aegypti* dos Estados Unidos, Tailândia, Índia, Filipinas e Panamá em frequências variando de 0,2% a 44,8% (BALAJI; JAYACHANDRAN; PRABAGARAN, 2019; BENNETT *et al.*, 2019; CARVAJAL *et al.*, 2019; COON; BROWN; STRAND, 2016; HEGDE *et al.*, 2018; KULKARNI *et al.*, 2019; THONGSRIPONG *et al.*, 2018). Além desses, também foi observada a presença de *Wolbachia* em larvas de *Ae. aegypti* provenientes da Malásia (TEO *et al.*, 2017). Estes trabalhos identificaram que a maior parte das infecções por *Wolbachia* em *Ae. aegypti* pertenciam aos supergrupos A e B, de cepas já descritas anteriormente, como *wAlbB*, como também com uma cepa nova denominada de *wAegB* (BALAJI; JAYACHANDRAN; PRABAGARAN, 2019; CARVAJAL *et al.*, 2019; COON; BROWN; STRAND, 2016; HEGDE *et al.*, 2018; THONGSRIPONG *et al.*, 2018).

Apesar dos nove trabalhos citados identificarem infecção natural de *Wolbachia* em *Ae. aegypti*, pesquisadores sugerem que os métodos utilizados não foram suficientes para incriminar definitivamente o culicídeo como hospedeiro natural (ROSS *et al.*, 2020). Para tal incriminação, estes autores sugerem que sejam realizados experimentos a fim de visualizar a bactéria íntegra nos órgãos do mosquito, o estabelecimento de colônias para visualização da transmissão materna, tratamento com antibióticos, além da detecção molecular do gene *wsp* (ROSS *et al.*, 2020).

Aedes albopictus é considerado o principal vetor de DENV em países Asiáticos como Malásia, Japão, Tailândia e Indonésia (HAWLEY, 1988). Esta espécie apresenta naturalmente superinfecção por *Wolbachia*, ou seja, infecção por duas ou mais cepas da bactéria, sendo elas a *wAlbA* e *wAlbB* (KULKARNI *et al.*, 2019). Altas taxas de superinfecção por *Wolbachia* em *Ae. albopictus* já foram relatadas em países como Brasil, Malásia e Tailândia, atingindo o valor de 99% (AHMAD *et al.*, 2017; ALBUQUERQUE *et al.*, 2011; JOANNE *et al.*, 2015; KITRAYAPONG; BAIMAI; O'NEILL, 2002).

O mosquito *Cx. quinquefasciatus* é capaz de transmitir os vírus do Oeste do Nilo, da encefalite de Saint Louis e o patógeno *Wuchereria bancrofti* causador da filariose, sendo portanto, de grande importância epidemiológica (JEFFRIES; WALKER, 2015). Diversos trabalhos reportaram *Cx. quinquefasciatus* infectado naturalmente com *Wolbachia* em mosquitos provenientes das Filipinas, Paquistão, Turquia e Ilhas Francesas Ocidentais, todos esses possuindo a cepa wPip, originalmente descrita em *Culex pipiens*, com taxa máxima de infecção de 95,8% (CARVAJAL *et al.*, 2018; GOINDIN *et al.*, 2018; HERTIG; WOLBACH, 1924; MORÇIÇEK *et al.*, 2018; SARWAR; SHAHBAZ; JAHAN, 2018).

Wolbachia foi observada em diversos outros culicídeos de variadas localidades como *Coquillettidia richardii*, *Mansonia titillans*, *Aedes fluviatilis*, *Armigeres subalbatus* e *Mansonia uniformis*, entretanto, a maioria delas não foi bem classificada em supergrupos ou cepas, não são cientificamente aceitas, nem sabe-se a frequência de infecção pela bactéria nessas espécies (JEFFRIES; WALKER, 2016; KITTAYAPONG *et al.*, 2000; SHAIKEVICH *et al.*, 2019).

Espécies como *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* são conhecidas por abrigar naturalmente *Wolbachia*, como reportado por vários estudos que avaliaram populações de diversas localidades (HU *et al.*, 2020; RAVIKUMAR *et al.*, 2010; SONI *et al.*, 2017; SUNISH *et al.*, 2011). Apesar dos relatos reportarem diferentes taxas de infecção nessas espécies, a infecção é estável. Entretanto, diversas espécies não apresentam esse padrão e já foram observadas infectadas com *Wolbachia* ou livre da bactéria. Populações de *Ae. cantans*, por exemplo, foram observadas infectadas com *Wolbachia* na Rússia em um estudo, e consideradas negativas na Itália por outro trabalho (RICCI *et al.*, 2002; SHAIKEVICH; BOGACHEVA; GANUSHKINA, 2019). Um outro exemplo ocorre com populações já investigadas de *Tx. splendens*, que foram consideradas positivas por um trabalho e negativa por outro quanto a presença de *Wolbachia*, apesar de ambos os trabalhos terem realizado a investigação na Índia (RAVIKUMAR *et al.*, 2010; SONI *et al.*, 2017). Estas e outras espécies formam um grupo de espécies que variam quanto a presença de *Wolbachia*, entretanto, não é possível afirmar se a variação ocorre por fatores ambientais que podem facilitar ou atrapalhar a simbiose da bactéria (como clima e temperatura), ou pela utilização de metodologias distintas de diagnóstico (INÁCIO DA SILVA *et al.*, 2021).

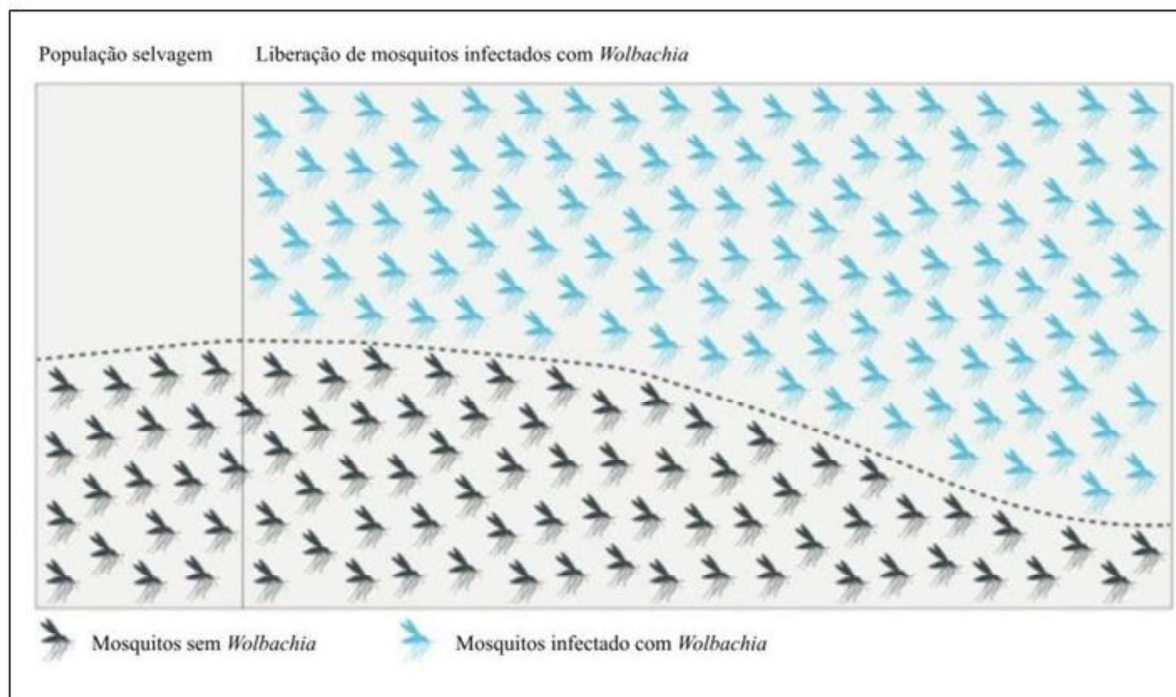
2.6 Histórico do uso de linhagens do gênero *Wolbachia*

Devido à grande capacidade de diversas cepas de *Wolbachia* manipularem o sistema reprodutivo dos hospedeiros e da alta taxa de transmissão vertical, a bactéria consegue se disseminar rapidamente em uma determinada população (WALKER, 2015). Desta maneira, algumas linhagens de *Wolbachia* têm sido utilizadas como ferramentas biotecnológicas para minimizar os impactos gerados por doenças causadas por vetores (WALKER, 2015).

2.6.1 Utilização de *Wolbachia* para redução de população de culicídeos

A primeira forma de aplicação de *Wolbachia* para uso de controle de populações de mosquito é baseada no fenótipo de IC induzido por algumas cepas da bactéria. A técnica é baseada na liberação de mosquitos machos infectados com *Wolbachia* em uma determinada região (LAVEN, 1967). Se a espécie alvo não for infectada naturalmente por *Wolbachia*, os machos devem ser transfectados com uma cepa de *Wolbachia* capaz de gerar IC antes de serem liberados no local. Ao serem liberados na região alvo da intervenção, os machos irão cruzar com fêmeas nativas e, devido ao fenótipo da IC, não resultará na geração de prole. Assim, ao longo de sucessivas liberações de machos transfectados com *Wolbachia* há a redução da população local da espécie alvo de mosquito (LAVEN, 1967) (**Figura 11**).

Figura 11 - Esquema ilustrando a redução de uma determinada população de mosquitos após a liberação de machos infectados com *Wolbachia*



Fonte: Flores; O’neill; Scott L. (2018, adaptação nossa).

A técnica também pode ser realizada em espécies naturalmente infectadas com *Wolbachia*, para isso, os machos a serem liberados devem ser tratados com antibióticos para perderem a infecção ou devem ser transfectados com uma nova cepa de *Wolbachia* que não esteja presente naturalmente (ZHENG *et al.*, 2019).

Os primeiros relatos do uso de *Wolbachia* para a supressão da população teve como alvo a população de *Culex pipiens fatigans* do Myanmar devido ao grande número de casos e filariose linfática que ocorria na região na década de 60 (LAVEN, 1967). Para tanto, foi realizada a liberação de machos do mosquito infectados com *Wolbachia* e provenientes da Califórnia com o objetivo de gerar IC, uma vez que a população local abrigava uma cepa diferente da bactéria (LAVEN, 1967). O experimento piloto obteve sucesso na supressão da população local de *Cx. pipiens fatigans* em que na décima semana de experimento, 100% dos ovos produzidos eram inviáveis (LAVEN, 1967).

Atualmente, a técnica vem sendo testada em combinação com a Técnica do Inseto Estéril (TIE) e levou a 94% de redução da população de *Ae. albopictus* em um dos testes realizados em regiões da China (DIMOPOULOS, 2019; ZHENG *et al.*, 2019).

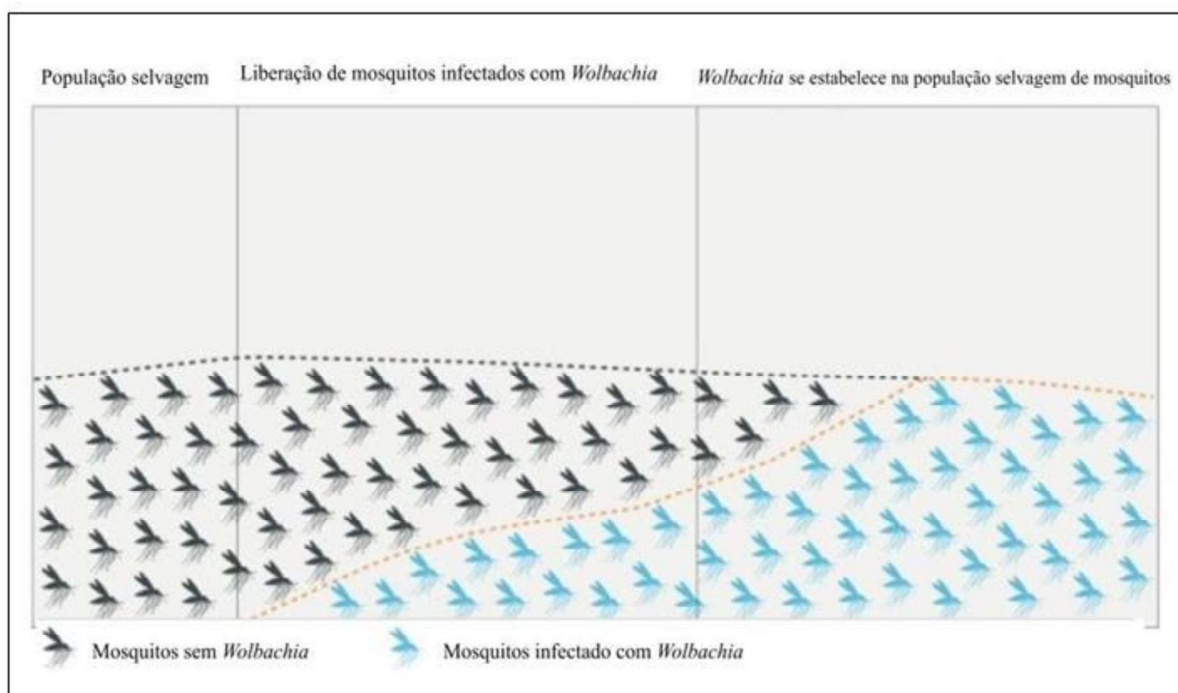
2.6.2 Utilização de *Wolbachia* para redução da transmissão de arbovírus por culicídeos

A segunda abordagem de uso de *Wolbachia* em mosquitos foi idealizada nas últimas décadas, quando foi observado que a cepa *wMel*, encontrada naturalmente em populações de *Drosophila melanogaster*, conhecida como mosca da fruta, poderia diminuir a longevidade de seus hospedeiros, gerando a possibilidade de utilização também em mosquitos vetores de parasitas causadores de doenças (MIN; BENZER, 1997). Além disso, Teixeira *et al.*, 2008 reportou pela primeira vez que a presença de *Wolbachia* em *D. melanogaster*, leva a resistência da infecção por alguns vírus de RNA, o que gerou uma nova possibilidade de utilização da bactéria para mosquitos vetores de arbovírus (TEIXEIRA; FERREIRA; ASHBURNER, 2008).

Dessa maneira, testes de laboratório de transinfecções de *Wolbachia* foram realizados em *Ae. aegypti* com oito cepas da bactéria: *wMel*, *wMelPop-CLA*, *wMelCS*, *wRi*, *wAlbA*, *wAlbB* e *wPip*. Os resultados demonstraram que todas as cepas foram capazes de induzir IC em populações naturais não infectadas de *Ae. aegypti* (MCMENIMAN *et al.*, 2009; SICARD; BONNEAU; WEILL, 2019). A *wMelPop-CLA* é uma cepa modificada a partir da cepa original de *Drosophila melanogaster*, *wMelPop*, através de diversas passagens em cultura de células (WOOLFIT *et al.*, 2013). A transfecção de uma cepa modificada de *Wolbachia* em *Ae. aegypti* para liberação no ambiente levantou questões éticas em relação a liberação de organismos geneticamente modificados. Além disso, estudos mostraram que a cepa *wMelPop-CLA* levou a queda do fitness dos mosquitos, dessa maneira as cepas naturais (*wMel*, *wAlbA* e *wAlbB*) se tornaram melhores candidatas para programas de controle apresentando taxas de transmissão vertical próximas a 100% (MCMENIMAN *et al.*, 2009; JEFFRIES; WALKER, 2016). Um dos efeitos observados a partir das transfecções de *wMel* em *Ae. aegypti* foi a diminuição da replicação de arbovírus como DENV e CHIKV nessa espécie (FERGUSON *et al.*, 2015; FRENTIU, *et al.*, 2014; MOREIRA, *et al.*, 2009; WALKER, *et al.*, 2011). Outros trabalhos também demonstraram que a infecção de *Ae. aegypti* pela cepa *wMel* gera a diminuição da infecção por outros vírus como ZIKV, YFV e mayaro (MAYV) (**Quadro 1**) (ALIOTA *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2019). Dessa maneira, testes de campo em larga escala foram realizados na cidade de Cairns na Austrália, e se basearam na liberação de *Ae. aegypti* infectados com a cepa *wMel* com o objetivo de substituir a população natural não infectada por uma população refratária ao DENV (**Figura 12**) (HOFFMANN *et al.*, 2011). Neste trabalho, foi observado que a cepa *wMel* foi capaz de invadir a população natural de mosquitos, infectando aproximadamente 100% da população em três meses. Outros testes de campo realizados em 2012 mostraram que a cepa *wMelPop* de *Wolbachia* foi capaz de invadir

76% e 81% da população natural de *Ae. aegypti* de Babinda e Machans Beach na Austrália, respectivamente (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2021b). Na Indonésia a técnica foi capaz de reduzir em 75% os casos de dengue nas áreas tratadas (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2021b).

Figura 12 - Esquema ilustrando a substituição de uma população de mosquitos após a liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia*



Fonte: Flores; O'neill; Scott L. (2018, adaptação nossa).

O sucesso do estabelecimento em campo levou a expansão dos testes em campos para outros países considerados endêmicos para dengue, como Brasil, Vietnã e Indonésia pelo World Mosquito Program (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2021a). Atualmente, a liberação de mosquitos da espécie *Ae. aegypti* transfectada com a linhagem wMel de *Wolbachia* refratária a arbovírus vem sendo utilizada em 14 países com variados perfis climáticos, demográficos e socioeconômicos. No Brasil, o programa foi implementado em 2012 e as liberações de *Ae. aegypti* infectados com *Wolbachia* iniciaram em 2014 nas cidades de Rio de Janeiro e Niterói no Estado do Rio de Janeiro (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2021a). Atualmente, mais três cidades brasileiras participam do programa: Campo Grande, Belo Horizonte e Petrolina.

Quadro 1 - Efeitos causados por *Wolbachia* em determinadas espécies de mosquitos infectados com diferentes vírus

(continua)

Espécie de Mosquito	Modo de infecção de <i>Wolbachia</i>	Cepa de <i>Wolbachia</i>	Vírus	Efeito	Referência
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Natural	wPip	WNV	Redução de carga viral e transmissão	Glaser; Meola (2010)
<i>Culex pipiens</i>	Natural	NE	WNV	Sem efeito	Mieli; Glaser (2014)
<i>Culex tarsalis</i>	Transinfecção	wAlbB	WNV	Aumento da taxa de infecção	Dodson <i>et al.</i> (2014)
<i>Aedes albopictus</i>	Natural	wAlbA e wAlbB	DENV	Sem efeito	Lu <i>et al.</i> (2012)
	Natural	wAlbA e wAlbB	DENV	Disseminação reduzida	Mousson <i>et al.</i> (2012)
			CHIKV	Sem efeito	Mousson <i>et al.</i> (2010)
	Introgressed	wAlbA e wAlbB	CHIKV	Sem efeito	Blagrove <i>et al.</i> (2013)
	Transinfecção	wMel	DENV	Transmissão reduzida	Blagrove <i>et al.</i> (2012)
<i>Aedes polynesiensis</i>	Transinfecção	wAlbB	CHIKV	Transmissão reduzida	Blagrove <i>et al.</i> (2013)
			DENV	Redução na carga viral, redução na transmissão	Bian <i>et al.</i> (2013)

Quadro 1 - Efeitos causados por *Wolbachia* em determinadas espécies de mosquitos infectados com diferentes vírus

(conclusão)

Espécie de Mosquito	Modo de infecção de <i>Wolbachia</i>	Cepa de <i>Wolbachia</i>	Vírus	Efeito	Referência	
<i>Aedes aegypti</i>	Transinfecção	wMelPop	DENV	Redução da taxa de infecção, carga viral e transmissão	Moreira, <i>et al.</i> (2009)	
			CHIKV	Redução da taxa de infecção e carga viral	Moreira, <i>et al.</i> (2009)	
			WNV	Redução da taxa de infecção, carga viral e transmissão	Hussain <i>et al.</i> (2013)	
			YFV	Redução da taxa de infecção e carga viral	Hurk <i>et al.</i> (2012)	
		wMel	DENV	Redução da carga viral, disseminação e transmissão	Hurk <i>et al.</i> (2012)	
			CHIKV	Redução da carga viral, e transmissão	Bian <i>et al.</i> (2010)	
			WNV	Atraso na acumulação de vírus, transmissão reduzida	Bian <i>et al.</i> (2010)	
			YFV	Redução da carga viral	Hurk <i>et al.</i> (2012)	
			wAlbB	YFV	Redução da carga viral	Bian <i>et al.</i> (2010)

Fonte: Johnson, K. (2015, adaptação nossa)

Legenda: WNV: vírus do oeste do Nilo, DENV: vírus dengue, CHIKV: vírus Chikungunya, YFV: vírus da febre amarela.

Apesar de algumas experiências bem-sucedidas, alguns outros relatos demonstraram que a infecção por *Wolbachia* pode levar ao aumento de infecções por alguns vírus como Vírus

do Oeste do Nilo em *Culex tarsalis*, vírus específicos de inseto em *Ae. aegypti* e *Plasmodium relictum* em *Culex pipiens*, com aumento significativo da prevalência do protozoário nas glândulas salivares (AMUZU *et al.*, 2018; DODSON *et al.*, 2014; ZÉLÉ *et al.*, 2014). Em *An. stephensi*, foi observado que à 28° C *Wolbachia* gera diminuição da atividade oocítica de *Plasmodium falciparum*. Entretanto, à 24°C há um aumento significativo dessa atividade, demonstrando que a atividade de *Wolbachia* pode variar também de acordo com a temperatura (MURDOCK *et al.*, 2014). Outro trabalho demonstrou que as cepas *wAlbB* e *wMelPop* quando presentes em *Anopheles gambiae* geram aumento e diminuição, respectivamente, dos níveis de oocistos de *Plasmodium berghei*, sugerindo que diferentes cepas de *Wolbachia* apresentam diferentes interações patógeno-hospedeiro (HUGHES *et al.*, 2012).

Dessa maneira, portanto, autores discutem que os efeitos da transfecção de *Wolbachia* pode variar de acordo com a cepa, o hospedeiro, o patógeno e entre os diversos ambientes onde estes se encontram (HUGHES *et al.*, 2012; HUGHES; RIVERO; RASGON, 2014; MURDOCK *et al.*, 2014).

Em *Ae. albopictus* também foram realizadas transfecções com as cepas *wMel* e *wPip* que geraram IC em populações naturais do mosquito que são naturalmente infectadas com as cepas *wAlbA* e *wAlbB* (BLAGROVE *et al.*, 2013; CALVITTI *et al.*, 2010). Além disso, a cepa *wMel* diminuiu a transmissão dos vírus DENV e CHIKV (BLAGROVE *et al.*, 2012, 2013). Recentemente, Kittayapong *et al.*, 2019 relatou o sucesso da implementação da utilização da combinação da Técnica do Inseto Estéril juntamente com a Técnica do Inseto Refratário na Tailândia ao realizar a liberação de *Ae. albopictus* infectados com a cepa *wPip* com o objetivo de suprimir a população local do mosquito (KITAYAPONG *et al.*, 2019).

Apesar do grande número de publicações que relatam os benefícios da utilização da *Wolbachia*, é importante observar outros trabalhos que apresentam resultados diferentes daqueles reportados pela maioria. Apesar das contradições, a liberação de culicídeos infectados com a bactéria para supressão ou substituição da população está em expansão.

3 JUSTIFICATIVA

A liberação de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* carreando a bactéria *Wolbachia pipientis* é realizada através do programa *World Mosquito Program* desde 2011 em 14 países das Américas e Ásia, incluindo o Brasil, onde o programa é realizado nas cidades de Niterói, Rio de Janeiro, Campo Grande, Belo Horizonte e Petrolina (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2021).

A cidade de Petrolina está situada no estado de Pernambuco (PE), um dos estados que mais registrou casos de dengue, Zika e chikungunya durante a tríplice epidemia que ocorreu em 2015 e, até dezembro de 2019, foram confirmados aproximadamente 21 mil casos de tais arboviroses (PERNAMBUCO, 2019). Diante desta situação epidemiológica, outras cidades de PE, incluindo a cidade do Recife, são possíveis alvos para utilização de novas tecnologias, incluindo a liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia*

Apesar do sucesso de programas baseados na liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia* pouco se conhece sobre a distribuição da bactéria em outras espécies de culicídeos, e até o momento, não foi realizada uma análise nas populações naturais de mosquitos silvestres quanto à presença ou não da bactéria *Wolbachia* presentes no município de Recife, processo importante antes da implementação de programas de liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia*, visto que, dependendo dos padrões de compatibilidade entre as cepas, pode haver interferência no sucesso do programa (ROSS; CALLAHAN *et al.*, 2020).

Desta maneira, esse projeto visa analisar a presença natural da bactéria *W. pipientis* em mosquitos silvestres presentes no município de Recife, avaliar sua distribuição e compreender as relações filogenéticas das linhagens de *Wolbachia* e seus hospedeiros.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual a diversidade genética e distribuição de linhagens de *Wolbachia pipientis* presentes em diferentes espécies de mosquitos silvestres provenientes do município de Recife?

5 HIPÓTESE

A bactéria *Wolbachia pipientis* está amplamente distribuída e com alto grau de variabilidade genética, nos mosquitos silvestres provenientes do município de Recife.

6 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade de cepas e linhagens da bactéria *Wolbachia pipientis* presentes em mosquitos silvestres coletados no município de Recife.

6.1 Objetivos específicos

- a) Caracterizar as diferentes linhagens de *Wolbachia* presentes em mosquitos de áreas silvestres do município de Recife;
- b) Calcular a taxa de infecção por *Wolbachia* em cada espécie amostrada e estimar a distribuição da bactéria;
- c) Estimar a diversidade genética das diferentes linhagens de *Wolbachia* circulantes no município de Recife.
- d) Avaliar as relações filogenéticas entre as diferentes linhagens e seus hospedeiros.

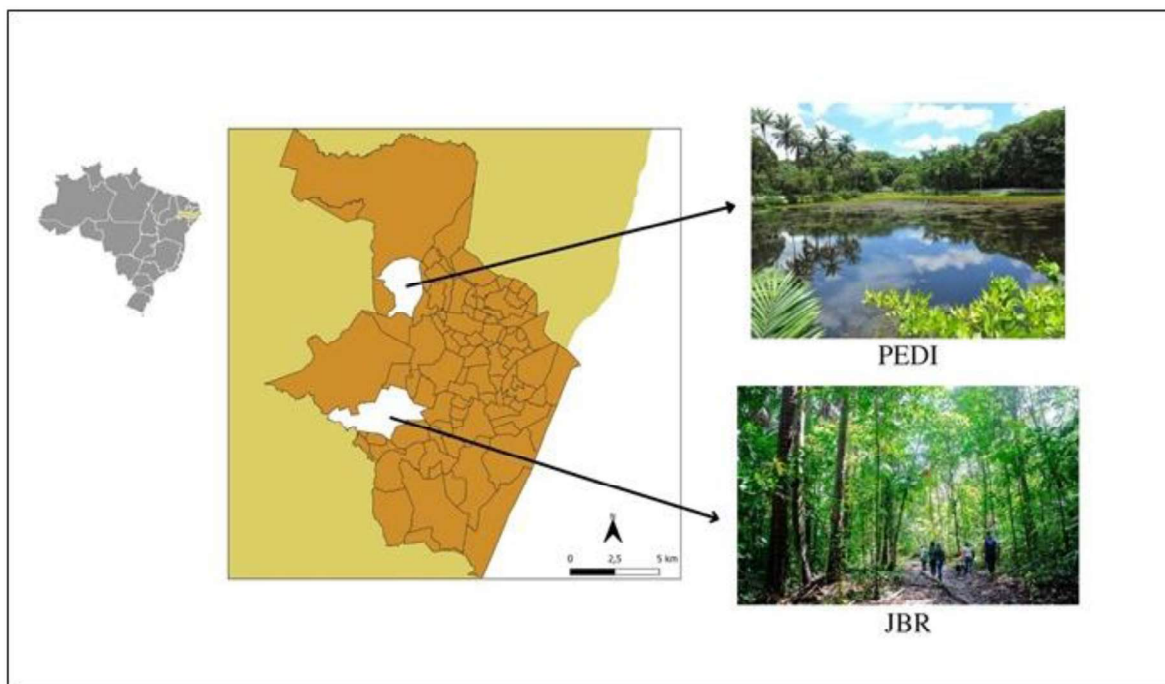
7 MATERIAIS E MÉTODOS

Na presente seção deste trabalho serão descritos os processos metodológicos utilizados para o desenvolvimento dos objetivos propostos.

7.1 Área de estudo

A área de estudo selecionada para este trabalho abrange o município de Recife, capital do estado de Pernambuco, que apresenta clima tropical, com temperatura máxima média de 29°C e mínima de 21,8°C ao longo do ano (AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMAS, 2021). Dois pontos para a coleta de mosquitos silvestres foram selecionados, baseados nos resquícios de Mata Atlântica: o Parque Ecológico de Dois Irmãos, que apresenta 384,42 hectares (-8.012915, -34.944996) e o Jardim Botânico do Recife, com 11,23 hectares (-8.066140, -34.963022). Estes dois locais ficam a 10 km de distância entre si (JARDIM BOTÂNICO DO RECIFE, 2021; PERNAMBUCO, 2021) (**Figura 13**). Tais locais foram escolhidos com o objetivo de obter a maior diversidade de espécies de mosquitos possível.

Figura 13 - Mapa do município de Recife demonstrando os locais de coleta de culicídeos



Fonte: A autora (2021)

Legenda: **PEDI:** Parque Ecológico de Dois Irmãos, **JBR:** Jardim Botânico do Recife.

7.2 Coleta e amostragem

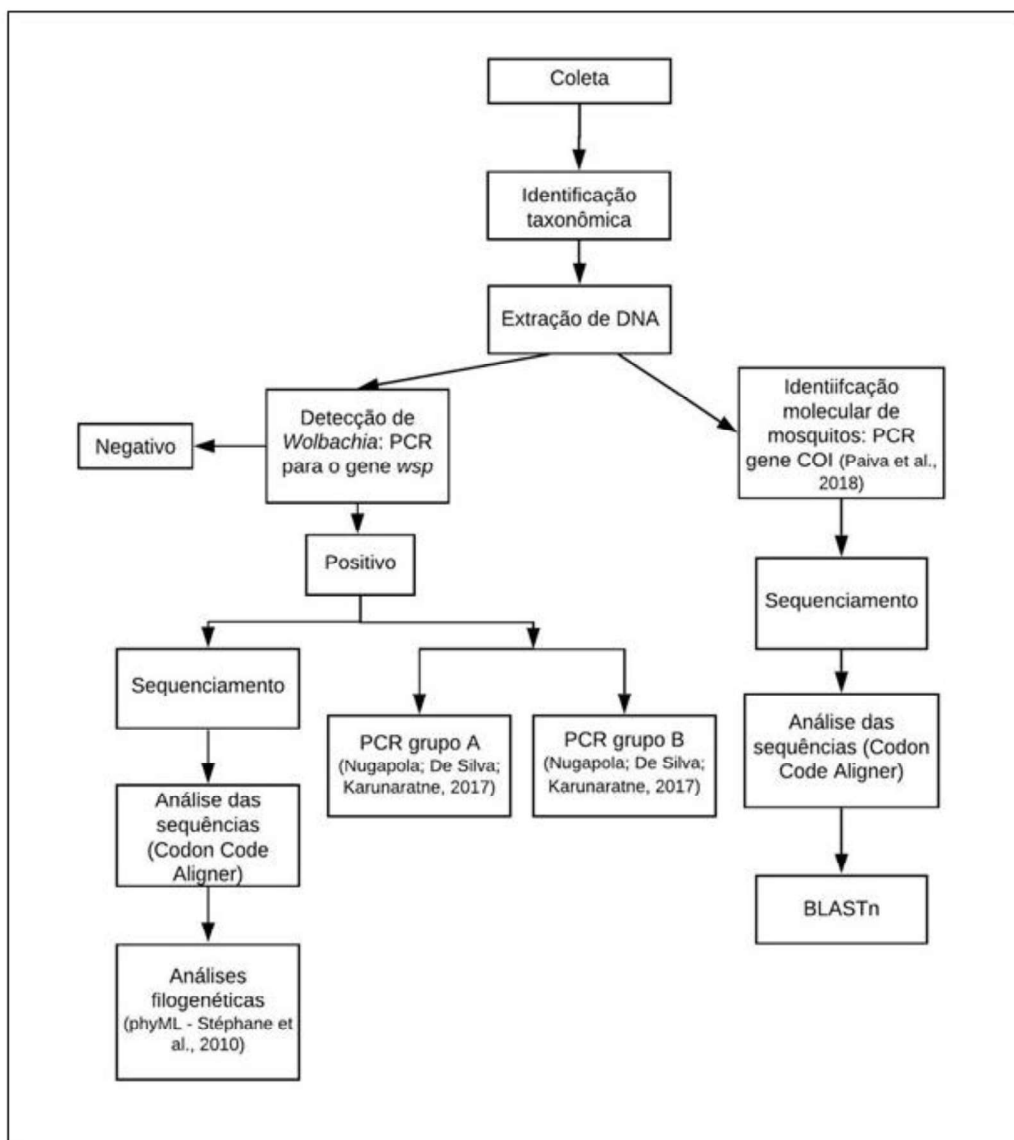
Os mosquitos utilizados neste trabalho foram coletados através do puçá entomológico (**Figura 14**). O instrumento foi escolhido em detrimento de outros tipos de armadilha, devido ao fato de que aspiradores entomológicos não são específicos para mosquitos e capturam um grande número de outros organismos em ambiente de mata, e as armadilhas noturnas exigem aparato elétrico.

Figura 14 - Puçá entomológico utilizado para coletas de mosquitos em ambientes silvestres



Fonte: Puçá entomológico, 2018

As coletas foram realizadas em cada localidade uma vez ao mês, durante o ano de 2019, no período da manhã entre às 9h e às 12h e no período da tarde entre às 14h e às 16h, com a finalidade de coletar espécies com hábitos diversos. Os mosquitos coletados foram submetidos ao fluxo de trabalho descrito na **Figura 15**.

Figura 15 - Fluxograma metodológico

Fonte: A autora (2020)

Os espécimes coletados foram transportados vivos em sacos de aspiração e em recipientes de plásticos para o Laboratório de Entomologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), onde foram submetidos a -20°C por 30 minutos, em seguida foram triados visualmente, quantificados e acondicionados em tubos individuais. Posteriormente, estes indivíduos foram identificados através de características morfológicas externas por meio das chaves dicotômicas de Consoli; Lourenço-de-Oliveira (1994) e Forattini (2002) e armazenadas a -20°C em microtubos por espécie. Para cada espécie, foi estabelecido um número mínimo de 10 espécimes necessárias para se avaliar a infecção com *Wolbachia*, espécies coletadas que não obtiveram o número mínimo necessário não foram analisadas (FORATTINI, 2002, ROTRAUT; OLIVEIRA, 1994).

7.3 Extração de DNA

Os mosquitos coletados foram submetidos à extração de DNA individual, segundo o protocolo de suspensão em álcool de Ayres, *et al.* (2003). As amostras foram maceradas em 400 µl de tampão de lise (4 ml de NaCl 5 M, 0,5 ml de Tris 1 M e 0,2 ml de EDTA 0,5 M), 7 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 72 µl de SDS 10% e incubados por 8 horas a 65°C. Em seguida, foram adicionados 420 µl de NaCl 5 M a cada tubo e homogeneizado por 1 minuto. Posteriormente, foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos. Ao precipitado foram adicionados 800 µL de isopropanol e homogeneizado novamente. As amostras foram incubadas a -20°C por 1 hora, em seguida foi descartado o sobrenadante e o pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA foi ressuspendido com 100 µL de tampão de eluição 1X (Tris-HCl 10mM e EDTA 1 mM) e as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior utilização.

7.4 Análises moleculares para detecção de *Wolbachia pipientis*

Para a confirmação das espécies foi realizada uma PCR para cada indivíduo, para o gene Citocromo C Oxidase subunidade I (COI), com os *primers* *COIF* (5'- GGA GGR TTT GGA AAY TGA YTA GTY CC -3') e *COIR* (5'- GCW GAW GTA AAR TAA GCT CGW GTA TC- 3') sob às seguintes condições: 0,5 mM de cada dNTP, 10 mM de cada primer, 1,5 U de Taq DNA polimerase (GoTaq Flexi DNA Polymerase), 2,5 µL de tampão (Green GoTaq), 2 mM de MgCl₂ e 20 ng do DNA molde, para um volume final de 25 µL. A reação é realizada da seguinte forma: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto, 1 ciclo de 72°C por 8 minutos, e um ciclo final em *hold* a 10° C (PAIVA *et al.*, 2019).

Para avaliar a presença de *Wolbachia* nos mosquitos coletados, foi realizada uma PCR para o gene *wsp*, que codifica uma proteína da superfície da bactéria e está presente em todas as diferentes linhagens (BRAIG *et al.*, 1998). Os *primers* utilizados foram *wspF* descritos por ZHOU; ROUSSET; O'NEIL (1998) que amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pares de base (pb), variando de acordo com a linhagem presente (**Quadro 2**). A reação possui as seguintes condições: 0,5 mM de cada dNTP, 10 mM de cada primer 5 U de GoTaq Flexi DNA polymerase, 2,5 µL de tampão (Green GoTaq), 2 mM de MgCl₂ e 20 ng do DNA molde, para um volume final de 25 µL. O programa utilizado para amplificação foi: 94° C por 5

minutos, seguido por 30 ciclos de 95° C por 45 segundos, 55° C por 1 minuto, 72° C por 50 segundos, e um ciclo final de 72° C por 8 minutos.

Para confirmação da amplificação do fragmento foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5X e corado com brometo de etídio 10 mg/ml submetido a 120 volts durante uma hora e visualizado em um transiluminador ultravioleta.

Para as amostras que apresentaram banda única com fragmento no tamanho esperado, o produto de PCR foi submetido a sequenciamento.

As amostras que foram consideradas positivas para o gene *wsp*, foram submetidas a uma PCR com *primers* para os grupos específicos de *Wolbachia*, descritos no **Quadro 2**. Esta PCR foi realizada sob as mesmas concentrações de reagentes da PCR para o gene *wsp*, e sob as seguintes condições de amplificação: 94° C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95° C por 45 segundos, 55° C por 1 minuto, 72° C por 45 segundos, e um ciclo final de 72° C por 8 minutos. O controle positivo utilizado para todas as PCRs foi uma amostra de DNA extraído de *Aedes albopictus* que naturalmente possui cepas do grupo A e B (KULKARNI *et al.*, 2019).

A taxa de infecção em porcentagem foi calculada através do número de indivíduos considerados positivos para o gene *wsp*, dividido pelo número total de culicídeos analisados daquela espécie.

Quadro 2 - Sequência de *primers* utilizados para as reações de PCR

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Fonte
<i>wsp</i>	<i>wsp</i> F: TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC TAG CTA <i>wsp</i> R: AAA AAT TAA ACG CTA CTC CAG CTT CTG CAC	600	Zhou; Rousset; O'neil, 1998
Grupo A	136 F: TGA AA TTT TAG CTC TTT TC 691R: AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA	556	
Grupo B	81 F: TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC 522R: ACC AGC TTT TGC TTG ATA	442	Nugapola; De Silva; Karunaratne, 2017

Fonte: A autora (2020)

7.5 Sequenciamento

O produto da amplificação por PCR foi posteriormente enviado para sequenciamento no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM/FIOCRUZ-PE, realizado no sequenciador ABI 3500xl (Applied Biosystems) com o kit ABI PRISM BigDye Terminator

Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®). Para a reação de sequenciamento, foram utilizados 1 µL de cada primer a 3,2 pmol/µL; 0,5 µL de BigDye® Terminator v3.1; 1 µL de Tampão de sequenciamento 5x (Tris-HCl, 200 mM, pH 9.0, MgCl₂ 5 mM); 1 µL do produto de PCR purificado (5 a 20 ng/µL) e água MilliQ 10 µL q.s.p. As condições de amplificação foram: 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 15 seg, 50 °C por 10 seg e 60 °C por 4 min. Após a amplificação, foi realizada a purificação e precipitação do DNA utilizando 1 µL de EDTA (125 mM, pH 8,0) e 25 µL de etanol 100%, em seguida o produto foi centrifugado a 1533 g por 45 minutos. Após a centrifugação, o precipitado foi lavado com 25 µl de etanol 70% e centrifugado. Por fim, o precipitado foi ressuspensionado em 10 µL de Formamida Hi-Di e aplicado no sequenciador.

7.6 Análise dos dados

Após o sequenciamento, as sequências foram analisadas através do programa CodonCode Aligner (v.3.7.1) (CODONCODE, 2021), no qual foram utilizadas apenas as sequências com valor de Phred acima de 20.

Com o objetivo de compreender a diversidade das linhagens de *Wolbachia* encontradas no presente estudo, foi construída uma árvore filogenética a fim de compará-las com outras linhagens já descritas. Para tanto, foram obtidas sequências do gene *wsp* de *Wolbachia pipientis* dos bancos de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e PUBMLST (*Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*), apenas de amostras das quais foi possível recuperar informações sobre a taxonomia do hospedeiro. Em seguida, foi realizado *Blastn* utilizando as sequências retiradas dos bancos de dados como banco de referência, e as sequências de *wsp* obtidas neste trabalho como sondas. A partir destes, foram recuperadas as 10 primeiras sequências mais semelhantes, e sequências redundantes foram removidas. As sequências de *wsp* provenientes deste trabalho foram agrupadas com as sequências provenientes do *Blast* e com *wsp* de genomas de referência de *Wolbachia* recuperados do banco NCBI. Em seguida, foi realizado o alinhamento através do método múltiplo local com a ferramenta MAFFT online com correção de sequências invertidas e utilizando o método iterativo de refinamento E-INS-i (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2019).

As regiões conservadas das sequências foram obtidos com a ferramenta Gblocks (CASTRESANA, 2000), a seleção do melhor modelo de substituição foi realizada pelo algoritmo *Smart Model Selection* (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2017;

NOTREDAME, 2018) na plataforma ATCG-Montpellier. A filogenia foi realizada através de duas abordagens, a primeira foi utilizado o método de máxima verossimilhança, com avaliação de suporte de ramo por aLRT-SH like, pela ferramenta online phyML com uma árvore inicial definida pelo algoritmo BioNJ (Biological-Neighbor joining) (GUINDON *et al.*, 2010). A segunda abordagem utilizou a inferência Bayesiana com a ferramenta Mr.Bayes (RONQUIST *et al.*, 2012), utilizando 3 árvores iniciais e gerações suficientes para obter um desvio padrão entre as árvores finais menor ou igual a 0.005.

Para a construção da árvore filogenética dos hospedeiros de *Wolbachia* foram utilizados os genomas mitocondriais de cada espécie retirados do banco de dados NCBI. O alinhamento e a construção da árvore foram realizados através da abordagem de máxima verossimilhança com os mesmos parâmetros acima descritos. Para melhor visualização da filogenia, foi realizada a clusterização de sequências provenientes dos bancos de dados que apresentaram valores mínimos de 95% de identidade e 95% de cobertura. Para cada um dos *clusters* a sequência mais longa foi mantida como representante. A anotação e adição dos dados de *Wolbachia* foram realizados na plataforma iTOL online (CICCARELLI *et al.*, 2006).

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo realizou coletas de culicídeos em áreas de preservação de Mata Atlântica no município de Recife. Dessa maneira, foi obtida autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) de número 58716-4 para realização das coletas durante o ano de 2019 (**Anexo**). A pesquisa não envolveu humanos nem uso de animais de laboratório, sendo assim, não se fez necessária a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

9 RESULTADOS

Na presente seção serão descritos os resultados obtidos neste trabalho.

9.1 Coleta e amostragem de mosquitos

Entre janeiro e dezembro de 2019 foram realizadas 11 coletas no Jardim Botânico do Recife (JBR) e no Parque Ecológico de Dois Irmãos (PEDI). Ao todo foram coletados mosquitos pertencentes a 6 gêneros e 11 espécies. Entretanto, a espécie *Haemagogus janthinomys* (dois espécimes coletados) foi excluída das análises, pois não atingiu o número mínimo de 10 espécimes necessário. Dessa maneira, 10 espécies de 5 gêneros distintos de culicídeos foram utilizados para detecção de *Wolbachia* (**Quadro 3**). Ao total foram analisadas 195 amostras de culicídeos quanto a presença de *Wolbachia*. Destes, 66,5% das amostras foram provenientes do PEDI e 33,5% do JBR (**Figura 16**).

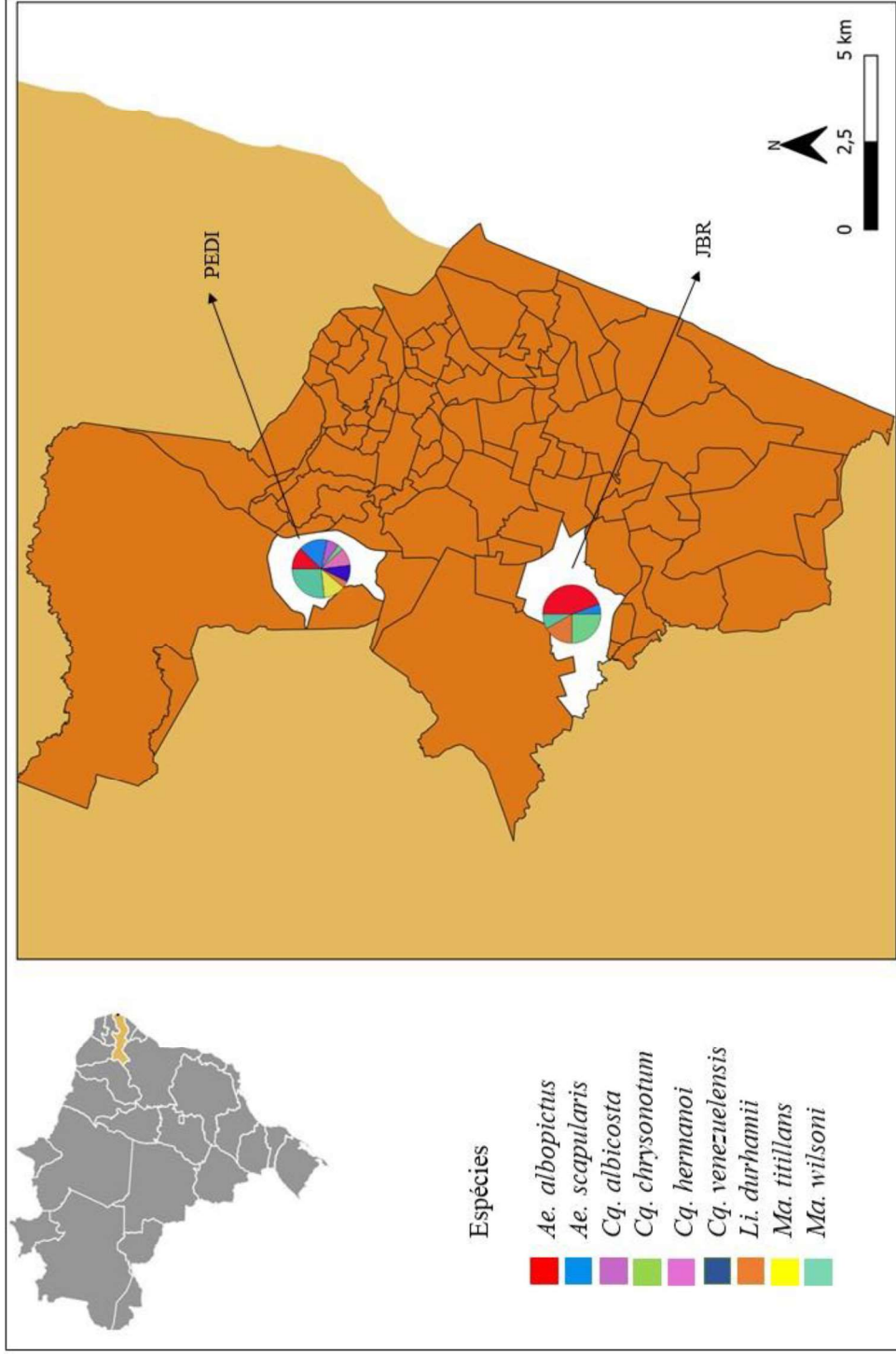
Quadro 3 - Espécies de culicídeos analisadas quanto a presença de *Wolbachia* de acordo com o local de coleta

Gênero	Espécie	Local de coleta	Número de indivíduos analisados
<i>Aedes</i>	<i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse, 1895)	JBR e PEDI	32
	<i>Aedes (Ochlerotatus) scapularis</i> : (Rondani, 1848)	JBR e PEDI	23
<i>Coquillettidia</i>	<i>Coquillettidia (Rhynchotaenia)</i> <i>albicosta</i> : (Chagas, 1908)	PEDI	10
	<i>Coquillettidia (Rhynchotaenia)</i> <i>chrysonotum</i> : (Peryassú, 1922)	JBR e PEDI	16
	<i>Coquillettidia (Rhynchotaenia)</i> <i>hermani</i> : (Lane & Coutinho, 1940)	PEDI	13
	<i>Coquillettidia (Rhynchotaenia)</i> <i>venezuelensis</i> : (Theobald, 1912)	PEDI	12
<i>Limatus</i>	<i>Limatus durhamii</i> : Theobald, 1901	JBR e PEDI	12
<i>Mansonia</i>	<i>Mansonia (Mansonia) titillans</i> : (Walker, 1848)	PEDI	16
	<i>Mansonia (Mansonia) wilsoni</i> : (Barreto & Coutinho, 1944)	JBR e PEDI	38
<i>Psorophora</i>	<i>Psorophora (Janthinosoma) ferox</i> : (von Humboldt, 1819)	JBR	23

Fonte: A autora (2021).

Legenda: **JBR:** Jardim Botânico do Recife, **PEDI:** Parque Ecológico Dois Irmãos.

Figura 16 - Proporção de espécimes das diferentes espécies de culicídeos analisadas nos dois locais de coleta no município de Recife



Fonte: A autora (2021).

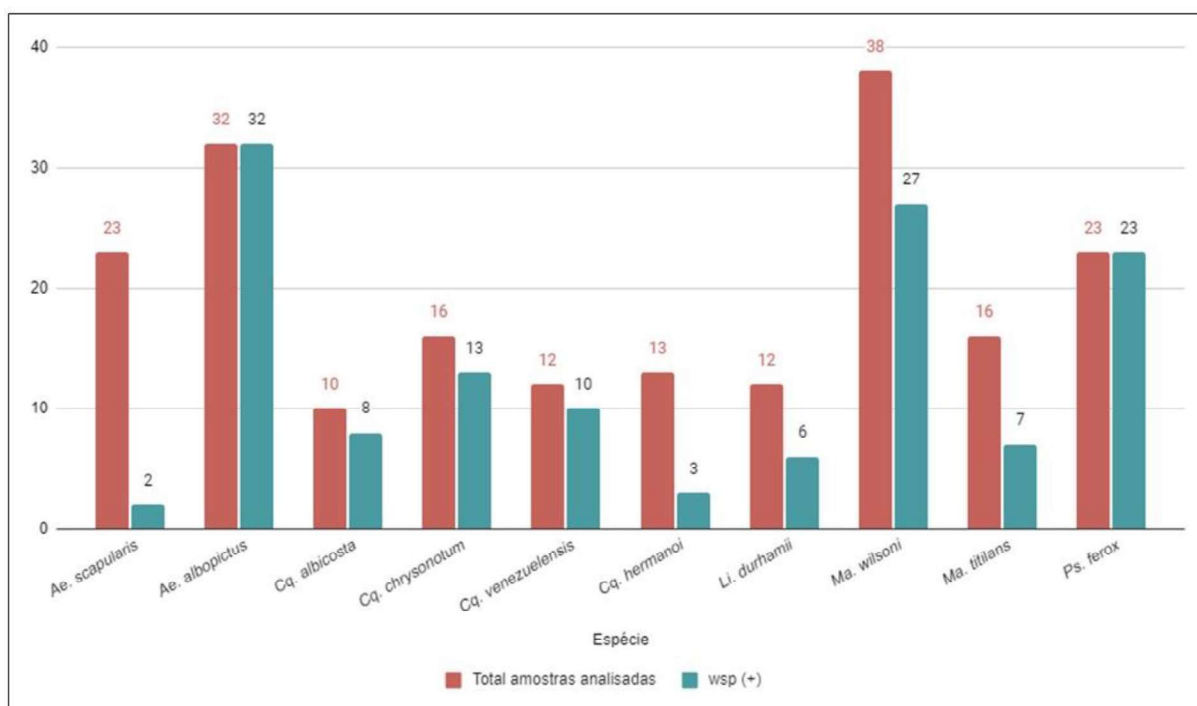
9.2 Detecção e identificação molecular de *Wolbachia*

Na presente seção serão descritos os resultados quanto a presença e identificação de *Wolbachia* nos mosquitos coletados.

9.2.1 Amplificação do gene *wsp*

A presença de *Wolbachia* foi analisada em 195 espécimes, das quais, a presença de banda específica do gene *wsp* foi obtida para 131 amostras. Desta maneira, 67% dos espécimes avaliados foram positivos para a presença de *Wolbachia* (**Figura 17**). Todas as amostras consideradas positivas apresentaram amplificação de fragmento de aproximadamente 550 pb (**Figura 18**).

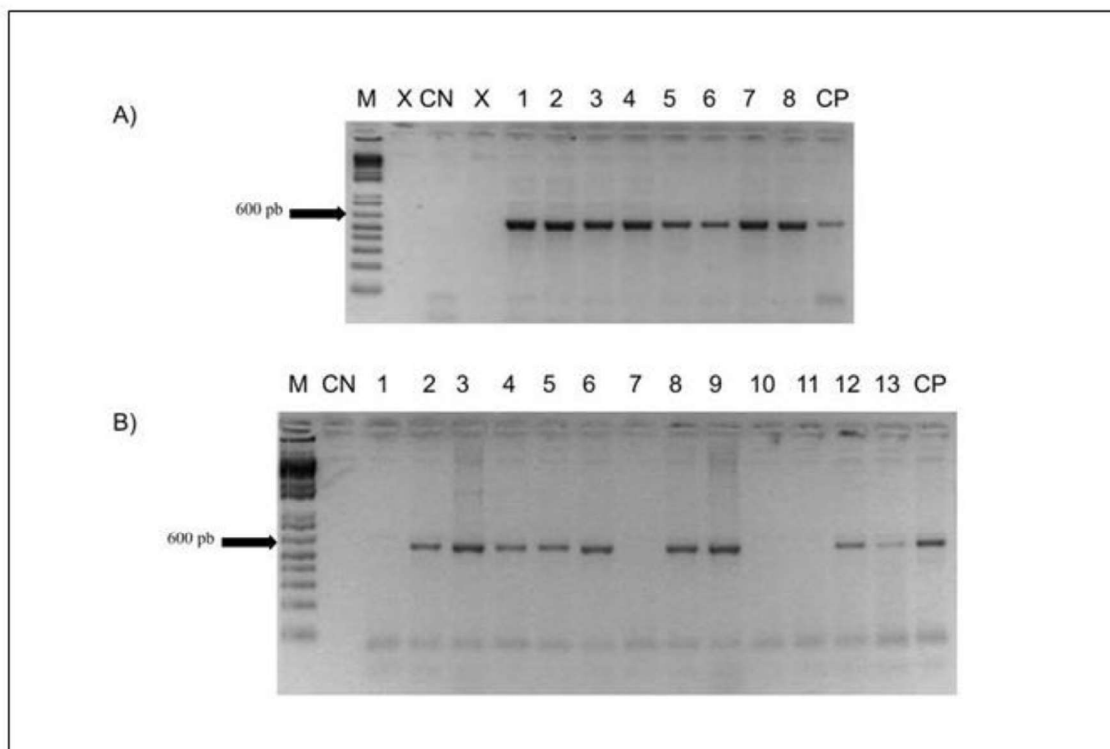
Figura 17 - Espécies analisadas quanto a presença de *Wolbachia* e o número de amostras positivas para o gene *wsp*



Fonte: A autora (2021)

Legenda: **wsp (+)**: número de amostras positivas para o gene *wsp*.

Figura 18 - Gel de agarose a 1,5 % demonstrando o padrão de banda encontrado para o gene *wsp*, com amplificação de 550 pb



Fonte: A autora (2021)

Legenda: **A)** gel de agarose mostrando a amplificação de todas as amostras analisadas. **B)** gel de agarose com amostras positivas e negativas para o gene *wsp* de *Wolbachia*. **M:** marcador 1Kb Plus; **X:** poço sem amostra; **CN:** controle negativo da reação; **1 a 13:** produtos de PCR para o gene *wsp*; **CP:** controle positivo da reação.

9.2.2 Caracterizações das linhagens de *Wolbachia*

Na presente seção serão descritos os resultados quanto a caracterização das linhagens de *Wolbachia*.

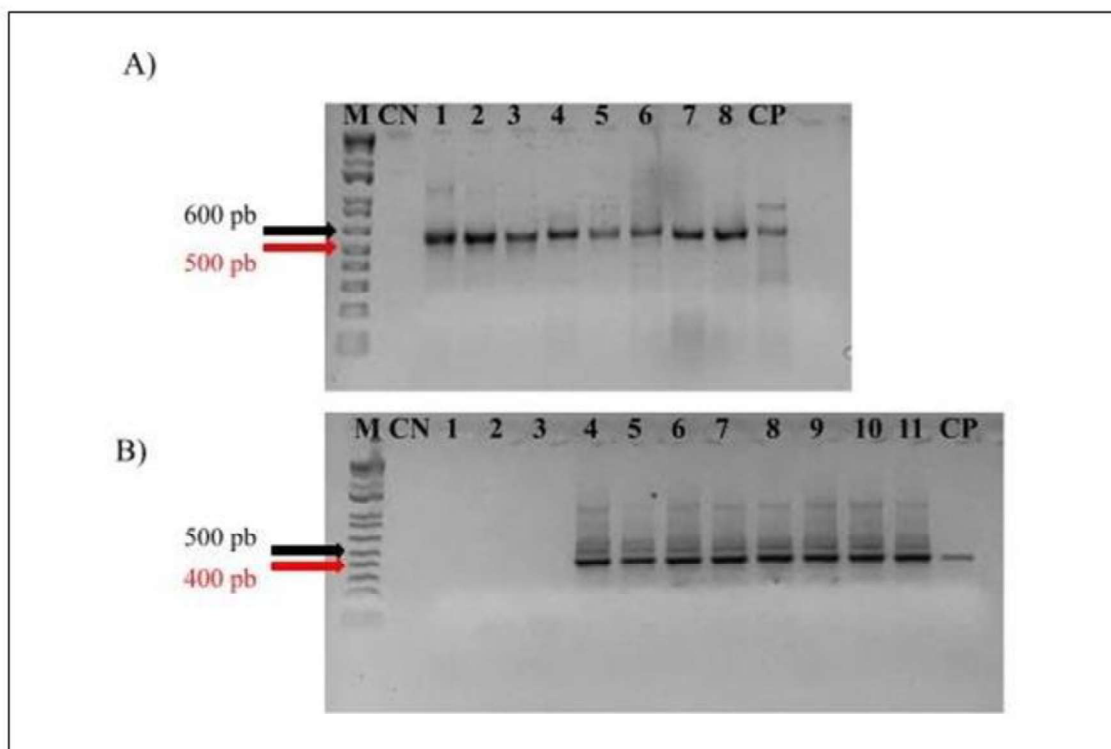
9.2.2.1 Análises moleculares

Das 131 amostras positivas para o gene *wsp*, 125 foram submetidas a PCRs específicas para o supergrupo A e supergrupo B de *Wolbachia*. A PCR realizada para o supergrupo A, gerou um fragmento único de tamanho esperado de aproximadamente 500 pb, visualizado em gel de agarose (**Figura 19a**).

A PCR realizada para amplificação da região que caracteriza *Wolbachia* do supergrupo B gerou dois fragmentos, o menor de aproximadamente 490 pb e o maior de aproximadamente 550 pb (**Figura 19b**). O controle positivo utilizado nas reações apresentou um fragmento de

aproximadamente 500 pb. Considerando dados de outros estudos e a amplificação do controle positivo, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram amplificação do fragmento de 500 pb.

Figura 19 - Gel de agarose a 1,5 % demonstrando o padrão de banda encontrado para os fragmentos específicos dos supergrupos A e B de *Wolbachia*

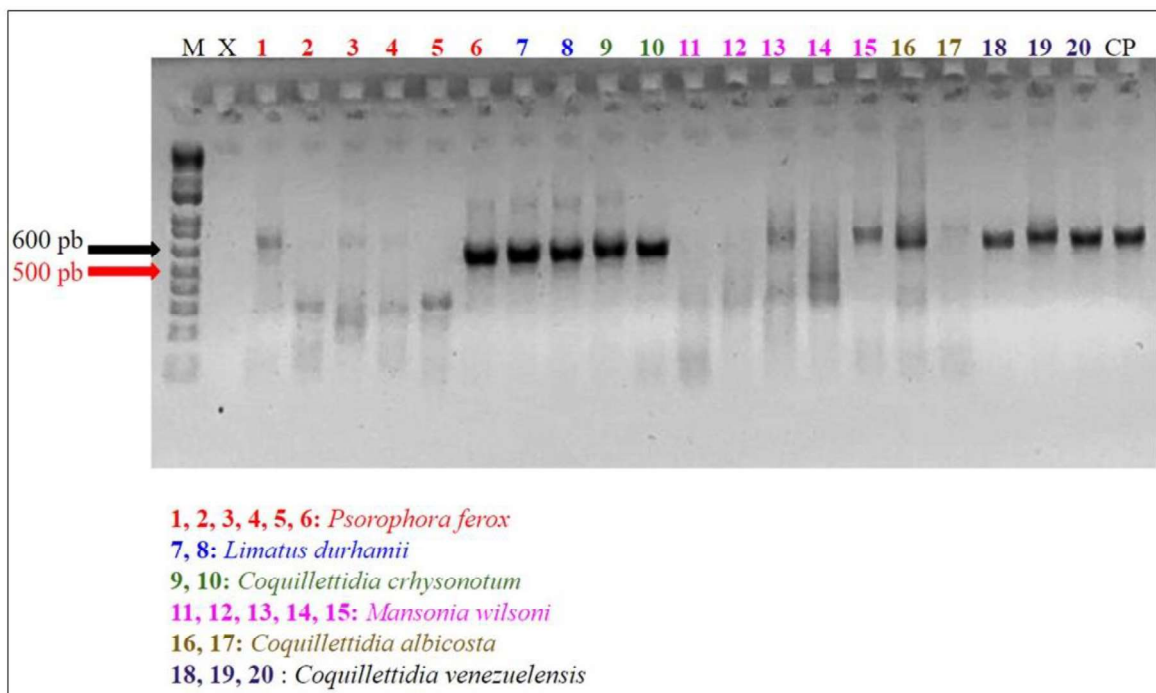


Fonte: A autora (2021)

Legenda: **A)** Gel de agarose mostrando a amplificação do fragmento correspondente ao supergrupo A de aproximadamente 550 pb. **B)** Gel de agarose revelando a amplificação de mais de um fragmento para a PCR específica do supergrupo B de *Wolbachia*. **M:** marcador 1Kb Plus; **X:** poço sem amostra; **CN:** controle negativo da reação; **1 a 11:** produtos de PCR; **CP:** controle positivo da reação.

Os fragmentos amplificados para os supergrupos A variaram nas amostras entre 300 pb e 600 pb, dependendo da espécie analisada (**Figura 20**). A variação ocorreu mesmo dentro de uma mesma espécie analisada, não podendo ser observado um padrão. Entretanto, só foram consideradas positivas para o supergrupo A as amostras que apresentaram padrão de banda próximo a 500 pb.

Figura 20 - Gel de agarose a 1,5% revelando diferentes tamanhos de fragmentos amplificados para a PCR realizada para a região que caracteriza *Wolbachia* do supergrupo A



Fonte: A autora (2021)

Legenda: M: marcador 1Kb Plus; X: poço sem amostra; 1 a 20: produtos de PCR; CP: controle positivo da reação.

Das 125 amostras submetidas às PCRs específicas para os supergrupos A e B, 74 foram positivas para o supergrupo A e 64 para o supergrupo B. Destas amostras, 49% apresentou superinfecção, ou seja, foram positivas para a região do supergrupo A e do supergrupo B (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Número de amostras positivas para os genes que amplificam regiões específicas do supergrupo A e supergrupo B

Espécie	Total amostras analisadas	wsp (+)	% positiva	PCR específica	grupo A (+)	grupo B (+)	% superinfecção **
<i>Ae. scapularis</i>	23	2	8,69	23	0	0	0
<i>Ae. albopictus</i>	32	32	100	18	18	18	100%
<i>Cq. albicosta</i>	10	8	80	6	5	1	0
<i>Cq. chrysonotum</i>	16	13	81,25	12	12	9	75%
<i>Cq. venezuelensis</i>	12	10	83,33	8	6	6	85%
<i>Cq. hermanoi</i>	13	3	23,07	1	1	0	0
<i>Li. durhamii</i>	12	6	50	9	5	6	83%
<i>Ma. titilans</i>	16	7	43,75	6	5	6	83%
<i>Ma. wilsoni</i>	38	27	71,05	24	17	18	65%
<i>Ps. ferox</i>	23	23	100	20	5	0	0
TOTAL	200	131	65,5*	127	74	64	49,1*

Fonte: A autora (2021)

Nota: **wsp (+):** amostras positivas para o gene. **% positiva:** porcentagem de amostras positivas para o gene considerando o total de amostras analisadas. **PCR específica:** número de amostras processadas para a PCR específica para os supergrupos A e B. **grupo A (+):** número de amostras da espécie positivas para o supergrupo A. **grupo B (+):** número de amostras da espécie positivas para o supergrupo B. **% superinfecção:** porcentagem de amostras positivas para o supergrupo A e B considerando o total de amostras analisadas para ambos. *: média das porcentagens.

9.2.2.2 Análises filogenéticas

No total, 43 sequências provenientes do gene *wsp* pertencentes a oito espécies foram analisadas (**Tabela 2**). Não houve sucesso no sequenciamento das amostras de *Ae. scapularis* e *Ps. ferox*.

Tabela 2 - Número de amostras, por espécie, positivas para o gene *wsp* que foram sequenciadas

Espécie	Número de amostras sequenciadas
<i>Aedes albopictus</i>	8
<i>Coquilettidia albicosta</i>	5
<i>Coquilettidia chrysonotum</i>	11
<i>Coquilettidia hermanoi</i>	1
<i>Coquilettidia venezuelensis</i>	5
<i>Limatus durhamii</i>	5
<i>Mansonia wilsoni</i>	5
<i>Mansonia titilans</i>	3
Total	43

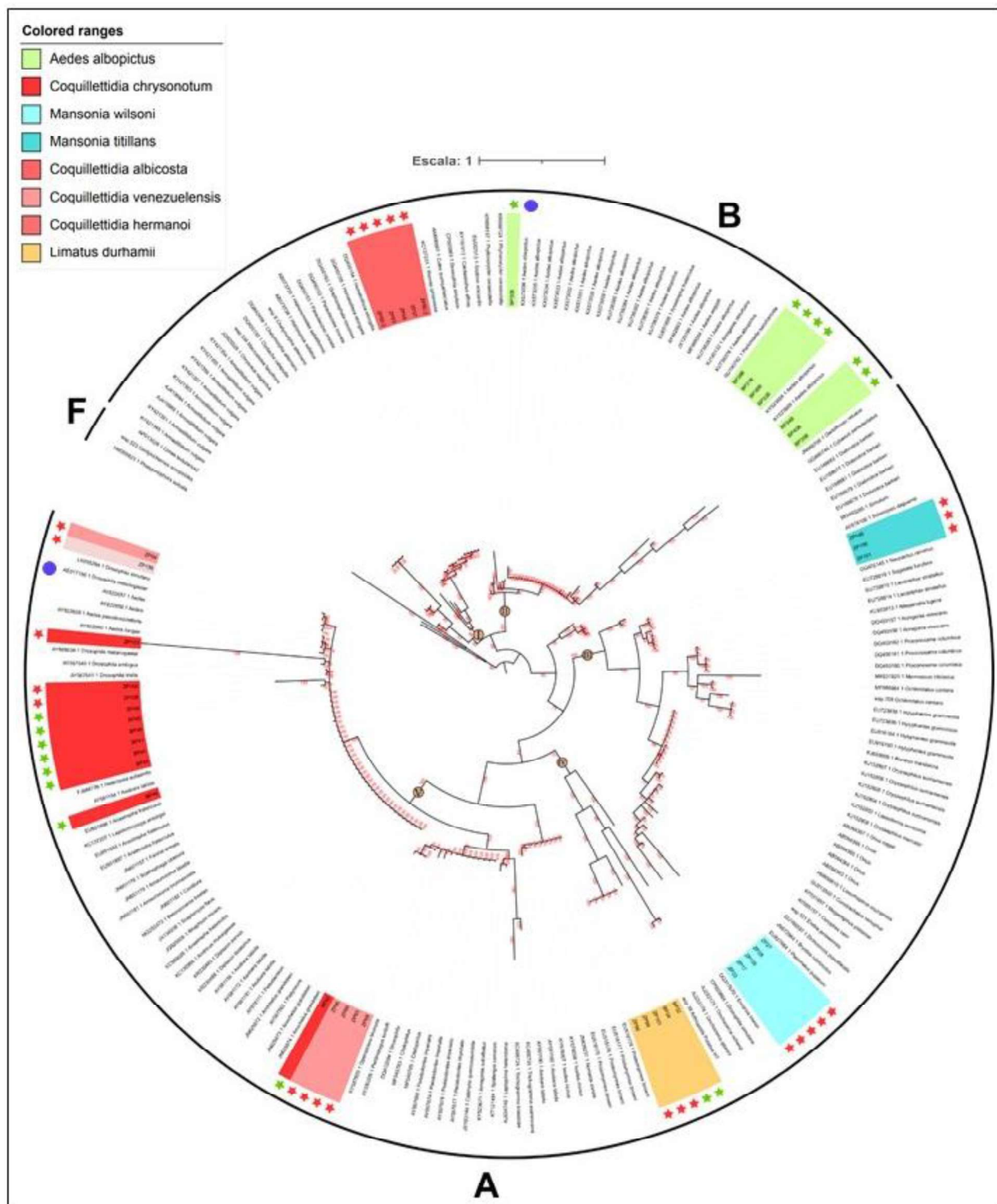
Fonte: A autora (2021)

Foram obtidas 741 sequências do gene *wsp* do banco de dados PUBMLST e 4368 do NCBI, das quais após clusterização, ou seja, retirada de sequências redundantes, foram utilizadas 164 para a filogenia, juntamente com as 43 amostras sequenciadas a partir do produto de PCR, totalizando 207 sequências utilizadas para as análises.

As sequências obtidas através da amplificação do gene *wsp* agruparam na árvore filogenética com sequências dos bancos de dados dos supergrupos A e B (**Figura 21 a 24**). Sequências das espécies *Ae. albopictus* e *Cq. albicosta* agruparam com sequências do

supergrupo B, enquanto as outras espécies analisadas agruparam com o supergrupo A. Não houve nenhum registro de sequências diferentes da mesma espécie agrupadas em supergrupos diferentes. Através da matriz de distância nucleotídica foi observado que as sequências compartilham 84,5% de identidade entre si (**Apêndice**).

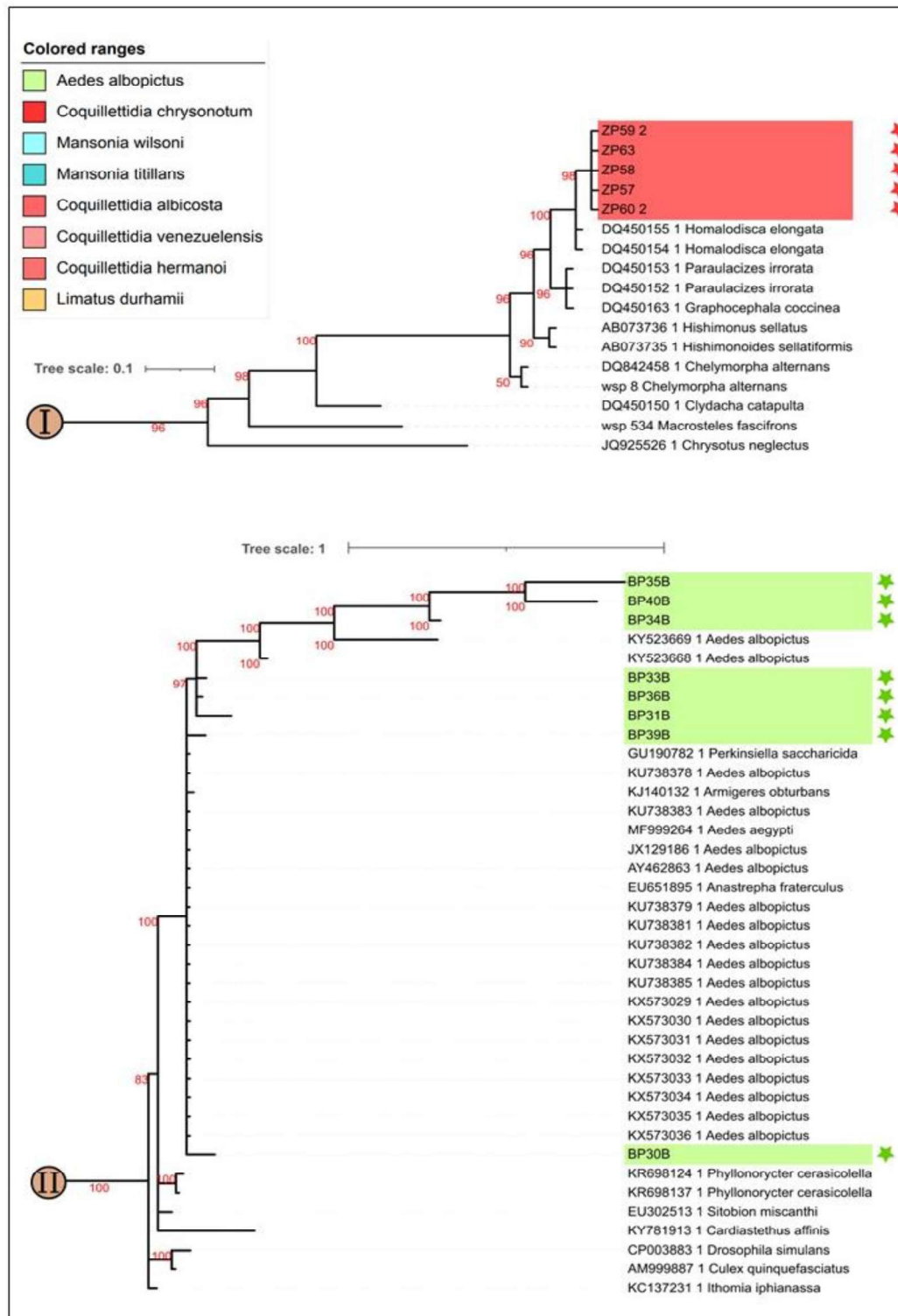
Figura 21 - Árvore filogenética com sequências do gene *wsp* de *Wolbachia*



Fonte: A autora (2021)

Nota: Amostras obtidas neste trabalho provenientes do Jardim Botânico estão denominadas como BP e representadas por uma estrela de cor verde, enquanto que as amostras provenientes do Parque Estadual Dois irmãos estão denominadas como ZP e representadas por uma estrela de cor vermelha. As cores representam as sequências das cinco diferentes espécies obtidas neste trabalho e estão sinalizadas na legenda. As demais sequências foram obtidas do banco de dados NCBI e PUBMLST. A denominação dos supergrupos A, B e F está sinalizada em torno da árvore. Círculos azuis representam as sequências de *wsp* da cepa *wAlbB* no supergrupo B e *wMel* no supergrupo A.

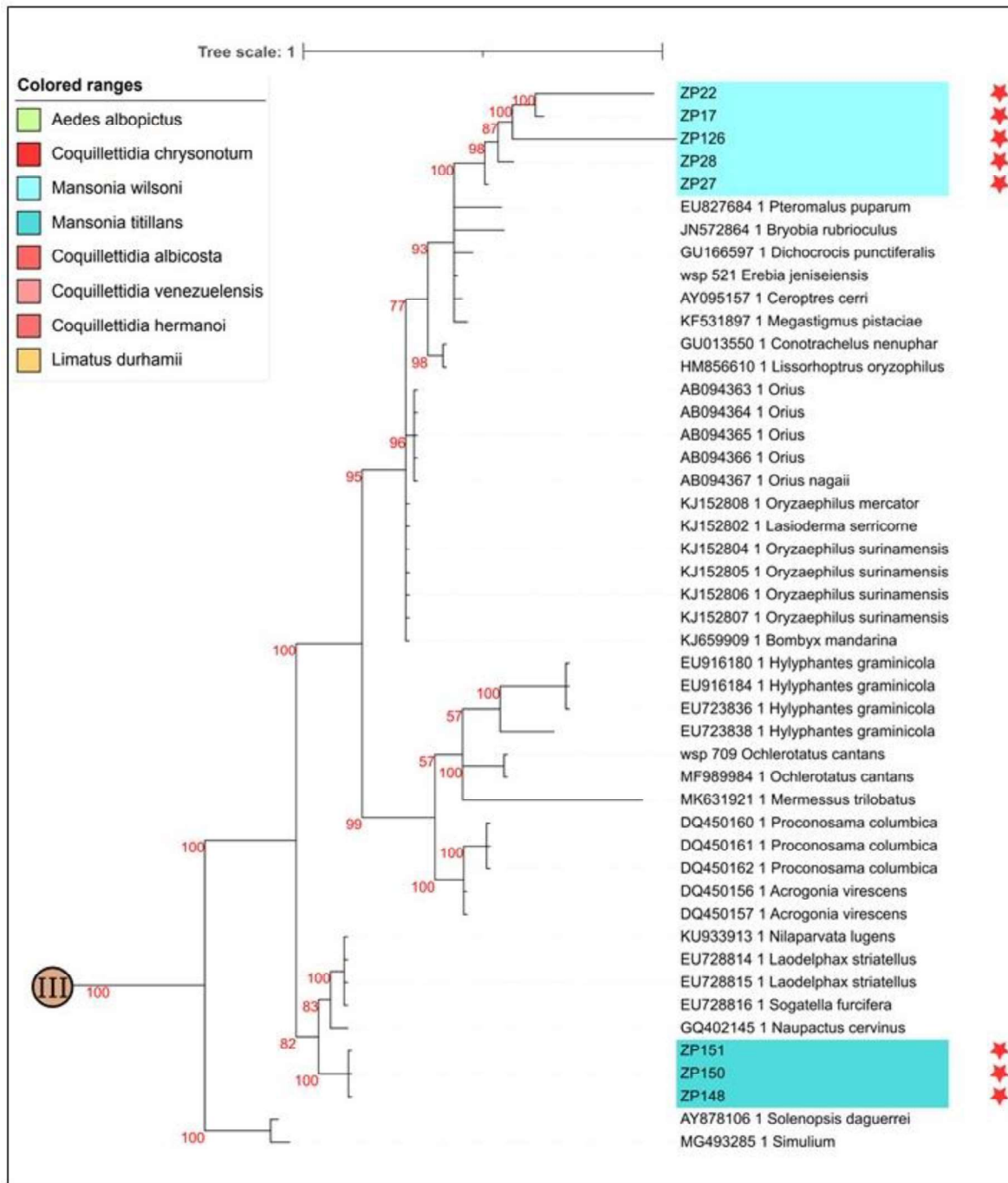
Figura 22 - Árvore filogenética com sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* em maior aumento destacando os ramos I e II



Fonte: A autora (2021)

Legenda: **I)** ramo com sequências provenientes de *Coquillettidia hermanoi* **II)** ramo com sequências provenientes de *Aedes albopictus*. Estrelas verdes representam espécimes coletados no JBR e estrelas vermelhas espécimes coletados no PEDI. **PEDI:** Parque Estadual Dois Irmãos; **JBR:** Jardim Botânico do Recife.

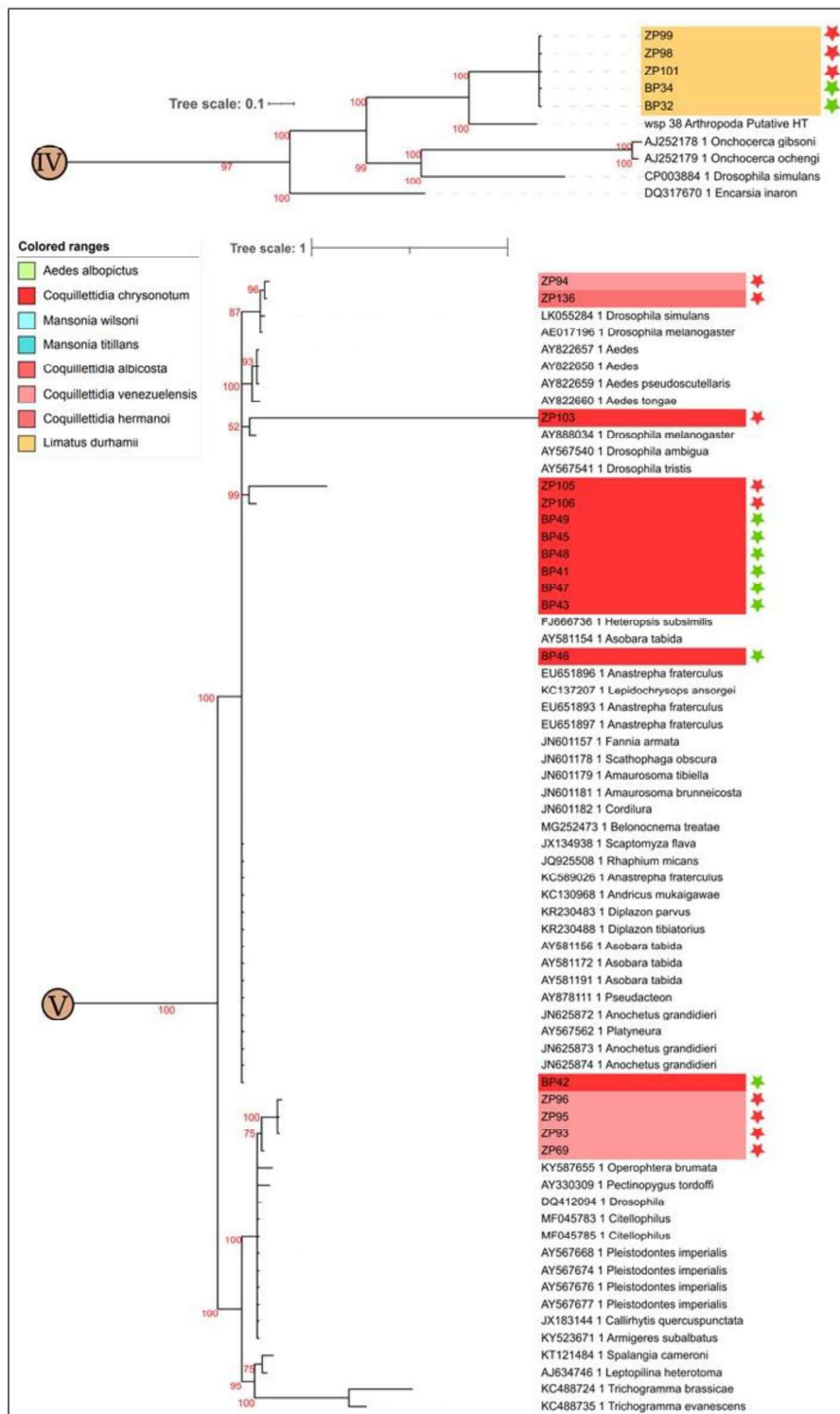
Figura 23 - Árvore filogenética com sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* em maior aumento destacando o ramo III



Fonte: A autora (2021)

Legenda: III) ramo com sequências provenientes de *Mansonia wilsoni* e *Mansonia titillans*. Estrelas vermelhas representam espécimes coletados no PEDI. **PEDI:** Parque Estadual Dois Irmãos.

Figura 24: Árvore filogenética com seqüências do gene *wsp* de *Wolbachia* em maior aumento destacando os ramos IV e V



Fonte: A autora (2021)

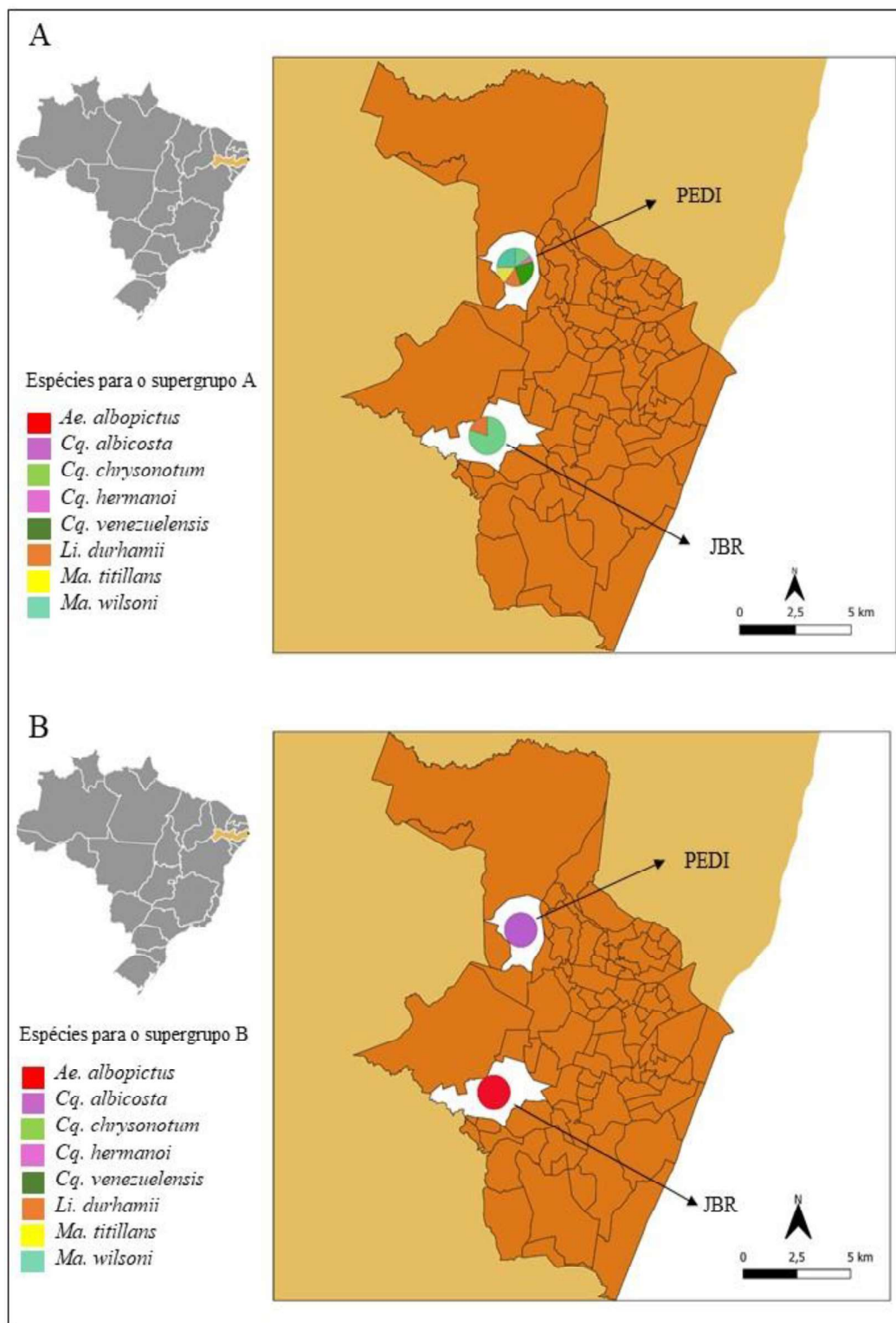
Legenda: **IV)** ramo com seqüências provenientes de *Limatus durhamii*. **V)** ramo com seqüências provenientes de *Coquillettidia chrysonotum*, *Coquillettidia venezuelensis* e *Coquillettidia albicosta*. Estrelas verdes representam espécimes coletados no JBR e estrelas vermelhas representam espécimes coletados no PEDI.

PEDI: Parque Estadual Dois Irmãos; **JBR:** Jardim Botânico do Recife.

Foi possível observar através da construção da árvore filogenética o agrupamento de diversas sequências de *Wolbachia* provenientes dos mosquitos coletados por esse trabalho com sequências de *Wolbachia* provenientes de outros insetos disponíveis nos bancos de dados. Das sequências pertencentes ao supergrupo B, as sequências de *Cq. albicosta* agruparam próximo a uma sequência de *Homalodisca elongata*, uma espécie de cigarra. No supergrupo A houve o agrupamento das sequências de *Ma. wilsoni*, com sequências das espécies *Pteromalus puparum* e *Bryobia rubrioculus*, espécies de vespa e cigarra, respectivamente. Uma das sequências provenientes de *Cq. chrysonotum* agrupou com a sequência da espécie de vespa, *Asobara tabida*, já para *Cq. venezuelensis* houve o agrupamento com a espécie *Operophtera brumata*, uma espécie de traça.

De acordo com as análises das sequências, foi possível observar diferentes padrões de distribuição dos supergrupos de *Wolbachia* de acordo com o local de coleta (**Figura 25**).

Figura 25 - Distribuição dos supergrupos de *Wolbachia* por local de coleta de acordo com análise filogenética das sequências



Fonte: A autora (2021)

Legenda: **A)** Distribuição do supergrupo A por espécie nos dois locais de coleta PEDI e JBR. **B)** Distribuição do supergrupo B por espécie nos dois locais de coleta PEDI e JBR. **PEDI:** Parque Estadual Dois Irmãos; **JBR:** Jardim Botânico do Recife.

A amplificação por PCR das regiões específicas por supergrupo (**Tabela 1**) não possuiu o mesmo padrão observado na árvore filogenética construída a partir das sequências de *wsp* (**Figura 21**). Como exemplo, amostras da espécie *Ae. albopictus* amplificaram para ambos os supergrupos, entretanto, na árvore filogenética apenas foi possível observar sequências que agruparam com o supergrupo B. O padrão de supergrupos resultante das duas metodologias aplicadas também foi divergente para outras espécies (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Comparação dos resultados das PCRs específicas para os supergrupos A e B com o resultado observado a partir do sequenciamento para o gene *wsp*

Espécie	PCR		SEQUENCIAMENTO		
	<i>wsp</i> +	grupo A (+)	grupo B (+)	grupo A	grupo B
<i>Aedes albopictus</i>	32	18	18	0	8
<i>Coquilettidia albicosta</i>	10	5	1	0	5
<i>Coquilettidia venezuelensis</i>	12	6	6	5	0
<i>Limatus durhamii</i>	12	5	6	5	0
<i>Mansonia wilsoni</i>	38	17	18	5	0
<i>Coquilettidia hermanoi</i>	13	1	0	1	0
<i>Mansonia titilans</i>	16	5	6	3	0
<i>Coquilettidia chrysonotum</i>	16	12	9	11	0

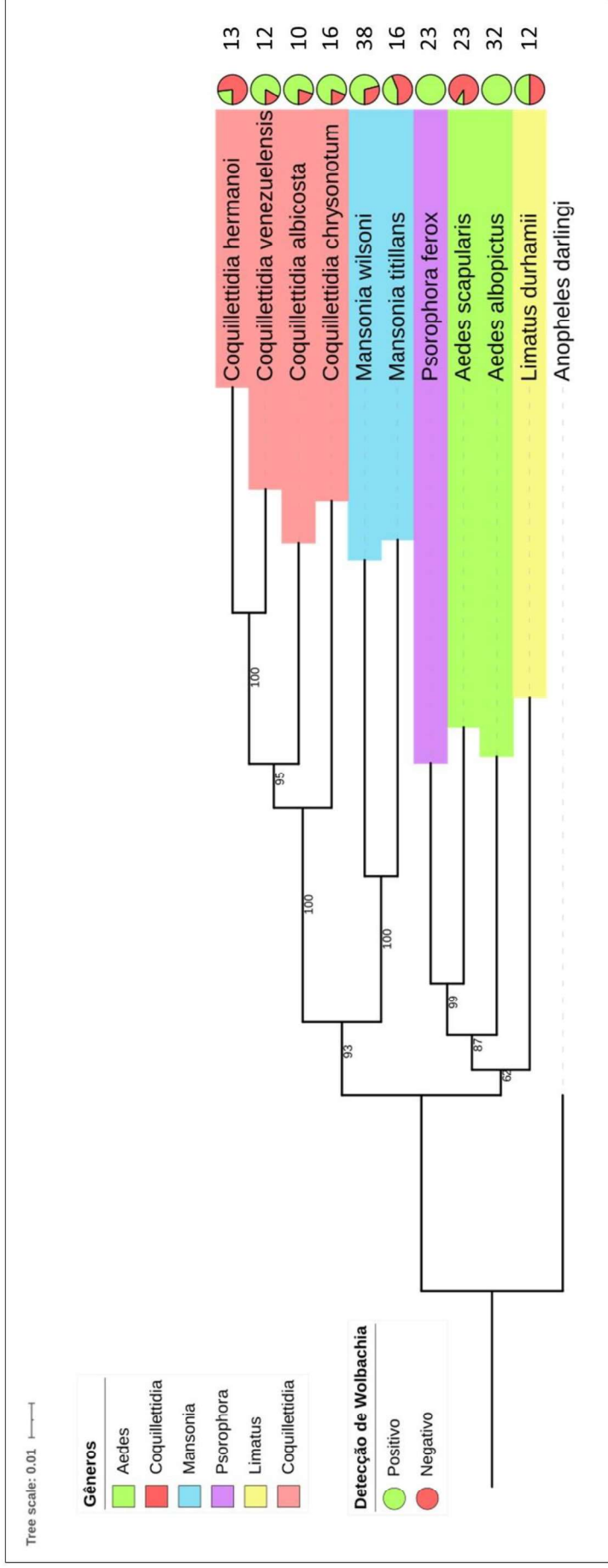
Fonte: A autora (2021)

Legenda: *wsp* +: amostras positivas para PCR do gene *wsp*; **grupo A (+)**: número de amostras positivas para PCR específica para o supergrupo A; **grupo B (+)**: número de amostras positivas para PCR específica para o supergrupo B; **grupo A**: sequências do gene *wsp* que agruparam com sequências de *Wolbachia* do supergrupo A; **grupo B**: sequências do gene *wsp* que agruparam com sequências de *Wolbachia* do supergrupo B.

9.3 Correlação entre *Wolbachia* e seus hospedeiros

Também foi possível construir a árvore filogenética a partir do genoma mitocondrial dos hospedeiros de *Wolbachia* e correlacionar com os dados de infecção, considerando a positividade para o gene *wsp*, para cada espécie (**Figura 26**).

Figura 26 - Árvore filogenética do genoma mitocondrial dos culicídeos positivos para *Wolbachia* e a respectiva proporção de positividade para o gene *wsp*



Fonte: A autora (2021)

Nota: Números ao lado da proporção de positividade representam o número de amostras analisadas. *Anopheles darlingi* foi utilizado como sequência externa na filogenia.

10 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a circulação e a diversidade de *Wolbachia* em mosquitos silvestres do município de Recife. Este trabalho identificou a presença de *Wolbachia* em todas as espécies de culicídeos silvestres coletadas e analisadas, que apresentaram diferentes taxas de infecção de acordo com a espécie e o local de coleta. De acordo com os dados da literatura, oito das dez espécies de culicídeos investigados por este trabalho não haviam sido investigados por *Wolbachia* até o momento (INÁCIO DA SILVA *et al.*, 2021). Desta maneira, este trabalho traz informações inéditas quanto a presença de *Wolbachia* em oito espécies de culicídeos.

Mosquitos da espécie *Ae. albopictus* são considerados de importância epidemiológica uma vez que podem ser vetores de vírus como CHIKV em regiões da África, e vetores secundários dos vírus DENV e ZIKV nas Américas (CHOUIN-CARNEIRO *et al.*, 2016; DELATTE *et al.*, 2008; GUBLER, 2013; PAGÈS *et al.*, 2009; VEGA-RÚA *et al.*, 2015). Devido a sua importância epidemiológica e ampla distribuição no globo, *Ae. albopictus* já foi avaliado quanto à presença de *Wolbachia* por diversos trabalhos realizados na Europa, Ásia, África, América do Sul e América do Norte (CHUCHUY *et al.*, 2018; RAVIKUMAR *et al.*, 2010; SHAIKEVICH; BOGACHEVA; GANUSHKINA, 2019; ZOUACHE *et al.*, 2011). Nestes trabalhos, a presença de *Wolbachia* variou entre 15% e 100%, nos quais as cepas *wAlbA* e *wAlbB* (pertencentes aos supergrupos A e B respectivamente) foram detectadas. O único trabalho realizado em Recife com objetivo de avaliar a presença de *Wolbachia* em culicídeos teve como alvo *Ae. albopictus* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011). O trabalho observou populações de *Ae. albopictus* amostradas em 2011 com taxa de infecção por *Wolbachia* de 91,61% e taxa de superinfecção pelos supergrupos A e B de 99,3% (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011). O presente trabalho observou uma taxa de infecção e superinfecção de 100% em *Ae. albopictus*, entretanto, foi avaliado um menor número de espécimes. Apesar da diferença temporal dos trabalhos, as taxas de infecção de superinfecção dos indivíduos foram similares, o que pode indicar que a prevalência e a diversidade de *Wolbachia* na espécie *Ae. albopictus* é estável na cidade do Recife. As populações de *Ae. albopictus* são naturalmente infectadas com cepas dos supergrupos A e B de *Wolbachia*, entretanto, a porcentagem da superinfecção varia entre populações (KITAYAPONG *et al.*, 2002). Kittayapong *et al.*, 2002 e Nugapola *et al.*, 2017 ao avaliarem populações de *Ae. albopictus* amostradas no Sri Lanka e Tailândia encontraram altas taxas similares às nossas de superinfecção: 99,41% e 99,4% (KITAYAPONG; BAIMAI; O'NEILL, 2002; NUGAPOLA *et al.*, 2017).

A espécie *Ma. titillans* está amplamente distribuída nas Américas, presente em climas tropicais e subtropicais, com presença relatada nos territórios entre o sul dos EUA e a Argentina (WALTER REED BIOSYSTEMATICS UNIT, 2021). A espécie foi coletada em ambiente silvestre no bioma de Mata Atlântica e até o momento não tinha sido descrita na cidade do Recife, sendo este, portanto, o primeiro relato de sua presença. Em relação à presença de *Wolbachia*, apenas um trabalho havia investigado a infecção nesta espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A taxa de infecção encontrada por Oliveira *et al.*, 2015 foi de 100%, entretanto, não houve descrição do supergrupo de *Wolbachia* presente na espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Neste trabalho, a taxa de infecção calculada foi menor que a relatada por Oliveira *et al.*, 2015, de 43,75%, entretanto, foi possível observar a presença dos supergrupos A e B da bactéria, com taxa de superinfecção de 83%.

Diferentes taxas de infecção por *Wolbachia* dentro de uma mesma espécie de culicídeo são observadas em diferentes trabalhos. Como exemplo, três trabalhos analisaram populações diferentes da espécie *Ma. uniformis* provenientes do Sri Lanka, Quênia e Madagascar quanto à presença de *Wolbachia*, em que foram observadas taxas de infecção de 100%, 26% e 29% respectivamente (JEFFRIES *et al.*, 2018; NUGAPOLA *et al.*, 2017; OSEI-POKU *et al.*, 2012). Além disso, nas populações do Sri Lanka foi observada infecção pela cepa *wPip* de *Wolbachia* enquanto que em Madagascar foi observada infecção pela cepa *wUnif-Mad*, ambas do supergrupo B (JEFFRIES *et al.*, 2018; NUGAPOLA *et al.*, 2017). Duas principais hipóteses podem explicar a diferença nas taxas de infecção dentro de uma mesma espécie: diferenças nas metodologias aplicadas para detecção de *Wolbachia* e fatores ecológicos. No caso exemplificado acima, entretanto, foram utilizadas metodologias semelhantes com amplificação do gene *wsp* por PCR convencional seguido de amplificação com *primers* específicos. O principal fator ecológico que pode interferir na prevalência de *Wolbachia* é a temperatura, no qual já foi possível observar que ondas de calor são capazes de reduzir a prevalência de *Wolbachia* dentro de uma população (ROSS *et al.*, 2020). Desta maneira, diferenças nas taxas de infecção por *Wolbachia* dentro de uma mesma espécie de culicídeo poderia ser justificada pelos diferentes climas e temperaturas dos locais de onde provêm.

Ao contrário de *Ma. titillans*, *Ma. wilsoni* não havia sido investigada até o momento quanto a presença de *Wolbachia*, e neste trabalho foi possível detectar a presença de 75% das amostras positivas para o gene *wsp*. Das amostras consideradas positivas, 62,9% foram positivas para o supergrupo A e 66,6% foram positivas para o supergrupo B, com taxa de superinfecção de 65%. Através do sequenciamento e análise do gene *wsp* todas foram classificadas como supergrupo A.

Dentre as espécies do gênero *Coquillettidia* analisadas por este trabalho, nenhuma delas havia sido avaliada quanto à presença de *Wolbachia* até o momento (INÁCIO DA SILVA *et al.*, 2021). *Cq. albicosta*, *Cq. venezuelensis* e *Cq. chrysonotum* apresentaram positividade para o gene *wsp* semelhante (80%, 83,3% e 81,25% respectivamente), enquanto *Cq. hermanoi* apresentou 23% de infecção por *Wolbachia* nas amostras analisadas. De acordo com a análise filogenética do fragmento *wsp*, apenas *Cq. albicosta* foi caracterizada como pertencente ao supergrupo B, todas as outras espécies agruparam na árvore filogenética com sequências do supergrupo A. Até o momento já foram descritas 102 espécies do gênero *Coquillettidia*, porém, há apenas o registro de duas espécies investigadas quanto à presença de *Wolbachia*. *Cq. venezuelensis* e *Cq. chrysonotum* são vetores potenciais de arbovirose, tendo sido encontradas naturalmente infectadas com esses agentes, inclusive com Oropouche no Brasil (*Cq. venezuelensis*) (HERVÉ *et al.*, 1986).

Ae. scapularis é uma espécie antropofílica amplamente distribuída nas Américas, e presente em todos os estados brasileiros (ROTRAUT; OLIVEIRA, 1994). Apresenta importância epidemiológica devido sua participação no ciclo da YFV recentemente no Brasil, e por ter sido incriminada no ciclo do Rocio (ABREU *et al.*, 2019; FORATTINI *et al.*, 1995; SOUZA LOPES *et al.*, 1978; VASCONCELOS *et al.*, 2001). Apesar de possuir importância epidemiológica, *Ae. scapularis* não havia sido avaliado quanto a presença de *Wolbachia* exceto neste trabalho.

Li. durhamii é a única espécie analisada pertencente à tribo Sabethini, e apesar de ser considerada uma espécie silvestre, é antropofílica e a mais adaptada do gênero a ambientes antrópicos (ROTRAUT; OLIVEIRA, 1994). No Brasil, espécimes de campo de *Li. durhamii* já foram identificadas infectadas com DENV-2 e ZIKV (BARRIO-NUEVO *et al.*, 2020). Este é o primeiro trabalho que avalia e descreve uma espécie do gênero *Limatus* quanto à presença de *Wolbachia*.

Ps. ferox está amplamente distribuída nas Américas, do norte da Argentina ao sul do Canadá e já foi relatada sua infecção com arbovírus causadores de encefalites, como Encefalite Venezuelana, no norte da América do Sul, incluindo a Amazônia brasileira, e Encefalite Saint Louis, em Trinidad e Rocio e no litoral de São Paulo (ROTRAUT; OLIVEIRA, 1994). Este é o primeiro relato da presença da espécie *Ps. ferox* na região Nordeste do Brasil, e a primeira investigação da espécie em relação à presença de *Wolbachia*.

De acordo com Sinkins (1995) superinfecção é o termo utilizado para designar a infecção por múltiplas cepas de *Wolbachia* em um mesmo inseto e sugere que o fenômeno seja relativamente comum (SINKINS; BRAIG; O'NEILL, 1995). Foi possível observar que das

nove espécies analisadas neste trabalho, seis delas apresentaram superinfecção para os supergrupos A e o supergrupo B, com o menor índice de 65% e o maior de 100%. Também já foi observada superinfecção em diversas outras espécies de culicídeos, como exemplo, análises de populações da espécie *Ma. uniformis* provenientes de Taiwan revelou superinfecção por duas cepas diferentes de *Wolbachia*, *wRiv* (supergrupo A) e *wCon* (supergrupo B) (TSAI *et al.*, 2004). Além disso, o mesmo trabalho também observou que 25% das espécies analisadas possuíam superinfecção por *Wolbachia* (TSAI *et al.*, 2004).

O gene *wsp* codifica uma proteína da membrana externa de *Wolbachia* que possui papel fundamental no processo de divisão celular de bactéria (BRAIG *et al.*, 1998). Por estar presente em todas as linhagens de *Wolbachia*, o gene *wsp* tem sido empregado por diversos trabalhos para a detecção da bactéria (SHAIKEVICH *et al.*, 2019). Além de detectar a presença de *Wolbachia*, o alto nível de variabilidade do gene *wsp* permite o desenho de *primers* específicos de PCR, que são capazes de distinguir diferentes supergrupos e cepas, como os utilizados neste trabalho (ZHOU; ROUSSET; O'NEIL, 1998). Cerca de 45% dos trabalhos realizaram amplificação do gene *wsp* como único método de detecção de *Wolbachia* (INÁCIO DA SILVA *et al.*, 2021).

Uma das desvantagens do emprego único da amplificação do gene *wsp* para detecção de *Wolbachia* é a ausência da certeza da presença de infecção pela bactéria (ROSS *et al.*, 2020). O gene *wsp* pode ser detectado em situações que não indicam uma infecção verdadeira de *Wolbachia*, como uma contaminação do ambiente externo, presença de fragmentos da bactéria no genoma dos hospedeiros e ainda detecção de *Wolbachia* proveniente de filárias presentes no culicídeo (CHROSTEK; GERTH, 2019). Para cada um dos cenários citados pode ser empregado um conjunto de técnicas complementares que permita obter resultados adicionais sobre o status da infecção. Para o caso de presença de *Wolbachia* integrando o genoma dos hospedeiros pode ser empregado uma ou mais PCRs adicionais com objetivo de amplificar outras regiões de *Wolbachia*, uma vez que a amplificação de várias regiões do genoma da bactéria indica provavelmente uma infecção verdadeira (KONDO *et al.*, 2002). Para a presença de filárias, pode ser realizado uma PCR adicional para vermes filariais em espécies que são consideradas vetoras (INÁCIO DA SILVA *et al.*, 2021).

A maioria das amostras analisadas neste trabalho não revelou concordância entre a classificação das linhagens através da PCR e a realizada através da análise filogenética do gene *wsp*. Apesar das amostras de *Ae. albopictus* apresentarem 100% de superinfecção para os supergrupos A e B através da técnica de PCR, a análise das sequências provenientes da amplificação do gene *wsp* identificou apenas a presença do supergrupo B. Um padrão

semelhante ocorreu para as espécies *Cq. venezuelensis*, *Cq. chrysonotum*, *Li. durhamii*, *Ma. wilsoni* e *Ma. titillans* cujas amostras apresentaram superinfecção pela técnica de PCR, entretanto através das análises filogenéticas só foi possível observar sequências pertencentes ao supergrupo A. Entretanto, um trabalho realizado em amostras de *Ae. albopictus* provenientes do Siri Lanka, apresentou um padrão semelhante, em que foi observada uma taxa de superinfecção de 100% através da amplificação de regiões do supergrupo A e do supergrupo B, e através da análise filogenética do gene *wsp* a maioria destas amostras agrupou no supergrupo A e outras no supergrupo B (NUGAPOLA *et al.*, 2017).

A ausência de um padrão entre o resultado da PCR e o resultado observado a partir do sequenciamento não indica que uma das duas abordagens esteja incorreta. Uma possibilidade é que a linhagem do gene *wsp* identificada através da análise filogenética seja aquela que estaria em maior título no mosquito e por isso teria sido mais amplificada na técnica de PCR e, portanto, a identificada pelo sequenciamento. A análise das amostras a partir das duas abordagens revelou a presença de *Wolbachia* do supergrupo A e B nos culicídeos analisados. Esse resultado é esperado uma vez que *Wolbachia* pertencentes a outros supergrupos não são encontrados em culicídeos (ROS *et al.*, 2009).

A partir da construção da árvore filogenética foi possível observar que algumas sequências provenientes de mosquitos coletados em locais distintos foram agrupadas, como exemplo, duas das amostras de *Cq. chrysonotum* coletadas no PEDI agruparam com 6 das sequências provenientes das amostras coletadas no JBR, enquanto as outras sequências ficaram localizadas no mesmo ramo, mas não ficaram próximas. Um padrão semelhante foi observado nas sequências do gene *wsp* provenientes das amostras de *Li. durhamii*, em que todas as amostras do PEDI e JBR ficaram agrupadas. Apesar de serem necessárias outras análises, pode-se sugerir que as linhagens e diversidade de *Wolbachia* nas espécies sejam estáveis em diferentes locais da cidade. ALBUQUERQUE *et al.*, 2011 também analisou a diversidade de *Wolbachia* presente em amostras de *Ae. albopictus* coletados em pontos distintos do Recife, e observou que não houve variação nas sequências de nucleotídeos do gene *wsp* entre indivíduos de uma mesma população ou entre diferentes populações (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011).

Deve-se destacar também o fato de que todas as sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* provenientes da espécie de *Cq. venezuelensis* agruparam no clado representado pelo número V, com exceção da sequência ZP94. Esta agrupou com a única sequência da espécie *Cq. hermanni* e distante de todas as outras da mesma espécie. A distância nucleotídica entre as sequências foi de 0,9976 e ambas foram coletadas no PEDI. A razão desta similaridade pode ter origem comportamental pelo fato das duas espécies terem origem no mesmo local, sendo

possível que o espécime de *Cq. venezuelensis* analisado tenha adquirido uma cepa de *Wolbachia* através da interação com nichos compartilhados com o espécime de *Cq. hermanoi* (CHROSTEK *et al.*, 2017; NILSSON *et al.*, 2018). Entretanto, o sequenciamento de outras regiões de *Wolbachia* deve ser realizado a fim de compreender melhor esse fenômeno.

Ao comparar a topologia da árvore filogenética construída com as sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* e a árvore filogenética construída a partir do genoma mitocondrial dos hospedeiros é possível observar a ausência de correlação entre elas. Este fenômeno foi descrito por outros trabalhos que realizaram análises do gene *wsp*, do conjunto MLST e comparações entre o genoma da bactéria e dos seus hospedeiros, e é o principal indício da ocorrência de transmissão horizontal (TH) de *Wolbachia* sendo observado variados eventos de troca de hospedeiros entre os artrópodes (AHMED; BREINHOLT; KAWAHARA, 2016; GERTH; BLEIDORN, 2016; RAYCHOUDHURY *et al.*, 2009; SANAEI; CHARLAT; ENGELSTÄDTER, 2020).

Além do fenômeno de TH poder ser observado através da comparação da topologia das árvores foi possível observar também a nível dos agrupamentos. A maioria das espécies de mosquitos agrupou com sequências de *wsp* provenientes de outros insetos como, formigas, cigarras, besouros, vespas e gafanhotos, com várias espécies relatadas no Brasil e todas presentes em ambientes silvestres. A distância nucleotídica observada entre essas sequências exclui a possibilidade de contaminação da amostra e indica uma provável transmissão horizontal entre esses indivíduos em algum momento de sua história evolutiva. Outras análises devem ser realizadas para compreender em que momento essa transmissão ocorreu e de que forma elas ocorrem na natureza.

Ao observar a árvore filogenética construída a partir do genoma mitocondrial das espécies analisadas não é possível observar correlações entre as taxas de infecção e os supergrupos de *Wolbachia* presentes nas espécies. Como exemplo podemos citar a diversidade de padrões no ramo que abriga as espécies do gênero *Coquillettidia*, apesar de três delas apresentarem taxas de infecção semelhantes, não apresentam os mesmos supergrupos identificados pelo sequenciamento. Um padrão inverso é observado no ramo do gênero *Mansonia*, em que as espécies abrigam *Wolbachia* do mesmo supergrupo mas apresentam taxa de infecção distinta (71% *Ma. wilsoni* e 43% em *Ma. titillans*). A ausência de um padrão pode ser resultado de uma amostragem desigual entre as espécies, causada por suas diferentes abundâncias no ambiente, ou por fatores ecológicos e evolutivos próprios da biologia de *Wolbachia*. Apesar de outros trabalhos relatarem tais diferenças, ainda não se sabe a razão pelas quais elas ocorrem, e análises futuras devem ser realizadas a fim de compreender de que

forma *Wolbachia* se dispersa, evolui e está presente no ambiente e nas espécies de culicídeos de variadas regiões.

A maioria das espécies avaliadas neste trabalho não havia sido avaliada quanto à presença de *Wolbachia* até o momento, e duas delas não haviam sido reportadas na cidade do Recife (*Ma. titillans* e *Ps. ferox*). É importante destacar que Recife apresenta alta incidência de casos confirmados de arboviroses, sendo considerado endêmico para DENV desde 1995, e tendo sido um dos epicentros da epidemia de Zika que ocorreu no Brasil nos anos de 2015 e 2016 (CORDEIRO *et al.*, 2007). Recife apresenta um nível de urbanização crescente, com recentes e constantes invasões de áreas silvestres. De acordo com ELLWANGER, *et al.*, 2020, o desflorestamento favorece a proliferação de vetores de doenças, como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* e estimula a saída de mosquitos do ambiente silvestre para o urbano (ELLWANGER *et al.*, 2020). Portanto, é imprescindível conhecer a diversidade de culicídeos presentes em ambientes silvestres da cidade do Recife uma vez que muitos são potenciais vetores de arbovírus. Além disso, o fato de Recife possuir altos índices de arboviroses, torna a cidade um possível alvo para aplicação de técnicas alternativas de controle de mosquito como por exemplo baseadas na liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia*, tornando o conhecimento da diversidade da bactéria no local de extrema importância.

11 CONCLUSÕES

- a) Neste trabalho foi possível observar a presença da bactéria *Wolbachia pipientis* em todas as espécies de culicídeos analisadas no município de Recife, com taxas de infecção entre 8% e 100%, em que até o momento, oito destas espécies não haviam sido avaliadas quanto a presença da bactéria.
- b) Foi observada a presença de linhagens de *Wolbachia* dos supergrupos A e B em mosquitos silvestres circulantes no município de Recife e a presença de superinfecção para esses supergrupos na maioria das espécies avaliadas.
- c) Através da filogenia foi possível observar um possível evento de transmissão horizontal de *Wolbachia* entre as espécies *Cq. venezuelensis* e *Cq. hermanoi* provenientes do mesmo local de coleta.
- d) A análise filogenética revelou o agrupamento de sequências de *Wolbachia* provenientes de mosquitos com sequências de diversas espécies de insetos, como formigas, vespas e carrapatos, sugerindo uma provável transmissão horizontal entre esses indivíduos em algum momento de sua história evolutiva.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. V. S. *et al.* Haemagogus leucocelaenus and Haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016–2018. **Emerging Microbes & Infections**, New York, v. 8, n. 1, p. 2018-231, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- AGÊNCIA PERNAMBUCANA DE ÁGUAS E CLIMAS. **Mapas de precipitação e outras informações**. Recife, 2021. Disponível em: <https://www.apac-homo.pe.gov.br/climatologia/519-climatologia>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- AHMAD, N. A. *et al.* Detection of Wolbachia in Aedes albopictus and Their Effects on Chikungunya Virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 96, n. 1, p. 148–156. 11 jan. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0516>. Acesso em: 20 fev. 2021.
- AHMED, M. Z.; BREINHOLT, J. W.; KAWAHARA, A. Y. Evidence for common horizontal transmission of Wolbachia among butterflies and moths. **BMC evolutionary biology**, London, v. 16, n. 1, p. 118. 27 May 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12862-016-0660-x>. Acesso em: 20 fev. 2021.
- ALBUQUERQUE, A. L. *et al.* High prevalence and lack of diversity of Wolbachia pipientis in Aedes albopictus populations from Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762011000600021>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- ALIOTA, M. T. *et al.* The wMel strain of Wolbachia Reduces Transmission of Zika virus by Aedes aegypti. **Scientific reports**, San Francisco, 1 jul. 2016. v. 6, p. 28792. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep28792>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- AMUZU, H. E. *et al.* Wolbachia enhances insect-specific flavivirus infection in Aedes aegypti mosquitoes. **Ecology and evolution**, Oxford, jun. 2018. v. 8, n. 11, p. 5441–5454. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.4066>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- ATYAME, C. M. *et al.* Diversification of Wolbachia endosymbiont in the Culex pipiens mosquito. **Molecular biology and evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2761–2772. out. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr083>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- AUGUSTINOS, A. A. *et al.* Detection and characterization of Wolbachia infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? **PloS one**, San Francisco, 13 dez. 2011. v. 6, n. 12, p. 28695. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028695>. Acesso em: 23 jan. 2021.
- AYRES, C. F. J. *et al.* Genetic differentiation of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v 40, p. 430-435, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.430>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- BALAJI, S.; JAYACHANDRAN, S.; PRABAGARAN, S. R. Evidence for the natural occurrence of Wolbachia in Aedes aegypti mosquitoes. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 366, n. 6, 1 mar. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnz055>. Acesso em: 27 jan. 2021.

- BALDINI, F. *et al.* Evidence of natural Wolbachia infections in field populations of *Anopheles gambiae*. **Nature Communications**, New York, v. 5, p. 3985, 06 Jun 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4985>. Acesso em : 25 jan. 2021.
- BALDINI *et al.* First report of natural Wolbachia infection in the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in Tanzania. **Parasites & Vectors**, London, v. 11, n. 1, p. 635, 13 Dec. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-3249-y>. Acesso em: 10 feb. 2021.
- BALDO, L.; BORDENSTEIN, S.; *et al.* Widespread recombination throughout Wolbachia genomes. **Molecular biology and evolution**, Washington, fev. 2006. v. 23, n. 2, p. 437–449. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msj049>. Acesso em: 14 feb. 2021.
- BALDO *et al.* Multilocus sequence typing system for the endosymbiont Wolbachia pipientis. **Applied and environmental microbiology**, Chicago, nov. 2006. v. 72, n. 11, p. 7098–7110. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00731-06>. Acesso em: 17 jan 2021.
- BALDO; LO, N.; WERREN, J. H. Mosaic nature of the wolbachia surface protein. **Journal of bacteriology**, Washington, ago. 2005. v. 187, n. 15, p. 5406–5418. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.15.5406-5418.2005>. Acesso em: 14 jan. 2021.
- BARRIO-NUEVO, K. M. *et al.* Detection of Zika and dengue viruses in wild-caught mosquitoes collected during field surveillance in an environmental protection area in São Paulo, Brazil. **PLOS ONE**, San Francisco, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0227239>. Acesso em: 22 feb. 2021.
- BECKMANN, J. F.; RONAU, J. A.; HOCHSTRASSER, M. A Wolbachia deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. **Nature microbiology**, London, 1 mar. 2017. v. 2, p. 17007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.7>. Acesso em: 01 mar. 2021.
- BENNETT, K. L. *et al.* Dynamics and diversity of bacteria associated with the disease vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Scientific reports**, New York, 21 ago. 2019. v. 9, n. 1, p. 12160. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-48414-8>. Acesso em 22 feb. 2021.
- BIAN, G. *et al.* The endosymbiotic bacterium Wolbachia induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. **PLoS pathogens**, San Francisco, 1 abr. 2010. v. 6, n. 4, p. e1000833. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- BIAN, G. *et al.* Replacing a native Wolbachia with a novel strain results in an increase in endosymbiont load and resistance to dengue virus in a mosquito vector. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 6 jun. 2013. v. 7, n. 6, p. e2250. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002250>. Acesso em: 12 jan. 2021.
- BLAGROVE, M. S. C. *et al.* Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, 3 jan. 2012. v. 109, n. 1, p. 255–260. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1112021108>. Acesso em: 11 jan. 2021.
- BLAGROVE *et al.* A Wolbachia wMel Transinfection in *Aedes albopictus* Is Not Detrimental to Host Fitness and Inhibits Chikungunya Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 2013. Disponível

em:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002152>. Acesso em: 10 feb. 2021.

BONNEAU *et al.* The cellular phenotype of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* in the light of *cidB* diversity. **PLoS Pathogens**, San Francisco, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007364>. Acesso em: 15 feb. 2021.

BOORMAN, J. P. T.; PORTERFIELD, J. S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses transmission of zika virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 238-242. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(56\)90029-3](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(56)90029-3). Acesso em: 10 feb. 2021.

BORDENSTEIN, S. R.; WERNEGREEN, J. J. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. **Molecular biology and evolution**, Chicago, out. 2004. v. 21, n. 10, p. 1981–1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msh211>. Acesso em: 5 feb. 2021.

BRAIG, H. R. *et al.* Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Journal of bacteriology**, Washington, May. 1998. v. 180, n. 9, p. 2373–2378. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.180.9.2373-2378.1998>. Acesso em: 06 jan. 2021.

BROWN, A. N.; LLOYD, V. K. Evidence for horizontal transfer of *Wolbachia* by a *Drosophila* mite. **Experimental & applied acarology**, Amsterdam, jul. 2015. v. 66, n. 3, p. 301–311. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-015-9918-z>. Acesso em. 7 feb. 2021.

CALVITTI, M. *et al.* Characterization of a New *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)–*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Symbiotic Association Generated by Artificial Transfer of the wPip Strain From *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, mar. 2010, v. 47, n. 2, p. 179-187. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1603/me09140>. Acesso em: 11 feb. 2021.

CARAGATA, E. P.; DUTRA, H. L. C.; MOREIRA, L. A. Exploiting Intimate Relationships: Controlling Mosquito-Transmitted Disease with *Wolbachia*. **Trends in parasitology**, Oxford, mar. 2016. v. 32, n. 3, p. 207–218. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.10.011>. Acesso em: 16 feb. 2021.

CARVAJAL, T. M. *et al.* Detection and distribution of *Wolbachia* endobacteria in *Culex quinquefasciatus* populations (Diptera : Culicidae) from Metropolitan Manila, Philippines. **Journal of vector borne diseases**, Delhi, out. 2018. v. 55, n. 4, p. 265–270. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4103/0972-9062.256561>. Acesso em: 16 feb. 2021.

CARVAJAL *et al.* Detection of *Wolbachia* in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes in metropolitan Manila, Philippines. **Parasites & vectors**, London, 24 jul. 2019. v. 12, n. 1, p. 361. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3629-y>. Acesso em: 20 feb. 2021.

CASIRAGHI, M. *et al.* Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. **Microbiology**, London, dez. 2005. v. 151, n. 12, p. 4015–4022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28313-0>. Acesso em: 10 feb. 2021.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in

phylogenetic analysis. **Molecular biology and evolution**, Chicago, abr. 2000. v. 17, n. 4, p. 540–552. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>. Acesso em: 10 fev. 2021.

CHEN, H.; ZHANG, M.; HOCHSTRASSER, M. The Biochemistry of Cytoplasmic Incompatibility Caused by Endosymbiotic Bacteria. **Genes**, Basel, 25 jul. 2020. v. 11, n. 8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/genes11080852>. Acesso em: 10 fev. 2021.

CHOUIN-CARNEIRO, T. *et al.* Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, mar. 2016. v. 10, n. 3, p. e0004543. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004543>. Acesso em: 17 jan. 2021.

CHROSTEK, E. *et al.* Horizontal Transmission of Intracellular Insect Symbionts via Plants. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, 28 nov. 2017. v. 8, p. 2237. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02237>. Acesso em: 07 jan. 2021.

CHROSTEK; GERTH, M. Is *Anopheles gambiae* a Natural Host of *Wolbachia*? **mBio**, Washington, 11 jun. 2019. v. 10, n. 3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00784-19>. Acesso em: 11 fev. 2021.

CHUCHUY, A. *et al.* Biological characterization of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Argentina: implications for arbovirus transmission. **Scientific reports**, London, 22 mar. 2018. v. 8, n. 1, p. 5041. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23401-7>. Acesso em: 09 jan. 2021.

CICCARELLI, F. D. *et al.* Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. **Science**, New York, 3 mar. 2006. v. 311, n. 5765, p. 1283–1287. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1123061>. Acesso em: 11 fev. 2021.

CLARK, M. *Wolbachia* Symbiosis in Arthropods. **Issues in Infect Disease**, [S.l.]: [s.n.], 2007, p. 90–123.

CODONCODE. **CodonCode Aligner 9.0.2**. 2021. Disponível em: <https://www.codoncode.com/aligner/download.htm>. Acesso em: 01 abr. 2021.

COON, K. L.; BROWN, M. R.; STRAND, M. R. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. **Molecular Ecology**, Oxford, nov. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/mec.13877>. Acesso em: 09 fev. 2021.

CORDEIRO, M. T. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, nov. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822007000600001>. Acesso em: 15 fev. 2021.

COULIBALY, Y. I. *et al.* A randomized trial of doxycycline for *Mansonella perstans* infection. **The New England journal of medicine**, Boston, 8 out. 2009. v. 361, n. 15, p. 1448–1458. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0900863>. Acesso em: 16 fev. 2021.

DELATTE, H. *et al.* *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. **Parasite**, Paris, mar. 2008. v. 15, n. 1, p. 3–13. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2008151003>. Acesso em: 10 fev, 2021.

DIMOPOULOS, G. Combining Sterile and Incompatible Insect Techniques for *Aedes albopictus* Suppression. **Trends in Parasitology**, Oxford, sep. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2019.07.006>. Acesso em: 20 fev. 2021.

DODSON, B. L. *et al.* Wolbachia enhances West Nile virus (WNV) infection in the mosquito *Culex tarsalis*. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, jul. 2014. v. 8, n. 7, p. e2965. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002965>. Acesso em: 25 fev. 2021.

DUNNING HOTOPP, J. C. *et al.* Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. **Science**, New York, 21 set. 2007. v. 317, n. 5845, p. 1753–1756. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1142490>. Acesso em: 10 fev. 2021.

DUNNING HOTOPP, J. C. Horizontal gene transfer between bacteria and animals. **Trends in genetics**, Amsterdam, 1 abr. 2011. v. 27, n. 4, p. 157–163. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952511000163>. Acesso em: 12 fev. 2021.

DUTRA, H. L. C. *et al.* Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell host & microbe**, Cambridge, 8 jun. 2016. v. 19, n. 6, p. 771–774. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.021>. Acesso em: 10 fev. 2021.

DYER, K. A.; JAENIKE, J. Evolutionarily stable infection by a male-killing endosymbiont in *Drosophila innubila*: molecular evidence from the host and parasite genomes. **Genetics**, Austin, nov. 2004. v. 168, n. 3, p. 1443–1455. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.104.027854>. Acesso em: 09 fev. 2021.

ELLWANGER, J. H. *et al.* Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio De Janeiro, 17 abr. 2020. v. 92, n. 1, p. e20191375. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765202020191375>. Acesso em: 25 jan. 2021.

FERGUSON, N. M. *et al.* Modeling the impact on virus transmission of Wolbachia-mediated blocking of dengue virus infection of *Aedes aegypti*. **Science translational medicine**, Washington, 18 mar. 2015. v. 7, n. 279, p. 279–237. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3010370>. Acesso em 15 fev. 2021.

FIALHO, R. F.; STEVENS, L. Male-killing Wolbachia in a flour beetle. **Proceedings. Biological sciences**, London, 22 jul. 2000. v. 267, n. 1451, p. 1469–1473. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2000.1166>. Acesso em: 15 fev. 2021.

FLORES, H. A.; O'NEILL, S. L. Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. **Nature reviews. Microbiology**, London, ago. 2018. v. 16, n. 8, p. 508–518. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0025-0>. Acesso em: 20 jan. 2021.

FORATTINI, O. P. *et al.* Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment: 9- Synanthropy and epidemiological vector role of *Aedes scapularis* in South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, Sao Paulo, jun. 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-89101995000300007>. Acesso em: 12 fev. 2021.

- FORATTINI, O. P. Culicidologia médica: identificação, biologia. *In*: FORATTINI, O. P. **Epidemiologia**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 2002. v. 2, p. 864 -870.
- FOSTER, J. *et al.* The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. **PLoS biology**, San Francisco, abr. 2005. v. 3, n. 4, p. e121. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0030121>. Acesso em: 15 fev. 2021.
- FRENTIU, F. D. *et al.* Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with Wolbachia. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, fev. 2014. v. 8, n. 2, p. e2688. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002688>. Acesso em: 17 fev. 2021.
- FRY, A. J.; PALMER, M. R.; RAND, D. M. Variable fitness effects of Wolbachia infection in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, London, out. 2004. v. 93, n. 4, p. 379–389. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800514>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- GAVOTTE, L. *et al.* A Survey of the bacteriophage WO in the endosymbiotic bacteria Wolbachia. **Molecular biology and evolution**, Chicago, fev. 2007. v. 24, n. 2, p. 427–435. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msl171>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- GERTH, M. *et al.* Phylogenomic analyses uncover origin and spread of the Wolbachia pandemic. **Nature communications**, London, 6 out. 2014. v. 5, p. 5117. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6117>. Acesso em: 11 jan. 2021.
- GERTH; BLEIDORN, C. Comparative genomics provides a timeframe for Wolbachia evolution and exposes a recent biotin synthesis operon transfer. **Nature microbiology**, London, 22 dez. 2016. v. 2, p. 16241. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.241>. Acesso em: 17 fev. 2021.
- GILL, A. C.; DARBY, A. C.; MAKEPEACE, B. L. Iron necessity: the secret of Wolbachia's success? **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, out. 2014. v. 8, n. 10, p. 3224–3240. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003224>. Acesso em: 03 fev. 2021.
- GLASER, R. L.; MEOLA, M. A. The native Wolbachia endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. **PLoS one**, San Francisco, 5 ago. 2010. v. 5, n. 8, p. e11977. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011977>. Acesso em: 05 fev. 2021.
- GLOWSKA, E. *et al.* New Wolbachia supergroups detected in quill mites (Acari: Symbiontida). **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, mar. 2015. v. 30, p. 140–146. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.019>. Acesso em: 18 fev. 2021.
- GOINDIN, D. *et al.* Screening of natural Wolbachia infection in *Aedes aegypti*, *Aedes taeniorhynchus* and *Culex quinquefasciatus* from Guadeloupe (French West Indies). **Acta Tropica**, Amsterdam, sep. 2018. v. 185, p. 314–317. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.06.011>. Acesso em: 17 fev. 2021.
- PERNAMBUCO. Governo do Estado. **O Parque**. Recife, 2021. Disponível em: <http://www.portaisgoverno.pe.gov.br/web/parque-dois-irmaos/sobre-o-parque>. Acesso em: 22 fev. 2021.

GUBLER, D. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical medicine and health**, Nagasaki, Dec. 2011. v. 39, p. 3-11. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1289/isee.2013.o-3-31-02>. Acesso em: 20 fev. 2021.

GUINDON, S. *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, Washington, maio. 2010. v. 59, n. 3, p. 307–321. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syq010>. Acesso em: 10 jan 2021.

HANSEN, R. D. E. *et al.* A worm's best friend: recruitment of neutrophils by Wolbachia confounds eosinophil degranulation against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*. **Proceedings. Biological sciences**, London, 7 ago. 2011. v. 278, n. 1716, p. 2293–2302. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2010.2367>. Acesso em: 15 fev. 2021.

HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). **Systematic entomology**, Oxford, out. 1998. v. 23, n. 4, p. 327–370. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3113.1998.00072.x>. Acesso em: 15 jan. 2021.

HARBACH, R.E. **Mosquito Taxonomic Inventory**. 2013. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>. Acesso em: 10 mar. 2021.

HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement**, Fresno, dez. 1988. v. 1, p. 1–39. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3068349>. Acesso em: 12 fev. 2021.

HEATH, B. D. *et al.* Horizontal transfer of Wolbachia between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. **Current biology: CB**, London, 25 mar. 1999. v. 9, n. 6, p. 313–316. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80139-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80139-0). Acesso em 13 fev. 2021.

HEGDE, S. *et al.* Microbiome Interaction Networks and Community Structure From Laboratory-Reared and Field-Collected *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquito Vectors. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, 10 sep. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02160>. Acesso em: 10 fev. 2021.

Hervé JP, Dégallier N, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Sá Filho GC. Arboviroses - Aspectos ecológicos. *In*: MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instituto Evandro Chagas-50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. v.1.

HERTIG, M. The Rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp.n.) and Associated Inclusions of the Mosquito, *Culex pipiens*. **Parasitology**, London, out. 1936. v. 28, n. 4, p. 453–486. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/rickettsia-wolbachia-pipientis-gen-et-spn-and-associated-inclusions-of-the-mosquito-culex-pipiens/012BC9AFF69BB9EBA3CE3C0263273809>. Acesso em: 3 abr. 2021.

HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. **The Journal of medical research**, Boston, mar. 1924. v. 44, n. 3, p. 329–374.7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19972605>. Acesso em: 08 fev. 2021.

HILGENBOECKER, K. *et al.* How many species are infected with Wolbachia? a statistical analysis of current data. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, 1 Apr. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x>. Acesso em 20 fev. 2021.

HOFFMANN, A. A. *et al.* Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. **Nature**, London, 1 ago. 2011. v. 476, n. 7361, p. 454–457. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature10356>. Acesso em 21 jan. 2021.

HOSOKAWA, T. *et al.* Wolbachia as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, 12 jan. 2010. v. 107, n. 2, p. 769–774. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0911476107>. Acesso em: 22 jan. 2021.

HU, Y. *et al.* Correction to: Identification and molecular characterization of Wolbachia strains in natural populations of Aedes albopictus in China. **Parasites & Vectors**, London, 14 Jan. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-020-3917-6>. Acesso em: 18 jan. 2021.

HUGHES, G. L. *et al.* Wolbachia strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite Plasmodium berghei in Anopheles gambiae mosquitoes. **Applied and environmental microbiology**, Washington, mar. 2012. v. 78, n. 5, p. 1491–1495. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06751-11>. Acesso em: 19 fev. 2021.

HUGHES; RIVERO, A.; RASGON, J. L. Wolbachia can enhance Plasmodium infection in mosquitoes: implications for malaria control? **PLoS pathogens**, San Francisco, set. 2014. v. 10, n. 9, p. e1004182. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004182>. Acesso em: 21 jan. 2021.

HURK, A. F. VAN DEN *et al.* Impact of Wolbachia on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector Aedes aegypti. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 1 nov. 2012. v. 6, n. 11, p. e1892. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001892>. Acesso em: 22 fev. 2021.

HURST, G. D. D. *et al.* Male-killing Wolbachia in two species of insect. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, London, 7 abr. 1999. v. 266, n. 1420, p. 735–740. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0698>. Acesso em 17 jan. 2021.

HUSSAIN, M. *et al.* Effect of Wolbachia on replication of West Nile virus in a mosquito cell line and adult mosquitoes. **Journal of virology**, Baltimore, jan. 2013. v. 87, n. 2, p. 851–858. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01837-12>. Acesso em: 21 jan. 2021.

INÁCIO DA SILVA, L. M. *et al.* Systematic Review of Wolbachia Symbiont Detection in Mosquitoes: An Entangled Topic about Methodological Power and True Symbiosis. **Pathogens**, San Francisco, 6 jan. 2021. v. 10, n. 1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10010039>. Acesso em: 11 fev. 2021.

ISHMAEL, N. *et al.* Extensive genomic diversity of closely related Wolbachia strains. **Microbiology**, London, jul. 2009. v. 155, n. Pt 7, p. 2211–2222. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.027581-0>. Acesso em: 12 jan. 2021.

JARDIM BOTÂNICO DO RECIFE. Apresentação. 2021. Disponível em: <http://jardimbotanico.recife.pe.gov.br/pt-br/apresentacao-1>. Acesso em 22 fev. 2021.

JEFFRIES, C. L. *et al.* Diverse novel resident Wolbachia strains in Culicine mosquitoes from Madagascar. **Scientific reports**, London, 29 nov. 2018. v. 8, n. 1, p. 17456. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-35658-z>. Acesso em: 14 fev. 2021.

JEFFRIES *et al.* Novel Wolbachia strains in Anopheles malaria vectors from Sub-Saharan Africa. **Wellcome Open Research, London**, 27 Nov. 2018. v. 3. p. 113-118. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/338434>. Acesso em 02 Feb. 2021.

JEFFRIES; WALKER, T. The Potential Use of Wolbachia-Based Mosquito Biocontrol Strategies for Japanese Encephalitis. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 18 jun. 2015. v. 9, n. 6, p. e0003576. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003576>. Acesso em 04 feb. 2021.

JEFFRIES; WALKER. Wolbachia Biocontrol Strategies for Arboviral Diseases and the Potential Influence of Resident Wolbachia Strains in Mosquitoes. **Current Tropical Medicine Reports**, Cham, 2 Feb. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s40475-016-0066-2>. Acesso em: 17 Jan. 2021.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. **Insect molecular biology**, Oxford, 9 Ago. 2000. v. 9, n. 4, p. 393–405. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00203.x>. Acesso em: 17 jan. 2021.

JOANNE, S. *et al.* Distribution and dynamics of Wolbachia infection in Malaysian Aedes albopictus. **Acta tropica**, Basel, 18 ago. 2015. v. 148, p. 38–45. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.003>. Acesso em 17 jan. 2021.

JOHNSON, K. The Impact of Wolbachia on Virus Infection in Mosquitoes. **Viruses**, Basel, 4 Nov. 2015. v.7, n. 11, p. 5705-5717. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/v7112903>. Acesso em: 14 feb. 2021.

KAGEYAMA, D. *et al.* Feminizing Wolbachia in an insect, Ostrinia furnacalis (Lepidoptera: Crambidae). **Heredity**, London, jun. 2002. v. 88, n. 6, p. 444–449. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800077>. Acesso em 20 jan. 2021.

KARAMI, M. *et al.* Wolbachia Endobacteria in Natural Populations of Culex pipiens of Iran and Its Phylogenetic Congruence. **Journal of arthropod-borne diseases**, Tehran, 6 Jan. 2016. v. 10, n. 3, p. 347–363. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27308293>. Acesso em: 27 jan. 2021.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in bioinformatics**, London, 19 jul. 2019. v. 20, n. 4, p. 1160–1166. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbx108>. Acesso em: 17 jan. 2021.

KAUR, R. *et al.* Living in the Endosymbiotic World of Wolbachia: A Centennial Review. 2021. **Cell host and microbe**, Cambridge, 9 Jun. 2021. v.29, n. 6, p. 879-893. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.006>. Acesso em: 15 jan. 2021.

FOSTER *et al.* The Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *In*: KENNEDY, M. W., HARNETT, W. **Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology**. Glasgow: CABI, 2013. V. 2

KENT, B. N.; BORDENSTEIN, S. R. Phage WO of Wolbachia: lambda of the endosymbiont world. **Trends in microbiology**, Cambridge, abr. 2010. v. 18, n. 4, p. 173–181. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.011>. Acesso em: 20 jan. 2021.

KITRAYAPONG, P.; BAIMAI, V.; O'NEILL, S. L. Field prevalence of Wolbachia in the mosquito vector *Aedes albopictus*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, jan. 2002. v. 66, n. 1, p. 108–111. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.108>. Acesso em: 13 feb. 2021.

KITTAYAPONG, P. *et al.* Distribution and diversity of Wolbachia infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, Honolulu, May 2000. v. 37, n. 3, p. 340–345. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/37.3.340>. Acesso em: 17 feb. 2021.

KITTAYAPONG, P. *et al.* Maternal transmission efficiency of Wolbachia superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, Jan. 2002. V. 66, n. 1, p. 103-107. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.103>. Acesso em 14 feb. 2021.

KITTAYAPONG *et al.* Combined sterile insect technique and incompatible insect technique: The first proof-of-concept to suppress *Aedes aegypti* vector populations in semi-rural settings in Thailand. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 28 Out. 2019. v. 13, n. 10, p. e0007771. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007771>. Acesso em: 18 feb. 2021.

KONDO, N. *et al.* Genome fragment of Wolbachia endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, 29 out. 2002. v. 99, n. 22, p. 14280–14285. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.222228199>. Acesso em 22 jan. 2021.

KREMER, N. *et al.* Wolbachia interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. **PLoS pathogens**, San Francisco, 5 Out. 2009. v. 5, n. 10, p. e1000630. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000630>. Acesso em: 24 jan. 2021.

KULKARNI, A. *et al.* Wolbachia pipientis occurs in *Aedes aegypti* populations in New Mexico and Florida, USA. **Ecology and evolution**, Oxford, May 2019. v. 9, n. 10, p. 6148–6156. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.5198>. Acesso em 2 feb. 2021.

LANDMANN, F. *et al.* Both asymmetric mitotic segregation and cell-to-cell invasion are required for stable germline transmission of Wolbachia in filarial nematodes. **Biology Open**, Cambridge, 15 Jun. 2012. v. 1, n. 6, p. 536-547. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/bio.2012737>. Acesso em 15 feb. 2021.

LANDMANN, F. The Wolbachia Endosymbionts. **Microbiology spectrum**, Washington, 7 Mar. 2019. v. 7, n. 2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0018-2019>. Acesso emm: 18 jan. 2021.

LAVEN, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through Cytoplasmic Incompatibility. **Nature**, London, 1 out. 1967. v. 216, n. 5113, p. 383–384. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/216383a0>. Acesso em 16 feb. 2021.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J.-E.; GASCUEL, O. SMS: Smart Model Selection in PhyML. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, 1 Sep. 2017. V. 34, n. 9, p. 2422-2424. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msx149>. Acesso em: 19 jan. 2021.

LEPAGE, D. P. *et al.* Prophage WO genes recapitulate and enhance Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. **Nature**, London, 9 mar. 2017. v. 543, n. 7644, p. 243–247.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature21391>. Acesso em: 19 feb. 2021.

LI, M. I. *et al.* Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 28 ago. 2012. v. 6, n. 8, p. e1792. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001792>. Acesso em: 25 jan. 2021.

LI, S.-J. *et al.* Plant mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. **The ISME journal**, London, abr. 2017. v. 11, n. 4, p. 1019–1028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2016.164>. Acesso em: 24 feb. 2021.

LU, P. *et al.* *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 24 jul. 2012. v. 6, n. 7, p. e1754. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001754>. Acesso em: 20 jan. 2021.

MASUI, S. *et al.* Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. **Journal of molecular evolution**, Berlin, nov. 2000. v. 51, n. 5, p. 491–497. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s002390010112>. Acesso em: 02 feb. 2021.

MCMENIMAN, C. J. *et al.* Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, New York, 2 jan. 2009. v. 323, n. 5910, p. 141–144. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1165326>. Acesso em 7 jan. 2021.

MICIELI, M. V.; GLASER, R. L. Somatic *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) levels in *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) and resistance to West Nile virus infection. **Journal of medical entomology**, Honolulu, jan. 2014. v. 51, n. 1, p. 189–199. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1603/me13152>. Acesso em: 14 jan. 2021.

MIN, K. T.; BENZER, S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, 30 set. 1997. v. 94, n. 20, p. 10792–10796. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.20.10792>. Acesso em: 17 jan. 2021.

MORÇIÇEK, B. *et al.* Evidence of natural *Wolbachia* infections and molecular identification of field populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) mosquitoes in western Turkey. **Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology**, Santa Ana, jun. 2018. v. 43, n. 1, p. 44–51. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/jvec.12281>. Acesso em: 15 feb. 2021.

MOREIRA, L. A. *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, Cambridge, 24 dez. 2009. v. 139, n. 7, p. 1268–1278. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>. Acesso em: 28 jan. 2021.

MORETTI, R. *et al.* Cytoplasmic incompatibility management to support Incompatible Insect Technique against *Aedes albopictus*. **Parasites & vectors**, London, 24 dez. 2018. v. 11, n. Suppl 2, p. 649. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-018-3208-7>. Acesso em: 14 feb. 2021.

MOUSSON, L. *et al.* *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. **Molecular ecology**, Oxford, May 2010. v. 19, n. 9, p. 1953–1964. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04606.x>. Acesso em 16 jan. 2021.

- MOUSSON, L. *et al.* The native Wolbachia symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, 27 dez. 2012. v. 6, n. 12, p. e1989. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001989>. Acesso em: 19 feb. 2021.
- MURDOCK, C. C. *et al.* Temperature alters Plasmodium blocking by Wolbachia. **Scientific reports**, London, 3 fev. 2014. v. 4, p. 3932. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep03932>. Acesso em 5 feb. 2021.
- NCBI. **Genome**. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=WOLBACHIA>. Acesso em: 13 abr. 2021.
- NGUYEN, T. H. *et al.* Field evaluation of the establishment potential of wMelPop Wolbachia in Australia and Vietnam for dengue control. **Parasites & vectors**, London, 28 out. 2015. v. 8, p. 563. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1174-x>. Acesso em; 18 feb. 2021.
- NIANG, E. H. A. *et al.* First report of natural Wolbachia infection in wild Anopheles funestus population in Senegal. **Malaria Journal**, London, 6 Nov. 2018. V. 17, n. 1, p. 408-415. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-018-2559-z>. Acesso em 17 feb. 2021.
- NILSSON, L. K. J. *et al.* Presence of Aedes and Anopheles mosquito larvae is correlated to bacteria found in domestic water-storage containers. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, 1 Jun. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiy058>. Acesso em 19 jan. 2021.
- NOTREDAME, C. Faculty Opinions recommendation of SMS: smart model selection in phylm. **Faculty Opinions**, London, 2017. V. 16, n. 1, p. 546-550. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3410/f.727583139.793531838>. Acesso em: 18 jan. 2021.
- NUGAPOLA, N. W. N. P. *et al.* Distribution and phylogeny of Wolbachia strains in wild mosquito populations in Sri Lanka. **Parasites & Vectors**, London, 10 May 2017. v. 10, p. 230-245. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2174-9>. Acesso em: 15 feb. 2021.
- OLIVEIRA, C. D. DE *et al.* Broader prevalence of Wolbachia in insects including potential human disease vectors. **Bulletin of entomological research**, London, jun. 2015. v. 105, n. 3, p. 305–315. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485315000085>. Acesso em: 16 feb. 2021.
- O'NEILL, S. L. *et al.* Scaled deployment of Wolbachia to protect the community from Aedes transmitted arboviruses. **Gates open research, Seattle**, 13 Aug. 2019. v. 2, n. 36. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.12688/gatesopenres.12844.3>. Acesso em: 14 feb. 2021.
- OSEI-POKU, J. *et al.* Identification of Wolbachia strains in mosquito disease vectors. **PloS one**, San Francisco, 21 nov. 2012. v. 7, n. 11, p. e49922. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049922>. Acesso em: 17 feb. 2021.
- PAIVA, M. H. S. *et al.* An unsettling explanation for the failure of skatole-baited ovitraps to capture Culex mosquitoes. **Insect science**, Victoria, out. 2019. v. 26, n. 5, p. 873–880. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12578>. Acesso em 16 jan. 2021.
- PAGÈS, F. *et al.* Aedes albopictus mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya

outbreak in Gabon. **PloS one**, San Francisco, 4 mar. 2009. v. 4, n. 3, p. e4691. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004691>. Acesso em: 12 feb. 2021.

PEREIRA, T. N. *et al.* Wolbachia significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for Mayaro virus. **Scientific reports**, London, 2 May 2018. v. 8, n. 1, p. 6889. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-25236-8>. Acesso em 15 feb. 2021.

PLICHART, C.; LEGRAND, A. M. Detection and characterization of Wolbachia infections in *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) var. *pacifica* and *Aedes* (*Stegomyia*) *polynesiensis* (Diptera **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, Aug. 2005. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2005.73.354>. Acesso em 16 jan. 2021.

POINSOT, D.; CHARLAT, S.; MERÇOT, H. On the mechanism of Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, Cambridge, mar. 2003. v. 25, n. 3, p. 259–265. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/bies.10234>. Acesso em: 26 jan. 2021.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2013. v. 108 Suppl 1, p. 11–17. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130395>. Acesso em: 20 jan. 2021.

RAVIKUMAR, H. *et al.* A preliminary survey for Wolbachia and bacteriophage WO infections in Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Tropical biomedicine**, Kuala Lumpur, dez. 2010. v. 27, n. 3, p. 384–393. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21399578>. Acesso em: 7 jan. 2021.

RAYCHOUDHURY, R. *et al.* Modes of acquisition of Wolbachia: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. **Evolution; international journal of organic evolution**, Lancaster, jan. 2009. v. 63, n. 1, p. 165–183. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00533.x>. Acesso em: 10 feb. 2021.

RICCI, I. *et al.* Searching for Wolbachia (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae): large polymerase chain reaction survey and new identifications. **Journal of medical entomology**, Honolulu, jul. 2002. v. 39, n. 4, p. 562–567. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-39.4.562>. Acesso em: 25 jan. 2021.

ROCHA, M. N. *et al.* Pluripotency of Wolbachia against Arboviruses: the case of yellow fever. **Gates open research**, Seattle, 16 abr. 2019. v. 3, p. 161. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.12688/gatesopenres.12903.2>. Acesso em: 5 feb. 2021.

RONQUIST, F. *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, Washington, May. 2012. v. 61, n. 3, p. 539–542. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029>. Acesso em 07 jan. 2021.

ROSS, P. A.; AXFORD, J. K.; *et al.* Heatwaves cause fluctuations in wMel Wolbachia densities and frequencies in *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 23 Jan. 2020. v. 14, n. 1. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007958>. Acesso em: 15 feb. 2021.

- ROSS *et al.* An elusive endosymbiont: Does Wolbachia occur naturally in *Aedes aegypti*? **Ecology and evolution**, Oxford, fev. 2020. v. 10, n. 3, p. 1581–1591. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/ece3.6012>. Acesso em: 2 fev. 2021.
- ROS, V. I. D. *et al.* How diverse is the genus Wolbachia? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new Wolbachia supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). **Applied and environmental microbiology**, New York, fev. 2009. v. 75, n. 4, p. 1036–1043. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01109-08>. Acesso em: 29 jan. 2021.
- ROTRAUT A G; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. v. 1.
- ROUSSET, F.; STORDEUR, E. Properties of *Drosophila simulans* strains experimentally infected by different clones of the bacterium Wolbachia. **Heredity**, Edinburgh, abr. 1994. v. 72 (Pt 4), p. 325–331. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1994.48>. Acesso em: 27 fev. 2021.
- SANAEI, E.; CHARLAT, S.; ENGELSTÄDTER, J. Wolbachia host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, 30 out. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/brv.12663>. Acesso em: 28 jan. 2021.
- SARWAR, M. S.; SHAHBAZ, F.; JAHAN, N. Molecular Detection and Characterization of Wolbachia pipientis from *Culex quinquefasciatus* Collected from Lahore, Pakistan. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.17-0329>. Acesso em: 7 jan. 2021.
- PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde do Estado, 2019. Disponível em: https://12ad4c92-89c74218e110ee136fa4b92.filesusr.com/ugd/3293a8_367c8b02797a421d855aa9403e1b9a24.pdf. Acesso em: 16 jan. 2021.
- SHAIKEVICH, E. *et al.* Wolbachia symbionts in mosquitoes: Intra- and intersuper group recombinations, horizontal transmission and evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 134, p. 24-34, May. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2019.01.020>. Acesso em: 19 fev. 2021.
- SHAIKEVICH; BOGACHEVA, A.; GANUSHKINA, L. Dirofilaria and Wolbachia in mosquitoes (Diptera: Culicidae) in central European Russia and on the Black Sea coast. **Parasite**, Paris, 15 jan. 2019. v. 26, p. 2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2019002>. Acesso em: 15 fev. 2021.
- SHAW, W. R. *et al.* Wolbachia infections in natural Anopheles populations affect egg laying and negatively correlate with Plasmodium development. **Nature communications**, London, 31 May. 2016. v. 7, p. 11772. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11772>. Acesso em: 18 fev. 2021.
- SICARD, M.; BONNEAU, M.; WEILL, M. Wolbachia prevalence, diversity, and ability to induce cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. **Current opinion in insect science**, Amsterdam, ago. 2019. v. 34, p. 12–20. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2019.02.005>. Acesso em: 6 jan. 2021.
- SINHA, A. *et al.* Complete Genome Sequence of the Wolbachia wAlbB Endosymbiont of *Aedes albopictus*. **Genome biology and evolution**, London, 1 mar. 2019. v. 11, n. 3, p. 706–

720. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evz025>. Acesso em: 17 jan. 2021.

SINKINS, S. P.; BRAIG, H. R.; O'NEILL, S. L. Wolbachia superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, London, 22 set. 1995. v. 261, n. 1362, p. 325–330. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1995.0154>. Acesso em: 18 fev. 2021.

SLATKO, B. E. *et al.* Wolbachia endosymbionts and human disease control. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, jul. 2014. v. 195, n. 2, p. 88–95. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.07.004>. Acesso em: 9 jan. 2021.

SONI, M. *et al.* Molecular typing and phylogeny of Wolbachia: A study from Assam, North-Eastern part of India. **Acta tropica**, Basel, dez. 2017. v. 176, p. 421–426. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.005>. Acesso em: 3 fev. 2021.

SOUZA LOPES, O. DE *et al.* Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. **American journal of epidemiology**, Baltimore, May 1978. v. 107, n. 5, p. 444–449. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112563>. Acesso em: 15 fev. 2021.

STOUTHAMER, R.; KAZMER, D. J. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. **Heredity**, Edinburgh set. 1994. v. 73, n. 3, p. 317–327. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/hdy1994139>. Acesso em: 12 abr. 2021.

SUNISH, I. P. *et al.* Wolbachia endobacteria in a natural population of *Culex quinquefasciatus* from filariasis endemic villages of south India and its phylogenetic implication. **Tropical biomedicine**, Kuala Lumpur, dez. 2011. v. 28, n. 3, p. 569–576. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22433886>. Acesso em: 18 jan. 2021.

SUN, L. V. *et al.* Determination of Wolbachia genome size by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of bacteriology**, Washington, abr. 2001. v. 183, n. 7, p. 2219–2225. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.7.2219-2225.2001>. Acesso em: 17 jan. 2021.

TAYLOR, M. J. *et al.* Preclinical development of an oral anti-Wolbachia macrolide drug for the treatment of lymphatic filariasis and onchocerciasis. **Science translational medicine**, Washington, 13 mar. 2019. v. 11, n. 483. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aau2086>. Acesso em: 8 jan. 2021.

TEIXEIRA, L.; FERREIRA, A.; ASHBURNER, M. The bacterial symbiont Wolbachia induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. **PLoS biology**, San Francisco, 23 dez. 2008. v. 6, n. 12, p. e2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002>. Acesso em: 30 jan. 2021.

TEO, C. H. J. *et al.* Detection of dengue viruses and Wolbachia in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae from four urban localities in Kuala Lumpur, Malaysia. **Tropical biomedicine**, Kuala Lumpur, 1 set. 2017. v. 34, n. 3, p. 583–597. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33592927>. Acesso em: 3 mar. 2021.

THONGSRIPONG, P. *et al.* Mosquito vector-associated microbiota: Metabarcoding bacteria and eukaryotic symbionts across habitat types in Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. **Ecology and evolution**, Oxford, 27 dec. 2018. v. 8, n. 2, p. 1352–

1368. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ece3.3676>. Acesso em: 30 jan. 2021.

TRAM, U.; SULLIVAN, W. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. **Science**, New York, 10 May 2002. v. 296, p. 1124-1126. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1070536>. Acesso em: 20 feb. 2021.

TSAI, K.-H. *et al.* Molecular (sub) grouping of endosymbiont Wolbachia infection among mosquitoes of Taiwan. **Journal of medical entomology**, Honolulu, jul. 2004. v. 41, n. 4, p. 677–683. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.677>. Acesso em: 10 jan. 2021.

VANDEKERCKHOVE, T.; WATTEYNE, S.; BONNE, W. Evolutionary trends in feminization and intersexuality in woodlice (Crustacea, Isopoda) infected with Wolbachia pipientis (alpha-Proteobacteria). **Belgian journal of Zoology**, Belgium, 2003. v. 133, n.1, p. 61-69. Disponível em: <https://biblio.ugent.be/publication/363667/file/575023>. Acesso em: 26 jan. 2021.

VASCONCELOS, P. F. *et al.* Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. **Journal of medical virology**, New York, nov. 2001. v. 65, n. 3, p. 598–604. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11596099>. Acesso em: 19 jan. 2021.

VEGA-RÚA, A. *et al.* Chikungunya Virus Replication in Salivary Glands of the Mosquito *Aedes albopictus*. **Viruses**, Basel, 17 nov. 2015. v. 7, n. 11, p. 5902–5907. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/v7112917>. Acesso em: 6 feb. 2021.

WALKER, T. *et al.* The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, London, 24 ago. 2011. v. 476, n. 7361, p. 450–453. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10355>. Acesso em: 24 jan. 2021.

WALKER, T. Wolbachia Bacteria and Biocontrol of Arboviral Diseases. **Outlooks on Pest Management**, Essex, 2015. v. 26, n. 4, p. 166–170. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/resinf/opm/2015/00000026/00000004/art00007>. Acesso em: 12 jan. 2021.

WALTER REED BIOSYSTEMATICS UNIT. **Mansonia titillans species page**. 2021. Disponível em: <http://wrbu.si.edu/vectorspecies/mosquitoes/titillans>. Acesso em: 15 fev. 2021.

WANG, G.-H. *et al.* Discovery of a new Wolbachia supergroup in cave spider species and the lateral transfer of phage WO among distant hosts. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, jul. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.015>. Acesso em: 29 fev. 2021.

WANG, Z. *et al.* Widespread infection and diverse infection patterns of Wolbachia in Chinese aphids. **Insect science**, Victoria, jun. 2014. v. 21, n. 3, p. 313–325. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1744-7917.12102>. Acesso em: 26 jan. 2021.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. E. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. **Nature reviews. Microbiology**, London, out. 2008. v. 6, n. 10, p. 741–751. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1969>. Acesso em: 19 fev. 2021.

- WERREN; WINDSOR, D.; GUO, L. R. Distribution of Wolbachia among neotropical arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, London, 22 nov. 1995. v. 262, n. 1364, p. 197–204. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0196>. Acesso em: 18 fev. 2021.
- WERREN, J. H.; WINDSOR, D. M. Wolbachia infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, London, 7 jul. 2000. v. 267, n. 1450, p. 1277–1285. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2000.1139>. Acesso em: 26 fev. 2021.
- WIWATANARATANABUTR, I. Geographic distribution of wolbachial infections in mosquitoes from Thailand. **Journal of invertebrate pathology**, New York, nov. 2013. v. 114, n. 3, p. 337–340. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.04.011>. Acesso em: 23 jan. 2021.
- WOOLFIT, M. *et al.* Genomic evolution of the pathogenic Wolbachia strain, wMelPop. **Genome Biol Evol**, Oxford, 2013. v. 5, n. 11, p. 2189–2204. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/gbe/evt169>. Acesso em: 25 fev. 2021.
- WORLD MOSQUITO PROGRAM. **Sobre o método Wolbachia**. 2021a. Disponível em: <https://www.worldmosquitoprogram.org/brasil/sobre-o-metodo-wolbachia>. Acesso em 05 fev. 2021.
- WORLD MOSQUITO PROGRAM. **Randomised Controlled Trial**. 2021b. Disponível em: <https://www.worldmosquitoprogram.org/en/randomised-control-trial-rct>. Acesso em 14 mar. 2021.
- ZEH, D. W.; ZEH, J. A.; BONILLA, M. M. Wolbachia, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. **Heredity**, Edinburgh, jul. 2005. v. 95, n. 1, p. 41–49. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800666>. Acesso em: 22 fev. 2021.
- ZÉLÉ, F. *et al.* Infection with Wolbachia protects mosquitoes against Plasmodium-induced mortality in a natural system. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, jul. 2012. V.25, n. 7, p. 1243–1252. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02519.x>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- ZÉLÉ *et al.* Wolbachia increases susceptibility to Plasmodium infection in a natural system. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, London, 22 mar. 2014. v. 281, n. 1779, p. 20132837. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.2837>. Acesso em: 24 jan. 2021.
- ZHENG, X. *et al.* Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. **Nature**, New York, ago. 2019. v. 572, n. 7767, p. 56–61. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1407-9>. Acesso em: 26 jan. 2021.
- ZHOU, W.; ROUSSET, F.; O'NEIL, S. Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, London, 22 mar. 1998. v. 265, n. 1395, p. 509–515. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>. Acesso 23 de fev. 2021.
- ZOUACHE, K. *et al.* Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. **FEMS Microbiology**

Ecology, Amsterdam, Mar. 2011. v. 75, n. 3, p. 377-389. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x>. Acesso em: 6 jan. 2021.

ZUG, R.; KOEHNCKE, A.; HAMMERSTEIN, P. Epidemiology in evolutionary time: the case of *Wolbachia* horizontal transmission between arthropod host species. **Journal of evolutionary biology**, Basel, nov. 2012. v. 25, n. 11, p. 2149–2160. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02601.x>. Acesso em 31 jan. 2021.

Apêndice: Matriz de distância nucleotídica calculada para as sequências utilizadas para construção da árvore filogenética.

Link para acesso: <https://figshare.com/s/e67c2c3dc43860a6d60e>

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO ICMBIO PARA REALIZAÇÃO DE COLETA DE CULICÍDEOS



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58716-4	Data da Emissão: 19/12/2019 14:47:53	Data da Revalidação*: 01/06/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gabriel da Luz Wallau	CPF: 014.171.980-01
Título do Projeto: Sequenciamento de genomas mitocondriais de mosquitos, potencialmente vetores, provenientes de áreas silvestres de Pernambuco	
Nome da Instituição: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Identificação molecular e sequenciamento do genoma mitocondrial	01/2018	12/2021
2	Coletas mensais em cada local de coleta	01/2018	12/2021

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Laís Ceschini Machado	Coleta e processamento de amostra	030.853.810-23	Brasileira
2	Alexandre Freitas da Silva	Coleta e processamento de amostra	029.916.940-50	Brasileira
3	Filipe Zimmer Dezordi	Coleta e processamento de material	033.918.690-97	Brasileira
4	Luísa Maria Inácio da Silva	Coleta e processamento de amostra	112.470.824-31	Brasileira

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

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

Código de autenticação: 0587160420191219

Página 1/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58716-4	Data da Emissão: 19/12/2019 14:47:53	Data da Revalidação*: 01/06/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gabriel da Luz Wallau	CPF: 014.171.980-01
Título do Projeto: Sequenciamento de genomas mitocondriais de mosquitos, potencialmente vetores, provenientes de áreas silvestres de Pernambuco	
Nome da Instituição: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-JF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Zoológico e Jardim Botânico Dois Irmãos	Recife-PE	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Vila de Aldeia	Camaragibe-PE	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
3	Jardim Botânico do Recife	Recife-PE	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Atividades ex-situ (fora da natureza)
3	Acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado	Culicidae	-
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Culicidae	-
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Culicidae	1000

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Método de captura/coleta (Insetos)	Captura manual, Rede entomológica, Armadilha luminosa, Outros métodos de captura/coleta(Armadilha de SucÃ§Ã£o)

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

Código de autenticação: 0587160420191219

Página 2/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 58716-4	Data da Emissão: 19/12/2019 14:47:53	Data da Revalidação*: 01/06/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Gabriel da Luz Wallau	CPF: 014.171.980-01
Título do Projeto: Sequenciamento de genomas mitocondriais de mosquitos, potencialmente vetores, provenientes de áreas silvestres de Pernambuco	
Nome da Instituição: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	CNPJ: 33.781.055/0007-20

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	Outro

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

Código de autenticação: 0587160420191219

Página 3/4

