

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DETECÇÃO DE *Wolbachia* EM MOSQUITOS  
(DIPTERA: CULICIDAE) NO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

ERICK BARROS CHAVES

SÃO LUÍS, MA

2021

ERICK BARROS CHAVES

**DETECCÃO DE *Wolbachia* EM MOSQUITOS  
(DIPTERA: CULICIDAE) NO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito necessário para a obtenção do título de mestre em ciências da saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Manuel Macário Rebêlo

SÃO LUÍS, MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Barros Chaves, Erick.  
DETECÇÃO DE Wolbachia EM MOSQUITOS DIPTERA: CULICIDAE  
NO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL / Erick Barros Chaves. - 2021.  
57 f.

Orientador(a): José Manuel Macário Rebêlo.  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da  
Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

1. Infecção Natural. 2. Maranhão. 3. Mosquitos. 4. Wolbachia.  
I. Manuel Macário Rebêlo, José. II. Título.

**DETECÇÃO DE *Wolbachia* EM MOSQUITOS  
(DIPTERA: CULICIDAE) NO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito necessário para a obtenção do título de mestre em ciências da saúde.

Aprovado em : 01/07/2021

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. José Manuel Macário Rebelo (Orientador)  
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

---

Prof. Dr. Francinaldo Soares Silva (Memória)  
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

---

Prof. Dr. Ciro Libio Caldas dos Santos (Titular)  
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

---

Profa. Dra. Valéria Cristina Soares Pinheiro (Externo)  
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Confia no SENHOR de todo o teu coração  
e não estribes no teu próprio entendimento.

Provérbio 3:5.

Dedico

À Deus.

À meus familiares.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado. À toda a minha família, em especial a minha mãe Maria Luiza Barros Chaves e meu pai José Domingos Chaves, por estarem sempre ao meu lado e me incentivarem e proporcionarem as condições para que eu obtivesse êxito. À minha irmã Aliciana Costa, ao meu sobrinho Thiago Costa e minha avó Maria da Gloria dos Anjos de Tia Maria de Jesus dos Anjos. Obrigado por me apoiarem.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Manuel Macário Rebelo, pela oportunidade, confiança, paciência, por todos os ensinamentos. Sou grato não somente pela orientação, mas também por sua amizade. À toda equipe do Laboratório de Entomologia Vetores – LEV pelo apoio e companheirismo, em especial a Thiago Bezerra, Bruno Leite, Mariza Bandeira e Agostinho Pereira.

Muito obrigado ao Prof. Dr. Luis Fernando Costa por ter me ajudado em muitos procedimentos laboratoriais, no Laboratório de Genética e Biologia Molecular-Labgem e ao meu coorientador Prof. Dr Marcelo de Souza de Andrade que foi essencial na escrita e revisão da dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão – FAPEMA, pelo apoio com o financeiro para realização desta pesquisa CAPES/FAPEMA.

Aos todos amigos e colegas que não lembrei de citar, mas que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho, em especial, aos amigos da turma 2019 do mestrado em ciências da saúde, sou grato pela empatia, pelo apoio e companheirismo.

Obrigado por tudo!

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
2.1 Um breve histórico sobre a <i>Wolbachia</i> .....	15
2.2. Classificação.....	16
2.3 <i>Wolbachia</i> e a endossimbiose em Nematoides e Artrópodes .....	17
2.4 Os fenótipos induzíveis por <i>Wolbachia</i> .....	18
2.5 <i>Wolbachia</i> e mosquitos (Diptera: Culicidae).....	22
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 Geral .....	29
3.2 Específicos.....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1. Descrição da área de estudo.....	30
4.2. Coleta e identificação dos Mosquitos .....	31
4.3. Extração do DNA dos mosquitos .....	32
4.4 Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) para Detecção de <i>Wolbachia</i> .....	33
4.6 Análise de dados .....	34
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>16S rDNA</b>	Gene da subunidade 16S do RNA ribossomal
<b>C-</b>	Controle negativo
<b>C+</b>	Controle positivo
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
<b><i>dnaA</i></b>	Gene da proteína envolvida na replicação cromossomal de <i>Wolbachia</i>
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>F</b>	Forward (senso)
<b><i>ftsZ</i></b>	Gene da proteína FTSZ de divisão celular
<b>IC</b>	Incompatibilidade citoplasmática
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mm</b>	milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Número de indivíduos
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>PM</b>	Marcador de massa molecular
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b><i>wAlbA</i></b>	Linhagem de <i>Wolbachia</i> do supergrupo A com o hospedeiro <i>Aedes albopictus</i> como referência
<b><i>wAlbB</i></b>	Linhagem de <i>Wolbachia</i> do supergrupo B com o hospedeiro <i>Aedes albopictus</i> como referência
<b><i>wMel</i></b>	Linhagem de <i>Wolbachia</i> com o hospedeiro <i>Drosophila melanogaster</i> como referência
<b><i>wMelPop</i></b>	Linhagem popcorn de <i>Wolbachia</i> com o hospedeiro <i>Drosophila melanogaster</i> como referência
<b><i>wPip</i></b>	Linhagem de <i>Wolbachia</i> com o hospedeiro <i>Culex pipiens</i> como referência
<b><i>Wsp</i></b>	Proteína de superfície de <i>Wolbachia</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fenótipos induzidos por <i>Wolbachia</i> nas diferentes ordens de insetos conhecidas ...	19
Figura 2- Fêmea e macho de mosquitos da espécie <i>Aedes aegypti</i> .....	23
Figura 3- Mapa do Estado do Maranhão com a localização geográfica das áreas de coleta....	30
Figura 4- Armadilhas utilizadas durante a coleta dos mosquitos. A- armadilha CDC- HP.B- Ovitrapas com eucatex. C- Barraca de Shannon. D- Sapucais.....	31
Figura 5-Gel (A e B) de agarose 1% para verificação de extração do DNA genômico. Amplificação do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) de mosquitos.....	33
Figura 6-Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene Wsp nas diferentes espécies de mosquitos. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Promega); 1 – <i>An. (Nys.)</i> ; 2 – <i>Cx. quinquefasciatus</i> ; 3 – <i>Ae. scapularis</i> ; 4 – <i>Cx. (Mel.) spp</i> ; 5 – <i>Cq. juxtamansonia</i> ; 6 – <i>Cq. venezuelensis</i> ; 7 – Controle positivo ( <i>Ae. albopictus</i> ); C- – Controle negativo.....	37
Figura 7- Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene Wsp Super Grupo A. Legenda: M – marcador de peso molecular (100pb, Promega); C+ Controle positivo ( <i>Ae. albopictus</i> ); Controle negativo; 1-17: Amostras positivas de mosquitos (Diptera:Culicidae) infectados por <i>Wolbachia</i> .....	37
Figura 8- Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene Wsp Super Grupo B. Legenda: M – marcador de peso molecular (100 pb, Promega); C- Controle negativo; C+ Controle positivo ( <i>Ae. albopictus</i> ); An1-An2: <i>An. (Nys.) spp</i> . Cx.1– Cx.2: <i>Cx. quinquefasciatus</i> ; Alb 1: <i>Ae. albopictus</i> .....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Componentes da reação de PCR.....	31
Tabela 2- Número de espécies, gêneros e subgêneros de mosquitos infectados por <i>Wolbachia</i> no Estado do Maranhão, Brasil.....	32
Tabela 3- Espécies, municípios, taxa de infecção e supergrupos de <i>Wolbachia</i> detectados em mosquitos (Culicidae) no Estado do Maranhão, Brasil.....	35
Tabela 4- Supergrupos e taxas de infecções de <i>Wolbachia</i> para os mosquitos dos gêneros de Culicidae no Estado do Maranhão, Brasil.....	36

## RESUMO

Estima-se que cerca 66% de todas as espécies, de artrópodes conhecidas, estejam infectadas com *Wolbachia*. Esse endossimbionte vem sendo amplamente estudado devido a sua alta diversidade natural e principalmente graças a sua capacidade de reduzir a infecção por patógenos que causam doenças como Dengue, Zika, Chikungunya, Febre Amarela e Malária, transmitidas por mosquitos. Apesar disso, há poucas informações sobre a dispersão da *Wolbachia* em ambientes naturais no Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de infecção natural por *Wolbachia* em diferentes espécies de culicídeos em áreas representativas do Estado do Maranhão. Os mosquitos foram coletados com armadilhas CDC-HP, ovitrampas, sapucaias e barraca de Shannon nos municípios de São Luís, São José de Ribamar, Chapadinha, Vitória do Mearim, Godofredo Viana e Pastos Bons. O DNA dos insetos foi extraído e amplificado o gene *Wsp* por Reação em Cadeia da Polimerase. No total, 448 indivíduos de 18 espécies e 7 gêneros de culicídeos foram analisados. Os mosquitos do Maranhão estão infectados com *Wolbachia*, tendo altas frequências de infecção para espécies fisiologicamente mais permissivas como *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus*. No geral a taxa de infecção média foi 17%, com variação entre as espécies de 4% a 80%. O DNA de *Wolbachia* foi encontrado em 6 espécies: *Ae. albopictus*, *Ae. scapulari*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cq. juxtamansonia* e *Cq. venezuelensis*. Além de mosquitos dos subgêneros *Anopheles*, *Nyssorhynchus* e *Culex* (*Melanoconion*). Esse é o primeiro registro de *Ae. scapularis*, *Cx. juxtamansonia*, *Cq. venezuelensis* infectados com a *Wolbachia* no Mundo. As espécies *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* por possuir alta prevalência e são as mais indicadas para estudos com objetivo de avaliar a influência da *Wolbachia* no ciclo de vida e processos evolutivos de especiação. A positividade média nos gêneros *Aedes* (27%), *Anopheles* (2,5%), *Culex* (38%) e *Coquillettidia* (23%) permitiu inferir que *Aedes*, *Culex* e *Coquillettidia* possuem alta capacidade manter relações de fixação e endossimbiose em ambientes naturais. Apesar disso, não detectou-se a infecção em mosquitos da espécie *Ae. aegypti*. Apesar da baixa taxa de infecção no gênero *Anopheles* aqui detectamos a infecção em Anofelinos dos subgêneros *Nyssorhynchus*. Assim como *Anopheles*, *Cellia* e *Lophopodomyia* o subgênero *Nyssorhynchus* é fisiologicamente permissivos para suportar a infecção por *Wolbachia*.

**Palavras-chave:** Infecção Natural, PCR, *Wolbachia*, Maranhão.

## ABSTRACT

It is estimated that about 66% of all known arthropod species are infected with *Wolbachia*. This endosymbiont has been widely studied due to its high natural diversity and mainly due to its ability to reduce infection by pathogens that cause diseases such as Dengue, Zika, Chikungunya, Yellow Fever and Malaria, transmitted by mosquitoes. Despite this, there is little information about the dispersion of *Wolbachia* in natural environments in Brazil. Such knowledge is important, as it allows estimating the extent of natural infection in hosts and the use of certain strains in the biological control of vector mosquitoes. The aim of this study was to evaluate the rate of natural infection by *Wolbachia* in different species of Culicidae in representative areas of the State of Maranhão. Mosquitoes were collected with CDC-HP traps, ovitraps, sapucaias and Shannon's tent in the municipalities of São Luís, São José de Ribamar, Chapadinha, Vitória do Mearim, Godofredo Viana and Pastos Bons. Insect DNA was extracted and the *Wsp* gene amplified by Polymerase Chain Reaction. In total, 448 individuals of 18 species and 7 genera of Culicidae were analyzed. Mosquitoes in Maranhão are infected with *Wolbachia*, with high frequencies of infection for physiologically more permissive species such as *Ae. albopictus* and *Cx. quinquefasciatus*. Overall, the average infection rate was 17%, with variation between species ranging from 4% to 80%. *Wolbachia* DNA was found in 6 species: *Ae. albopictus*, *Ae. scapulari*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cq. juxtamansonia* and *Cq. Venezuelensis*. In addition to mosquitoes of the *Anopheles (Nys.) spp* and *Cx. (Mel.) spp* complexes, this is the first record of *Ae. scapulari*, *Cx. juxtamansonia*, *Cq. Venezuelensis* infected with *Wolbachia* in the World. Species *Ae. albopictus* and *Cx. quinquefasciatus* for having a high prevalence and are the most suitable for studies aiming to assess the influence of *Wolbachia* on the life cycle and evolutionary processes of speciation. The average positivity in the genera *Aedes* (27%), *Anopheles* (2.5%), *Culex* (38%) and *Coquillettidia* (23%) allowed us to infer that *Aedes*, *Culex* and *Coquillettidia* have a high capacity to maintain fixation and endosymbiosis relationships in natural environments. Despite this, the infection was not detected in mosquitoes of the species *Ae. Aegypti*. Despite the low rate of infection in the genus *Anopheles*, here we detected infection in *Anophelinae* of the subgenus *Nyssorhynchus*. Like *Anopheles*, *Cellia* and *Lophopodomyia*, *Nyssorhynchus* is physiologically permissive to support *Wolbachia* infection.

**Keywords:** Natural Infection, Mosquitoes, *Wolbachia*, Maranhão.

## 1. INTRODUÇÃO

Os culicídeos (Diptera, Nematocera), conhecidos popularmente por pernilongo, muriçoca, carapanãs ou mosquitos são vetores de importantes doenças como Malária, Dengue, Febre Amarela e Zika para o ser humano (CONSOLI, LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002). Tais doenças ocorrem em mais de 100 países e afetam metade da população mundial, ultrapassando 500 milhões de casos clínicos por ano (BHATT *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2018; WHO, 2018).

Desde o século XIX, quando foram levantadas as primeiras hipóteses sobre o papel desses dípteros como transmissores de infecções, um número considerável de estudos vêm sendo realizados a fim de encontrar pontos de vulnerabilidade para melhor combatê-los (FORATTINI, 2002). Embora os esforços com pesquisa, vacinas e diversos métodos de controle vetorial tenham avançado significativamente nas últimas décadas, não foi o suficiente conter a expansão vetorial e o impacto de tais doenças (CONSOLI, LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; TEICH, ARINELL, FAHAM, 2017).

Em função desse infortúnio, a bactéria *Wolbachia* tem adquirido enorme importância (MOREIRA *et al.*, 2009; ALIOTA *et al.*, 2016). Essencialmente, porque esse endossimbionte inibe a replicação de patógenos promovendo efeitos de proteção aos hospedeiros contra microorganismos estranhos e interferindo na transmissão de patógenos, que causam doenças ao ser humano (WERREN, 2000; WERREN, BALDO, CLARK, 2008, MOREIRA *et al.*, 2009; ALIOTA *et al.*, 2016).

Devido a esses efeitos, a *Wolbachia* vêm sendo empregada no controle vetorial em alguns países (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2012; FRENTIU *et al.*, 2014; ALIOTA *et al.*, 2016; DUTRA *et al.*, 2016). Esses resultados levaram a Organização Mundial de Saúde-OMS a defender e incentivar o controle biológico por meio da *Wolbachia* em mosquitos na interrupção da cadeia de transmissão de patógenos (WHO, 2018).

Apesar do potencial uso desta metodologia é necessário considerar o status da infecção em populações naturais de mosquitos, em determinadas regiões geográficas. Isso porque a distribuição das cepas da bactéria está condicionado à relação simbiótica entre bactéria e hospedeiro. Dessa forma, o conhecimento estirpes de *Wolbachia* e nível taxonômico do hospedeiro permite minimizar custos e aumentar a eficiência de procedimentos como transinfecção em ambiente laboratorial (KLASSON, 2008; MAVINGUI, 2012; BIAN *et al.*, 2013; BALDINI, 2014; SONI, 2017; SAWASDICHAI *et al.*, 2019).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Um breve histórico sobre a *Wolbachia*

A bactéria *Wolbachia* foi descoberta nos tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758), em 1924 por Marchal Herting, um entomologista, e Samuel Burt Wolbach, um patologista (HERTING, WOLBACH, 1924). No entanto, a sua descrição formal como um “organismo gram-negativo, intracelular pleomórfico, em forma de bastonete, observado nos ovários e nos testículos e presente em ovos de mosquitos, e conseqüentemente na progênie das fêmeas” só foi publicada em 1936 (HERTING, 1936). Desde então, define-se a espécie como *Wolbachia pipentis* sendo a única espécie do gênero *Wolbachia* posicionada taxonomicamente junto à família Anaplasmatacea, ordem Rickettsiales, da classe das alfa-proteobactérias (WEISS, MOULDER, ORDER, 1984, DUMLER *et al.*, 2001, Lo *et al.*, 2007).

Depois da sua descrição, somente na década de 1950 novas informações sobre a *Wolbachia* foram divulgadas na comunidade científica. Ghelelovitch e Laven (1952, 1951) descobriram dentro do gênero *Culex* que determinados cruzamentos intraespecíficos eram incompatíveis, levando a produção de pouca ou nenhuma progênie (GHELELOVITCH, 1952). Dessa forma, foi estabelecido que a incompatibilidade tivesse um padrão de herança citoplasmática e nomeado este fenômeno de Incompatibilidade Citoplasmática (IC) (LAVEN, 1951; 1959). No entanto, não era bem clara a ligação entre *Wolbachia* e incompatibilidade citoplasmática (WERREN, 1997).

Somente 20 anos depois, na década de 70, que tal associação foi estabelecida com os estudos de Yen e Barr. Quando a *Wolbachia* foi eliminada por meio do tratamento com antibiótico de fêmeas infectadas foi verificado que a produção de progênie voltava a ser normal (YEN & BARR, 1971). A partir de então, a IC que era vista frequentemente em mosquitos, passou, nos anos seguintes, a ser observada, ao redor do mundo, nos mais diversos grupos de insetos, incluindo mariposa (BROWER, 1976), vespa (RICHARDSON *et al.*, 1987), mosca da fruta (HOFFMAN, 1988) e besouro (O’NEILL, 1989).

Durante a década de 70 e 80, motivados pelo entendimento dos mecanismos de especiação, nas relações simbióticas, controle de patógenos e os limites da extensão da infecção na natureza, a *Wolbachia* foi amplamente estudada. Assim, vários grupos dentre os artrópodes e nematoides foram diagnosticados com a infecção (WERREN, 2007; WERREN, BALDO, CLARK, 2008). Contudo, as relações filogenéticas entre as bactérias encontradas no tecido

reprodutivo de insetos divergentes eram desconhecidas até o início dos anos 90 quando as ferramentas aplicadas de métodos de genética molecular tornaram-se mais acessíveis, assim como estudos usando o sequenciamento genômico. Dessa forma, estudos das regiões 16S rDNA, 23S rDNA e genes que codificam regiões de proteínas específicas de bactérias, permitiram a construção de marcadores genéticos, que com o uso da Reação em Cadeia da Polimerase levou a um maior entendimento das relações evolutivas da *Wolbachia* e seus hospedeiros (BREEUWER *et al.*, 1992; ROUSSET *et al.*, 1992; STOUTHAMER *et al.*, 1993, WERREN, 2007).

No final de 2004, o genoma completo da bactéria *Wolbachia pipientis* de *Drosophila melanogaster* (wMel) foi sequenciado e passou-se a ter um melhor entendimento de como ocorre as manipulações bioquímicas em nível celular (WU *et al.*, 2004). Desde então, os avanços nos estudos com *Wolbachia*, baseados em ferramentas moleculares vem sendo amplamente utilizados para se compreender não somente a evolução, mas também sua, distribuição, ecologia, evolução e como ferramenta de controle de patógenos (BREEUWER *et al.*, 1992, WERREN, 2007; WERREN, BALDO, CLARK, 2008,).

## 2.2. Classificação

No início da década de 90, com o advento das ferramentas moleculares nos estudos taxonômicos e filogenéticos, principalmente por meio do gene 16S rDNA, foi determinado que a *Wolbachia* possui origem monofilética. Porém era fundamental uma classificação. Assim, inicialmente consideravam-se semelhantes os clados que não apresentassem mais que 2-3% de divergência entre si, segundo sequências do 16S rDNA (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994, BREEUWER *et al.*, 1992, WERREN, 2007). Entretanto, tal critério tornou-se cada vez mais inapropriado quando se procurou resolver questões filogenéticas, isso porque, a designação de cada cepa é baseada na identificação do hospedeiro de origem e no supergrupo pertencente. Assim, ocorria incongruências nas relações filogenéticas da bactéria quando se comparava com o hospedeiro, devido ao gene 16S rDNA apresentar altos níveis de conservação, tornando-se necessária a utilização de diferentes abordagens para a classificação do endossimbionte (WERREN, 1997; BALDO, WERREN, 2007).

Somente quando gene específicos (ZHOU *et al.*, 1998), multilocus (BALDO *et al.*, 2006), *tandem* (RIEGLER *et al.*, 2012) e genes como 16S rDNA, *ftsZ*, *groEL*, *gltA*, *dnaA*, *Wsp* foram exaustivamente estudados, foi possível uma classificação. Até o momento *Wolbachia* compreende 6 supergrupos (linhagens) A-F e H-Q (WERREN, 1997, GLOWSKA



*et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016, GERTH, 2016). Há também, a 17ª linhagem que ainda, está em debate, pertencente ao supergrupo R, encontrada em aracnídeos (ZHOU, ROUSSET, O'NEILL, 1998; CASIRAGHI *et al.*, 2005; LO *et al.*, 2007; ROS *et al.*, 2009; GLOWSKA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016, GERTH, 2016). Portanto, os supergrupos A, B, E, F, H, I, K, M, N, O, P, Q estão relacionados a hospedeiros artrópodes, com exceção do F que está presente tanto no Filo Arthropoda quanto em Nematoda. Em relação aos supergrupos C, D e J e L estes são encontrados exclusivamente em nematóides filariais e o R ainda está em discussão (GLOWSKA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016, GERTH, 2016).

### **2.3 *Wolbachia* e a endossimbiose em Nematóides e Artrópodes**

A simbiose possui grande importância para a evolução e diversidade ecológica. A endossimbiose é um tipo específico de simbiose em que um parceiro, geralmente microbiano, vive dentro de seu hospedeiro, representando assim uma forma muito íntima de interação entre dois organismos (WERNEGREEN, 2004). De acordo com os genes responsáveis pela manutenção e estabelecimento da simbiose podem ocorrer fenótipos vantajosos ou prejudiciais ao hospedeiro (HENTSCHEL *et al.*, 2000; ZILBER-ROSENBERG, ROSENBERG, 2008).

*Wolbachia* é um endossimbionte que vive dentro do citoplasma do ovócito materno do hospedeiro para garantir sua transmissão para prole e assim manter sua sobrevivência (DOBSON *et al.*, 1999). Assim é normalmente herdada via materna, e esse tipo de herança também é denominado transmissão vertical (mãe para filhos). Também há transmissão horizontal (intertaxônica). Este movimento lateral da bactéria permite que a mesma realize recombinações aumentando sua diversidade, porém dificulta estudos de reconstruções filogenéticas (WERREN *et al.*, 1995a). Por exemplo, Panaram & Marshall (2007), encontraram a linhagem do supergrupo F de *Wolbachia* (característica de nematóides filárias) em insetos ortópteros. A similaridade entre as sequências do gene *ftsZ* de *Wolbachia* encontrada em diferentes hospedeiros das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera, demonstra ter havido transmissão horizontal de *Wolbachia*, já que as sequências deste gene teriam divergido há aproximadamente 1,6 milhões de anos (WERREN *et al.*, 1995a), enquanto as espécies hospedeiras há aproximadamente 200 milhões de anos. O mecanismo de transmissão entre táxons até o momento é desconhecido, embora haja evidências indiretas da transferência entre parasitóides e seus hospedeiros insetos (WERREN *et al.*, 1995b; HUIGENS *et al.*, 2004), e de eventos de transmissão através de canibalismo e predação, por exemplo (LE CLEC'H *et al.*, 2012).

Em nematóides, a relação endossimbiótica é do tipo mutualistas onde a bactéria auxilia no desenvolvimento e sobrevivência de seus hospedeiros. Ocorre, geralmente, a partir de parcerias estabelecidas há muito tempo na história evolutiva, e com características bastante especializadas. Isso permite que seus hospedeiros explorem fontes de alimento e habitats anteriormente inadequados, aumentando o seu valor adaptativo e protegendo-os contra inimigos naturais (MORAN, TELANG, 1998; HERRE *et al.*, 1999; DHEILLY, 2014).

Em algumas espécies de nematóides filariais, *Wolbachia* não manipula a reprodução de forma óbvia, porém, experimentos baseados em tratamento com antibióticos demonstram a importância da bactéria na embriogênese e outros estágios do desenvolvimento destes nematóides (BANDI *et al.*, 1999). Neste caso, a *Wolbachia* seria mais bem caracterizada como um “parceiro essencial” do hospedeiro (STEVENS *et al.*, 2001). Este papel é enfatizado pela congruência das filogenias de *Wolbachia* e dos nematóides por mais de 100 milhões de anos, o que é típico de interações em forma de parceria (CHARLAT *et al.*, 2003). Por outro lado, a *Wolbachia* pode ter uma relação de parasitismo reprodutivo, que se propaga através das linhagens de seus hospedeiros manipulando sua reprodução. Esse parasitismo é muito comum em artrópodes. Estes microrganismos herdados matematicamente causam alterações em seus hospedeiros, permitindo o aumento da frequência de fêmeas infectadas na prole e, por consequência, garantindo sua propagação para a geração seguinte (WERNEGREN, 2004).

Tanto em artrópodes quanto nematóides, a infecção por *Wolbachia* pode induzir em seus hospedeiros diversos efeitos clássicos de parasitismo reprodutivo que geram resultados diretos sobre a razão sexual das populações, como a indução de partenogênese, a feminização e o androcídio (*male killing*). Além disso, *Wolbachia* também pode causar a incompatibilidade citoplasmática que, apesar de não causar distorção na razão sexual, em algumas espécies, têm efeitos profundos na evolução dos hospedeiros (WERREN *et al.*, 2008).

#### **2.4 Os fenótipos induzíveis por *Wolbachia***

O sucesso da dispersão de *Wolbachia* nos mais diferentes hospedeiros está diretamente relacionado a diversos fatores, porém dois deles são considerados os principais: o primeiro é a eficiência com que esta é transmitida através da linhagem germinativa das fêmeas, sendo que em machos a bactéria não está presente no esperma maduro. Nestes indivíduos, a taxa de transmissão através da linhagem germinativa é da ordem de 2%, como observado em *Drosophila sp.* (HOFFMANN, TURELLI, 1988). O segundo, diz respeito à manipulação do

processo reprodutivo do hospedeiro via indução de uma série de fenótipos, favorecendo sempre a fêmea. Dentre os efeitos observados na natureza, têm-se: feminização, partenogênese, morte dos machos e incompatibilidade citoplasmática (WERREN *et al.*, 2008), conforme figura 1.

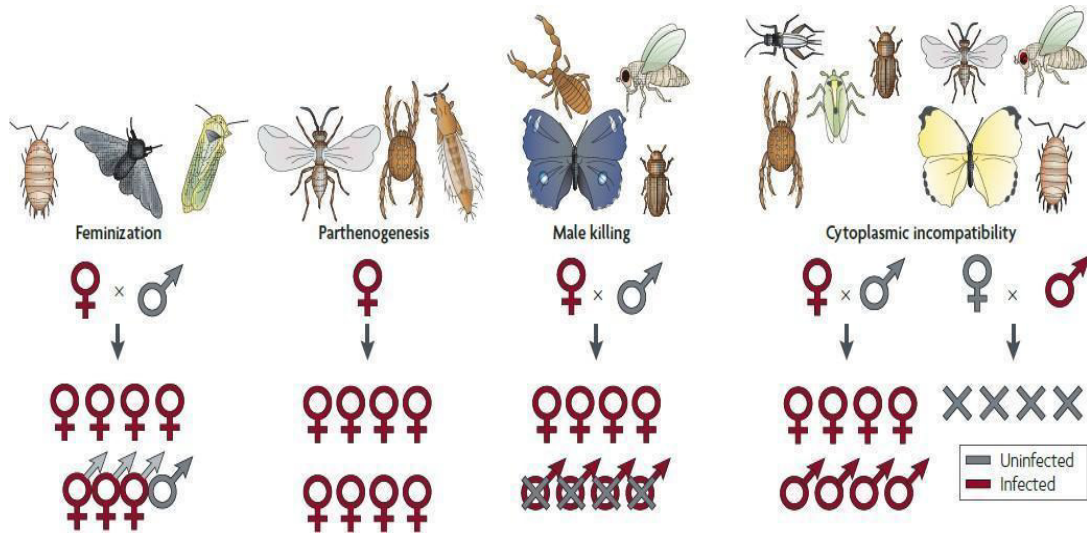


Figura 1- Fenótipos induzidos por *Wolbachia* nas diferentes ordens de insetos conhecidas.   
 Fonte: WERREN *et al.*, 2008.

Na indução à partenogênese, que ocorre em espécies haplodiplóides, *Wolbachia* torna machos em fêmeas. Nestes organismos, os machos normalmente se desenvolvem a partir de ovos haplóides não fertilizados (partenogênese arrenótoca), enquanto as fêmeas se desenvolvem de ovos diplóides fertilizados. A bactéria desencadeia a duplicação do número cromossômico dos ovos haplóides não fertilizados, tornando-os diplóides. Isto então leva à formação de fêmeas produzidas assexuadamente (STOUTHAMER *apud* CHARLAT *et al.*, 2003). Apesar de o mecanismo de atuação não estar claro, sabe-se da interrupção do ciclo celular durante o desenvolvimento embrionário precoce, resultando em ovos diplóides não fertilizados. Linhagens de *Wolbachia* que induzem partenogênese frequentemente estão fixadas dentro da população, convertendo espécies hospedeiras sexuais em assexuais. Em algumas destas espécies, a capacidade de reproduzir-se sexualmente se perdeu completamente ao longo do tempo. Apesar do tratamento com antibióticos poder restaurar a produção de machos na progênie, estes machos se mostram não funcionais. Em outras espécies, a infecção permanece em um equilíbrio polimórfico, com indivíduos infectados e não infectados. Tal polimorfismo se acredita ser promovido por fatores do hospedeiro que resistem à ação ou transmissão da bactéria (STOUTHAMER *apud* BANDI *et al.*, 2001).

Na feminização em diplóides, machos genéticos são transformados em fêmeas fenotípicas e funcionais por ação hormonal (KAGEYAMA, HOSHIZAKI, ISHIKAWA *et al.*, 1998). Algumas linhagens de *Wolbachia* podem causar a feminização através de ação sobre a glândula androgênica ou sobre a recepção do hormônio androgênico, enquanto que outras apenas rompem o desenvolvimento da glândula, resultando em eficiência imperfeita de feminização, com alguns machos com *Wolbachia* (MARCADÉ *et al.*, 1999; RIGAUD, MOREAU, JUCHAULT *et al.*, 1999). Em termos populacionais este fenótipo tem grande importância, visto que fêmeas infectadas passam a produzir o dobro de fêmeas em relação às não infectadas, aumentando então, tanto a frequência de fêmeas infectadas quanto a do próprio endossimbionte (CHARLAT *et al.*, 2003). No exemplo clássico de feminização em isópodos terrestres, *Wolbachia* é responsável por reversão de sexo. Cerca de metade das espécies de isópodos de diferentes famílias é infectada, cada espécie carregando uma linhagem única de *Wolbachia* (BOUCHON *et al.*, 1998).

Na morte do macho (fenótipo de androcídio), a bactéria consegue detectar o sexo do hospedeiro e assim matar os machos, ou então interfere diretamente com a determinação do sexo, de forma a causar a morte específica de machos. Como a morte ocorre durante a embriogênese, o endossimbionte provavelmente interage com componentes acima das vias de determinação de sexo (CHARLAT *et al.*, 2003). Assim, observa-se uma interferência direta na determinação do sexo, que por fim ocasiona desvios nas proporções sexuais da prole, em favor das fêmeas. As espécies hospedeiras geralmente colocam muitos ovos de uma única vez, e a prevalência é maior em espécies onde os ovos não eclodidos são consumidos pelos irmãos logo após a eclosão destes, ou onde existe competição entre os irmãos eclodidos por recurso limitado de alimento (HURST, JIGGINS, ROBINSON *et al.*, 2001). Assim, a morte dos machos acaba por aumentar a sobrevivência das fêmeas irmãs, que possuem a bactéria manipuladora por descendência.

Na incompatibilidade citoplasmática (IC), certos cruzamentos entre machos e fêmeas apresentando diferentes estados de infecção por *Wolbachia* geram prole inviável. *Wolbachia* foi documentada como causadora de IC pela primeira vez por Yen e Barr (1976), e desde então este fenótipo foi descrito em diversas ordens de insetos, porém o fenômeno foi e é mais amplamente estudado em *Drosophila simulans* (HOFFMANN *et al.*, 1986; MERÇOT *et al.*, 1995; HOFFMANN *et al.*, 1996; CLARK *et al.*, 2002). Especificamente, na chamada IC unidirecional a prole é inviável em cruzamentos em que apenas o macho esteja infectado, já que tal cruzamento não seria ótimo para a transmissão de *Wolbachia* a sua prole, que se dá apenas pela via materna. Entretanto, o cruzamento no sentido contrário, ou seja, de uma fêmea

infectada com um macho não infectado, gera prole viável (SERBUS *et al.*, 2008; WERREN *et al.*, 2008). Já na IC acontece quando tanto o macho quanto a fêmea estão infectados com diferentes cepas da bactéria, acarretando a incompatibilidade no cruzamento entre estes hospedeiros (WERREN, 1997; SINKINS, 2004).

A morte determinada por IC ocorre no início do desenvolvimento, e parece estar associada com alterações na condensação e descondensação apropriada da cromatina paterna (WERREN, 1997; STOUTHAMER *et al.*, 1999; MERÇOT, POINSOT, 2009). Assim, quando o espermatozóide adentra o óvulo, a IC é expressa pela incapacidade dos cromossomos paternos de se condensarem, enquanto os cromossomos maternos adentram a mitose normalmente, levando então a condições haplóides ou aneuplóides. Ainda, seguindo o modelo Modificação/Recuperação (*mod/resc*) proposto por Poinsot *et al.* (2003) para linhagens compatíveis do simbionte, acredita-se que *Wolbachia* provoque tais modificações nos espermatozoides, porém é permitido o desenvolvimento normal do embrião se a fêmea, também infectada, resgatar as modificações provocadas nesses cromossomos paternos para completar a cariogamia (LASSY, KARR, 1996; CALLAINI *et al.*, 1997). Fêmeas livres da bactéria não recuperam as modificações provocadas nos espermatozoides e, por consequência, sua descendência é bloqueada (McGraw *et al.*, 2002). Este fenótipo é induzido em diversos artrópodes, particularmente insetos, porém também em ácaros e crustáceos isópodes (WERREN, 1997; STOUTHAMER *et al.*, 1999).

Os custos impostos pela IC não são fáceis de prever. Para as fêmeas, ter *Wolbachia* se torna vantajoso, visto que a infecção protege os ovos da mortalidade causada por IC. Para os machos, por outro lado, a infecção é deletéria, visto que diminui a fertilidade em cruzamentos com fêmeas não infectadas. Assim, a direção da seleção depende da prevalência da infecção: quando a prevalência de *Wolbachia* é baixa, o custo sofrido por machos infectados é muito maior que o benefício obtido por fêmeas infectadas; entretanto, quando a prevalência é alta, os custos sofridos pelos machos infectados serão muito menores que os benefícios obtidos pelas fêmeas infectadas. De uma forma geral, os custos e benefícios de possuir *Wolbachia* entram em equilíbrio quando a frequência de indivíduos infectados e não infectados é aproximadamente a mesma, porém este é um estágio apenas transitório (CHARLAT *et al.*, 2003).

De qualquer forma, esta estratégia de manipulação confere uma vantagem reprodutiva à infecção, consequentemente possibilitando a disseminação de *Wolbachia* em populações naturais até uma alta prevalência (DURON, 2008). Desta maneira, este fenótipo está envolvido em implicações evolutivas importantes, principalmente no processo de especiação (TELSCHOW *et al.*, 2005; WERREN, BALDO, CLARK, 2008), devido à redução do fluxo

gênico entre algumas populações, acentuando assim o isolamento reprodutivo e aumentando, a frequência da *Wolbachia* em algumas espécies (WERREN, BALDO, CLARK, 2008; MILLER, EHRMAN, SCHNEIDER, 2010).

Acreditava-se que a IC era um fenótipo induzido exclusivamente por *Wolbachia*. Entretanto, verificou-se que este não é o caso, com a identificação da bactéria *Cardinium* (Bacteroidetes) como outro agente causador, estabelecendo um modelo interessante para estudos comparativos (HUNTER *et al.*, 2003). Especificamente em *Drosophila*, nosso organismo modelo neste trabalho, a interação entre *Wolbachia* e seu hospedeiro pode provocar tanto alterações na proporção sexual devido à morte dos machos, como o efeito da incompatibilidade citoplasmática (WERREN, 1997). É interessante também salientar que a indução de IC por *Wolbachia* tem sido utilizada em esforços na proposição de estratégias para diminuir a competência de vetores de doenças (BOURTZIS, 2008; HOFFMANN *et al.*, 2011), devido à impressionante capacidade deste fenótipo de efetivamente dirigir *Wolbachia* pela população hospedeira (TURELLI, HOFFMANN, 1991).

## 2.5 *Wolbachia* e mosquitos (Diptera: Culicidae)

Desde o descobrimento da *Wolbachia* sua associação com os culicídeos foi frequentemente estudada. Kittayapong *et al.*, (2000) afirmam que os mosquitos parecem ser o grupo mais competente manter a fixação com a *Wolbachia* na natureza. As altas taxas de infecção em algumas espécies de culicídeos como *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* apoiam essa teoria (KITAYAPONG, 2000).

Os culicídeos são insetos pertencentes à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, conhecidos também como pernilongos, muriçocas, carapanãs ou simplesmente mosquitos (FORATTINI, 2002). Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas, enquanto que as fases imaturas são aquáticas (FORATTINI, 2002). As fêmeas de diversas espécies se alimentam do sangue de animais, sendo hematófagos, mas outras podem produzir ovos sem uma refeição de sangue (Figura 2). Atualmente, reconhece-se a existência de cerca de 3.578 espécies de mosquitos, classificadas em duas subfamílias, 11 tribos e 41 gêneros (GAFFIGAN, *et al.*, 2021). A grande diversidade desse táxon está relacionada a sua alta adaptabilidade. As espécies de mosquitos concentram-se em regiões temperadas e tropicais, desde florestas até áreas urbanizadas (FORATTINI, 2002, HARBACH, 2020).



Figura 2- Fêmea e macho de mosquitos da espécie *Aedes aegypti*.

Até o início do século XIX, os mosquitos eram encarados apenas como seres desagradáveis. Porém, desde os séculos XVII e XVIII, a sua existência mereceu atenção por serem comumente encontradas no ambiente humano o que resultou no século XIX as primeiras hipóteses sobre o papel desses insetos como transmissores de doenças. Assim, os mosquitos teriam sua primeira comprovação, de vetores biológicos de doenças, com as observações de Manson, em 1877 na China, quando descobriu o crescimento e desenvolvimento de vermes nematóides de *Wuchereria bancrofti* no interior de mosquitos fêmeas que haviam realizado repasto sanguíneo em seres humanos infectados, caracterizando assim a filariose bancroftiana, como uma doença a qual o patógeno é veiculado por mosquitos do gênero *Culex*. Com isso, teve-se o nascimento, como ciência, da entomologia médica ou culicidologia médica (FORATTINI, 2002). Graças a eles pôde-se estabelecer a responsabilidade na ocorrência de diversos problemas de saúde pública, em especial, à malária, arboviroses e filarioses (FORATTINI, 2002).

Atualmente é possível afirmar que os estudos referentes aos culicídeos ultrapassam o de qualquer outro grupo de artrópode de interesse epidemiológico, a fim de encontrar pontos de vulnerabilidade para melhor combater e evitar tais doenças ao homem e outros animais (FORATTINI, 2002). Com isso, a *Wolbachia* é o foco de numerosos estudos com o objetivo de controlar patógenos que causam doenças específicas como Zika, Chikungunya, Dengue, Febre Amarela e Malária (WERREN, 2008; WHO, 2015, 2016; KAMTCHUM-TATUENE *et al.*, 2017).

Isso resultou na introdução artificial de cepas, inicialmente isoladas de *Drosophila melanogaster* (MIN, BENZER, 1997) de *Wolbachia*, denominada *wAlb*, *popcorn* ou *wMelPop*, por meio da técnica de microinjeção, em embriões do mosquito *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762)

(BIAN *et al.*, 2010; MCMENIMAN *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2009). Esse experimento demonstrou que quando estes hospedeiros estavam infectados, havia redução de cerca de 50% no tempo de vida dos mesmos. A redução da sobrevivência foi atribuída ao fato de *wMelPop* se replicar a níveis elevados, nos mais diversos tecidos do hospedeiro, incluindo o sistema nervoso central e o tecido gorduroso são infestados (MIN, BENZER, 1997; DOBSON *et al.*, 1999). Demonstrou-se ainda que além de reduzir a longevidade dos mosquitos infectados, a *Wolbachia* é capaz de reduzir de forma quase completa a carga viral, com este efeito tendo relação direta com a cepa em questão (MCMENIMAN *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2009).

Dessa forma, outras cepas como *wMel* foram testadas e concluiu-se que essa possui efeitos mais brandos tanto no hospedeiro quanto no vírus (não reduzindo drasticamente a longevidade do mosquito e não bloqueando totalmente a replicação viral). Já a cepa *wMelPop* por sua vez é mais agressiva com relação ao hospedeiro e ao vírus o que reduz a vida do hospedeiro (MOREIRA *et al.*, 2009; BIAN *et al.*, 2010; WALKER *et al.*, 2011). Logo, é possível utilizar determinadas cepas como forma de controle biológico de doenças veiculadas pelo *A. aegypti*, como Dengue, Zika, Chikungunya, Febre Amarela (MCMENIMAN *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2009).

Porém, seria necessário testar em campo se os resultados obtidos em laboratório seriam os mesmos hipotetizados. Assim, após aprovação das agências regulatórias Australianas, os trabalhos de liberação de *A. aegypti* contendo *Wolbachia* se iniciaram em janeiro de 2011. Foi verificado que após liberação em campo na Austrália de espécimes de *A. aegypti* contendo *Wolbachia*, em poucas gerações a bactéria se disseminou por toda a população de mosquitos das localidades sob ensaio (WALKER *et al.*, 2011). Os mosquitos com *Wolbachia* passaram a bactéria para as próximas gerações. Até hoje – 2013 - cerca de 95 - 100% da população de *A. aegypti* destas duas localidades se mantém positiva para a bactéria. Por meio da incompatibilidade citoplasmática (WALKER *et al.*, 2011).

Entretanto, é necessário considerar algumas lacunas, que possibilitam utilizar a *Wolbachia* com metodologia de controle eficaz. Primeiro, quando se pensa na utilização de *Wolbachia* para um programa efetivo de controle de vetores, considerar a incompatibilidade citoplasmática é crucial. Isso porque os níveis de IC são os efeitos que geram vários fenótipos, como por exemplo, em adultos de *A. albopictus* (DOBSON *et al.*, 2001, 2002b, 2004; KITTAYAPONG *et al.*, 2002).

Em contraste, os efeitos de *Wolbachia* nos imaturos de *A. albopictus* não foram bem caracterizados (ISLAM, DOBSON, 2006). Estes mesmos autores examinaram os efeitos da *Wolbachia* na sobrevivência e desenvolvimento dos imaturos, tamanho dos adultos e o efeito



da nutrição das larvas no nível de IC. Eles observaram uma alta sobrevivência das larvas não infectadas, principalmente devido à redução na sobrevivência de machos infectados. Porém, a diferença observada na taxa de desenvolvimento não pode ser atribuída à infecção pela bactéria e os autores, não observaram efeito da infecção no tamanho dos adultos.

Segundo, a longevidade dos mosquitos também exerce papel fundamental no estabelecimento da *Wolbachia*, como já explicado anteriormente (MCMENIMAN *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2009). Outro ponto, as variações genéticas que a simbiose causa na fisiologia do hospedeiro são pouco entendidas. Por exemplo, o mosquito *Culex pipiens* desenvolveu a resistência a inseticidas devido a mutações, assim algumas populações apresentam diferentes variações genéticas (ATYAME *et al.*, 2011, BERTICAT *et al.*, 2002; ECHAUBARD *et al.*, 2010). O mesmo pode ter ocorrido em anofelinos vetores da Malária (HEMINGWAY *et al.*, 2016). Terceiro, o efeito que múltiplas infecções e níveis de densidade causam em seus hospedeiros e a relação que esses efeitos geram em espécies (LIPSITCH *et al.*, 1996; BONDS, 2006). A densidade de *Wolbachia* nos tecidos é um dos fatores mais importantes para o entendimento dos efeitos biológicos causados por esta bactéria (DOBSON *et al.*, 1999). A redução na densidade bacteriana pode resultar na transmissão materna imperfeita e, conseqüentemente, na perda da infecção.

Por outro lado, o aumento desta densidade pode levar a efeitos patológicos e por conseqüente, danos ao *fitness* do hospedeiro (MCGRAW *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2009b). Ainda é pouco entendido os efeitos que a densidade bactéria causa em seus hospedeiros, mas é certo que a densidade bacteriana depende diretamente dos genótipos do hospedeiro e da bactéria envolvida, como já observado anteriormente por outros autores (KONDO *et al.*, 2005; AHANTARIG *et al.*, 2008).

Apesar de muitos estudos sobre os limites da infecção natural, pouco se sabe como a simbioses entre a *Wolbachia* e algumas espécies de mosquitos ocorrem. Apesar disso, vários gêneros de mosquitos já foram registrados com a infecção, como *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Hodgesia*, *Mansonia*, *Ochlerotatus*, *Tripteroides* e *Uranotaenia* (KITAYAPONG *et al.*, 2000; RAGON, 2004; WIWATANARATANABUTR, 2013; RAHARIMALALA *et al.*, 2015; NUGAPOLA *et al.*, 2017, SONI *et al.*, 2017, SAWASDICHAI *et al.*, 2019). Ainda não se sabe ao certo, a infecção natural concentra-se nos mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, *Coquillettidia* e *Anopheles* (KITAYAPONG *et al.*, 2000; DEAN, DOBSON, 2004; OSEI-POKU *et al.*, 2012; WIWATANARATANABUTR, 2013; BALDINI *et al.*, 2014; BALDINI *et al.*, 2018; BASSENE *et al.*, 2018; SAWASDICHAI *et al.*, 2019). Isso leva a hipótese de que algumas

cepas de *Wolbachia* podem manter relações de fixação e penetrância em algumas espécies, mais facilmente do que em outras (BALDINI *et al.*, 2018; BASSENE *et al.*, 2018).

As cepas de *Wolbachia* que infectam as populações de mosquitos ao redor do mundo possuem uma distribuição descontínua. Por exemplo, espécies de mosquitos como *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* possuem alta frequência de infecção, devido a vários fatores, incluindo ecológicos e genéticos que alteram a IC e a fixação (WERREN, 1997; WERREN, BALDO, CLARK, 2008).

O vetor *Ae. albopictus* é frequentemente encontrado infectado com *Wolbachia* dos super grupos A e B, cepas wAlba e wAlbB, wPip (KITAYAPONG *et al.*, 2000). Essa espécie é altamente permissiva para infecções únicas, ou infecções múltiplas (infecção envolvendo mais de uma cepa de *Wolbachia* no mesmo hospedeiro denomina-se dupla infecção ou superinfecção) (SINKINS *et al.*, 1995; KITAYAPONG *et al.*, 2000). Essa espécie possui elevada frequência de superinfecção observada em vários estudos (KITAYAPONG *et al.*, 2002; TSAI *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2015). As populações de *Ae. albopictus* têm sido encontradas, normalmente, super infectadas pelos super grupos A e B. Esse nível de infecção é intensificado graças a incompatibilidade citoplasmática, tanto na forma unidirecional, quanto bidirecional, dessa forma a fixação e penetrância na espécie são intensas (SINKINS *et al.*, 1995; DOBSON *et al.*, 2001).

Outra espécie com alta frequência de espécimes infectados é *Cx. quinquefasciatus* que parece onipresente. Além disso, a taxa de infecção quando comparada a outras espécies é frequentemente maior, em algumas regiões é maior que *Ae. albopictus*. Isso demonstra o alto grau de especificidade e simbiose entre hospedeiro e bactéria (KITAYAPONG *et al.*, 2000, WERREN, BALDO, CLARK, 2008; DE ALMEIDA, 2011; NUGAPOLA *et al.*, 2017). No Brasil, essas espécies já foram diagnosticadas infectadas, com taxa de infecção de 87,5% (ARMBRUSTER *et al.*, 2003; MORAIS *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2015).

Por outro lado, espécies que pareciam fisiologicamente inaptas ou mesmo acreditava-se não se infectam naturalmente, como os anofelinos e *Ae. aegypti* (KITAYAPONG *et al.*, 2000) foram diagnosticados infectadas por *Wolbachia* (BALDINI *et al.*, 2014; SHAW *et al.*, 2016; BALDINI *et al.*, 2018; BASSENE *et al.*, 2018; CARVAJAL *et al.*, 2019; KULKARNI *et al.*, 2019; SAWASDICHAI *et al.*, 2019).

O trabalho de Kittayapong *et al.* (2000) e Wiwatanaratanabutr (2013) observaram que os mosquitos anofelinos da Tailândia não se infectaram por *Wolbachia*, porém, na África Baldini *et al.*, (2014) e depois outros pesquisadores detectaram a infecção para as espécies pertencentes ao Subgênero *Cellia*: *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. coluzzii*, *An. funestus*,

*An. minimus*, *An. maculatus*, *An. sawadwongporni*, *An. pseudowillmori*, *An. dirus* e *An. baimaii* (BALDINI *et al.*, 2014; SHAW *et al.*, 2016; BALDINI *et al.*, 2018; BASSENE *et al.*, 2018; SAWASDICHAI *et al.*, 2019).

Já *Ae. aegypti* no Brasil, e em outras regiões do mundo não foram diagnosticados inicialmente (KITAYAPONG, 2000; GLORIA-SORIA, CHIODO, POWELL, 2018), no entanto, alguns estudos observaram DNA de *Wolbachia* em larvas de mosquitos como em Jacksonville, Flórida, em junho de 2014 (COON, BROWN, STRAND, 2016), na Tailândia (THONGSRIPONG *et al.*, 2017), Malásia (TEO, C. H. J. *et al.*, 2017) e Houston, Texas (HEGDE *et al.*, 2018). Finalmente, com estudos mais detalhados na Flórida (EUA), no Novo México (KULKARNI *et al.*, 2019) e Filipinas (CARVAJAL *et al.*, 2019) foi verificado que esse vetor pode se infectar naturalmente com as cepas walbB do super grupo B. Nesses trabalhos, com anofelinos e *Ae. aegypti* foi muito defendido que o problema do baixo nível de densidade da bactéria interferia no diagnóstico por meio de PCR (SHAW *et al.*, 2016, BALDINI *et al.*, 2018; CARVAJAL *et al.*, 2019; KULKARNI *et al.*, 2019).

As diferenças de infecção e prevalência ocorrem entre regiões geográficas mais distantes. No entanto, já foi verificado que, apesar de mais sutis, também podem ocorrer em populações bem próximas como na Tailândia (KITAYAPONG *et al.*, 2000; WIWATANARATANABUTR, 2013). Dessa forma, espécies de mosquitos podem se infectar naturalmente em uma população ao passo que em outras pode não ocorrer KULKARNI *et al.*, 2019, CARVAJAL *et al.*, 2019). Isso porque as populações estão condicionadas a vários fatores ecológicos, recursos ambientais, temperatura, antibióticos naturais, pressão seletiva ou mesmo o tamanho de órgão sexual e fatores genéticos. Tudo isso, reduzem a densidade da bactéria em seu hospedeiro e influenciam a transmissão vertical e horizontal. Logo, ocorrerá diferenças de distribuição de entre as populações e espécies (DOBSON *et al.*, 1999; BERTICAT *et al.*, 2002; STRUNOV, KISELEVA, GOTTLIEB, 2011; SERBUS *et al.*, 2015). Dessa forma a penetrância e fixação nas espécies dependem desses fatores juntamente com o nível de incompatibilidade citoplasmática.

Assim, estudos populacionais são muito interessantes para o entendimento dos limites da infecção natural entre espécies e populações de mosquitos (SINKINS, 2004). O conhecimento da variação biogeográfica das taxas de infecção por *Wolbachia* e a inferência da susceptibilidade a infecção em diferentes táxons de mosquitos tem implicações fundamentais para o desígnio e aplicação próspera em estratégias de controle de vetores de doenças (RASGON, SCOTT, 2004). Isso porque, conhecer e estimar a prevalência em populações naturais permitiria avaliar o nível de incompatibilidade citoplasmática, que é considerado o

mecanismo mais importante na relação entre hospedeiro e *Wolbachia* e para um programa efetivo de controle de vetores, pois é o componente que permite a rápida invasão da bactéria na população (WERREN, 1997; BALDO, 2008).

No entanto, é necessário considerar que apesar da capacidade da *Wolbachia* se espalhar rapidamente nas populações e prejudicar o desenvolvimento de patógenos, tornando-a uma excelente ferramenta de controle biológico, a escolha da linhagem para tais propósitos, necessita ser cuidadosamente considerada (OSEI-POKU *et al.*, 2012). Algumas cepas introduzidas artificialmente como *wMelPop* podem impedir a replicação normal de vírus, porém também encurtam a vida dos mosquitos infectados e isso pode dificultar o estabelecimento das cepas em projetos de controle epidemiológicos baseadas no uso da *Wolbachia* (MCMENIMAN *et al.*, 2009). Além disso, as cepas de *Wolbachia* variam consideravelmente quanto a força da incompatibilidade citoplasmática, esse fator é vital na manutenção da distribuição da bactéria numa população de vetores alvo (SINKINS., *et al.*, 2005). Dessa forma nem todas as cepas conseguem manter a relação simbiótica de modo estável. Além disso, essa metodologia necessita de alto investimento.

Para resolver tal problema uma alternativa é a introdução de cepas que infectam naturalmente os mosquitos, ou seja, é mais viável introduzir linhagens de *Wolbachia* pré-adaptadas (estabelecidas relações simbióticas em ambientes naturais) a novos hospedeiros (BALDO *et al.*, 2006). Essa estratégia possibilita aperfeiçoar novas transfecções em espécies novas de inseto alvo (MCMENIMAN *et al.*, 2009). Estudos desse tipo permitem também rastrear cepas de espécies taxonomicamente próximas, aumentando a probabilidade de sucesso na transfecção.

Assim, as cepas que infectam naturalmente os mosquitos são mais adequadas nesse tipo de metodologia de controle vetorial e por isso estudos de infecção são tão valiosos. Além de revelar os limites da infecção natural, permitem conhecer quais a cepa tem maior probabilidade de manter uma simbiose e se fixar nas populações, por intermédio da incompatibilidade citoplasmática. Tais estudos, também permitem evitar problemas ecológicos irreparáveis devido a introdução de cepas inadequadas em uma população de insetos alvo e conseqüentemente levar ao colapso de uma espécie que pode causar danos numa cadeia ecológica (OSEI-POKU *et al.*, 2012).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Diagnosticar a ocorrência da infecção natural de mosquitos por cepas/espécies de *Wolbachia* no Estado do Maranhão.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar a taxa de infecção por *Wolbachia* em diferentes espécies;
- Comparar as frequências de infecção natural entre gêneros e espécies de mosquitos;
- Classificar a bactéria de acordo com seu super grupo e subgrupos (cepas).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Descrição da área de estudo

Os mosquitos foram coletados em ambientes urbanos e rurais de diversas áreas representativas no Estado do Maranhão. A sua localização fica a oeste do nordeste do Brasil entre  $01^{\circ} 01' \text{ e } 10^{\circ} 21' \text{ S}$  e  $41^{\circ} 48' \text{ e } 48^{\circ} 50' \text{ W}$  e cobre uma área de  $328.630 \text{ km}^2$ , ou  $3,86\%$  da área total do Brasil. Possui um litoral de  $640 \text{ km}$  e compartilha fronteiras com os estados do Piauí a leste ( $1365 \text{ km}$ ), Pará a oeste ( $798 \text{ km}$ ) e Tocantins a sudoeste ( $1.060 \text{ km}$ ). A cobertura vegetal original do estado é representada pela floresta sazonal, floresta ombrófila, cocal (palmeira de babaçu), restinga e o cerrado (REBÊLO et.al 2010 *apud* IBGE,1984).

Os municípios selecionados para esse estudo foram Chapadinha (Lat:  $3^{\circ}44'29.49''\text{S}$ /Log: $43^{\circ}21'36.35''\text{O}$ ), Godofredo Viana (Lat: $1^{\circ}24'57.51''\text{S}$ /Log: $45^{\circ}46'18.46''\text{O}$ ), Pastos Bons ( Lat:  $6^{\circ}35'57.11''\text{S}$ /Log:  $44^{\circ}5'12.65''\text{O}$ ), São José de Ribamar (Lat:  $2^{\circ}32'58.68''\text{S}$  /Log: $44^{\circ}4'9.08''\text{O}$ ), São Luís (Lat:  $2^{\circ}37'36.80''\text{S}$ / Log:  $44^{\circ}16'13.45''\text{O}$ ) e Vitória do Mearim (Lat: $3^{\circ}27'36.96''\text{S}$  /Log: $44^{\circ}52'20.66''\text{O}$ ) (Figura 1.).

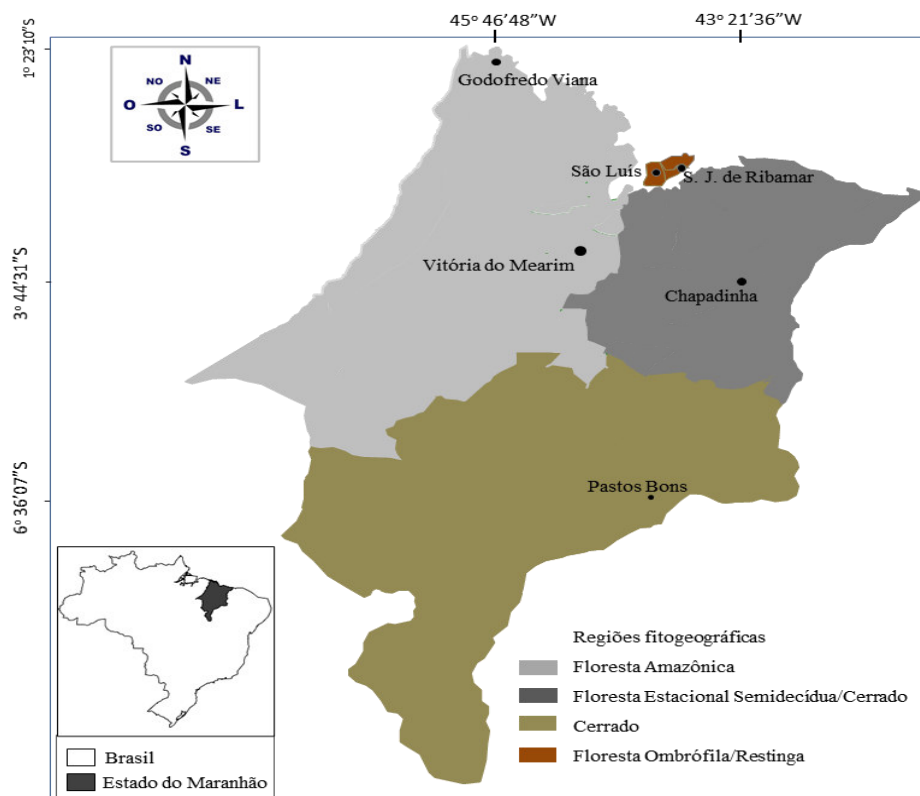


Figura 3- Mapa do Estado do Maranhão com a localização geográfica das áreas de coleta. Fonte: (SES-MA).

## 4.2. Coleta e identificação dos Mosquitos

Os mosquitos foram coletados mensalmente de março de 2018 a dezembro de 2019. No geral, os métodos de captura foram semelhantes àqueles utilizados por Forattini (2002 e Lourenço-de-Oliveira (1984). Os adultos foram capturados nas áreas florestais com o uso de armadilhas luminosas do tipo CDC penduradas nos ramos das árvores a 1,5 m de altura do solo, das 18:00h às 6:00h de forma ininterrupta. Em cada município, foram instaladas entre 3 a 6 armadilhas CDC, com distância variada de 50 a 100 metros. No município de Godofredo Viana a barraca de Shannon foi instalada das 19:00h às 23:00h. Os ovos e larvas foram coletados com a utilização de ovitrampas e sapucaias, instaladas preferencialmente próximas a tocas de animais silvestres (mata) e animais domésticos (galinheiros, chiqueiros, estábulos e currais) nos ambientes peridomésticos, durante 5 dias consecutivos, em todas as áreas estudadas (Figura 4).

Os insetos adultos foram transportados ao Laboratório de Entomologia e Vetores (LEV) e identificados ao nível de espécie com auxílio de lupa e microscópio óptico seguindo as chaves de identificação proposta de Consoli & Oliveira (1994) e Forattini (2002). As formas imaturas foram criadas até a forma adulta. Todos os insetos foram sacrificados com Acetato de etila e posteriormente identificados. Em seguida, os insetos foram colocados em microtubos (*Eppendorfs* de 1,5 ml) contendo álcool 70% e acondicionados em freezer (-20°C) para posterior extração do DNA.

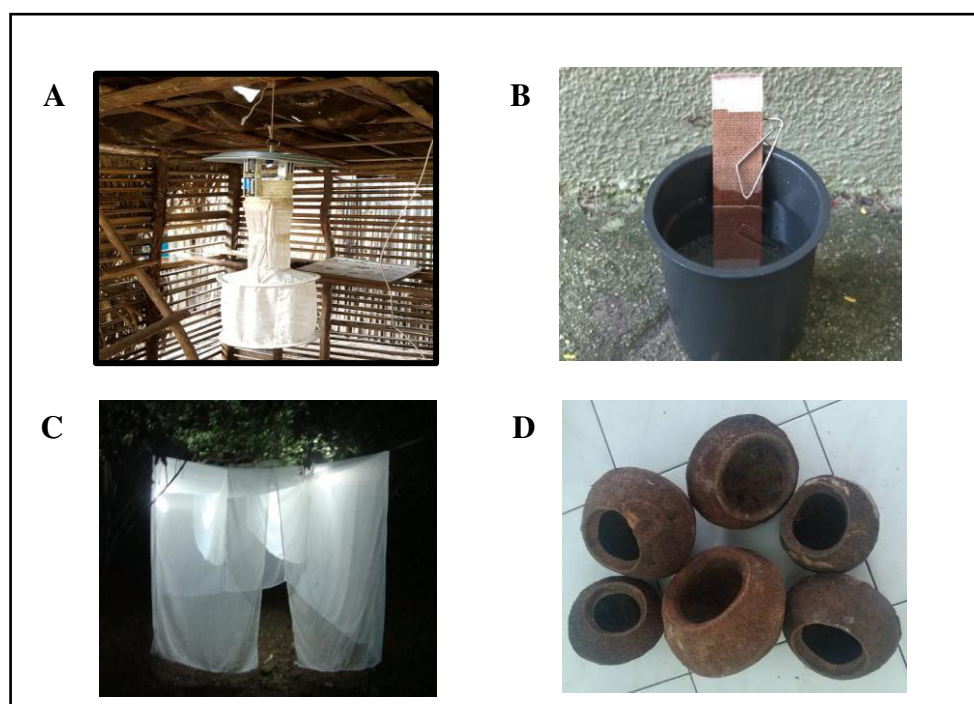


Figura 4- Armadilhas utilizadas para durante a coleta dos mosquitos. A- armadilha CDC- HP.B- Ovitrapas com eucatex. C- Barraca de Shannon. D-Sapucaias

### 4.3. Extração do DNA dos mosquitos

O DNA total dos mosquitos foi extraído individualmente por meio do protocolo de Sambrook & Russell (2001), com algumas pequenas modificações: Foi distribuído 100 µl de tampão de lise (NaCl 5 M, EDTA 25 mM, SDS 0,5%, Tris-HCl 100 mM e H<sub>2</sub>O pH 7) em tubos (Eppendorf) de 1,5ml. Cada espécime foi colocado em um tubo individual, em seguida, os mosquitos foram macerados com pistilos. Depois dessa etapa, foi acrescentado 5µl de proteinase K e agitado em vórtex ( modelo IKA) por 10-15s, seguido de incubação *overnight* em banho-maria a 55°C, das 18:00 às 9:00 da manhã do dia seguinte. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 100µl de Fenol/Clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Uma vez terminada essa etapa, o sobrenadante (100 µl) foi transferido para um novo tubo. Depois foi adicionado 200µl de etanol absoluto gelado e 10 µl de Acetato de Sódio e novamente as amostras foram incubadas em *freezer -20°C overnight*, por no mínimo 12 horas durante a noite, para a precipitação do DNA. No terceiro dia da extração de DNA, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 12000 rpm, a 4°C e o sobrenadante foi descartado e novamente foi lavado o DNA adicionado-se 200µl de etanol 70% gelado e homogeneizado cada amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C e descartado o álcool. Os tubos foram levados para incubação em estufa (Eppendorf), por no mínimo 4 horas a 37°C, até que todo álcool evaporasse. Foi adicionado em cada tubo 40 µl de TE (Tris-HCl, EDTA) e incubado em banho-maria por uma hora a 37°C para precipitação do DNA. Por fim, cada amostra foi estocada em *freezer -20°C*.

### 4.3 Quantificação e qualificação do DNA

Após a extração, a solução resultante foi quantificada e qualificada no equipamento espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 por meio de análise de absorbância (260/280 nm) a fim de verificar a integridade e a existência de possíveis contaminantes. Dessa forma, foi inserido 1 µl de DNA contido na amostra extraída no equipamento. Os parâmetros foram checados e utilizados para validar a quantificação e qualificação pela amplificação do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (*COI*) por meio de Reação da Cadeia de Polimerase (PCR), seguindo protocolos semelhantes, com uso do Fenol/clorofórmio na extração de mosquitos (GUPTA, PREET, 2012; BARIK, *et. al* 2013, SARMA *et al.*, 2014). Dessa forma, foram utilizados os iniciadores que amplificam um fragmentos entre 650-700 pares de base (pb) : LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACC



AAAAATCA-3') desenhados por Folmer et al. (1994), seguindo as mesmas temperaturas de amplificação.

Para verificar o sucesso da reação, o produto amplificado foi aplicado em gel de agarose a 1%, num volume de 100 ml de gel com tampão de Tris- borato-EDTA 1X (TBE), abrangendo uma superfície de 11 cm x 14 cm, e, uma espessura de 8 mm. Cada amostras recebeu 2µl de DNA e 1 µl de corante GelRed™. A eletroforese foi realizada a 90 V, entre 25 a 30 minutos. Os géis foram observados em transluminador de luz UV para a visualização do DNA e posteriormente fotografados (Figura 3). Dessa forma, de 30 espécimes, apenas 1 apresentou bandas com qualidade média.



Figura 5-Gel (A e B) de agarose 1% para verificação de extração do DNA genômico. Amplificação do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) de mosquitos.

#### 4.4 Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) para Detecção de *Wolbachia*

Utilizou-se dois marcadores moleculares para detecção da infecção por *Wolbachia* que amplificam um fragmento de seja, *Wsp* com os iniciadores: *wsp81F* (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') e *wsp691R* (5'-AAAAATTAACGCTACTC CA-3') desenhados por Zhou et al. (1998) que amplifica fragmentos entre 590 a 632 pb e seguindo as condições propostas por Carvajal et al. (2019). A identificação dos supergrupos ocorreu com primers específicos segundo as recomendações de Zhou et al. (1998) que resulta em fragmentos entre 446 a 560 pb.

A amplificação por PCR do DNA de *Wolbachia* foi realizada em um termociclador com o seguinte protocolo de reação: Tampão 10× *buffer* (PROMEGA), MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTPs (10

mM cada), iniciadores de sequência *forward* e *reverse* 20  $\mu$ M, e 1 unidade da polimerase *Taq* DNA (PROMEGA), conforme apresentado na tabela 1. Cada conjunto de reação foi colocado em tubo de 0,2 ml, com o controle positivo DNA extraído de um pool (5 espécimes) de *Culex quinquefasciatus* e controle negativo foi mix da reação substituindo o DNA dos mosquitos por água ultrapura.

Tabela. 1 Componentes da reação de PCR

Reagentes	Concentração	Volumes ( $\mu$ l)
Tampão	10X	2,0
MgCl	25 mM	2,0
Dntp	10 mM	0,5
Primer1	20 $\mu$ M	0,5
Primer2	20 $\mu$ M	0,5
Taq polimerase	1 U	0,5
DNA (amostra)	--	1,0
Água <i>miliq</i>	--	13,0
TOTAL		20,0

#### 4.6 Análise de dados

Os dados foram tabulados no programa planilha do excel 2010 e a taxa de infecção natural (TN) foi estimada como descrito por Paiva et al. (2006), o que corresponde ao número de amostras positivas x 100/número total de insetos amostrados. A comparação das frequências de infecção entre os gêneros de mosquitos foi realizada, utilizando-se o teste estatístico  $\chi^2$  (Qui-quadrado) no programa R versão i386 3.6.2.

## 5. RESULTADOS

Os indivíduos que foram positivos para infecções por *Wolbachia* exibiram faixas referentes ao fragmento de *Wolbachia* específicos *Wsp* de aproximadamente 610 pb (Figuras 6). Os fragmentos para os Supergrupos A e B amplificaram um fragmento de aproximadamente 555 pb e 441 pb, respectivamente (Figura 7-8).

No total, 448 espécimes de culicídeos representando 21 espécies e 6 gêneros de culicídeos foram analisados (Tabela 2). O detalhamento dos resultados quanto à condição de infecção para cada espécie, gênero, municípios, o número de indivíduos examinados, supergrupos e subgrupo de *Wolbachia* são apresentados na Tabela 3.

No geral, a taxa de infecção foi de 17%. Das quais das 18 espécies analisadas, 7 foram positivas (35%). Não foi possível a identificação taxonômica em nível de espécie para: *An. (Nyssorhynchus) spp.* e *Cx. (Melanoconion) spp.*; Dessa forma, o número de espécies infectadas pode ser ligeiramente maior do que o relatado. Dos 8 gêneros examinados 4, resultaram em positivos (50%). A taxa de infecção para o gênero *Culex* (38%) foi maior que *Aedes* (27%), seguido de *Coquillettidia* (23%) e *Anopheles* (2,5%) (Tabela 4). Essas diferenças foram estatisticamente significativas ( $X^2 = 23,89$ ; gl 4;  $P < 0,01$ ).

A positividade média nos gêneros foi de 18 % (74/411), com uma variação entre as espécies de 4 % a 80% conforme apresentado na Tabela 3. Em relação à variação da positividade entre as espécies, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* foram as que apresentaram as maiores frequências dentre os infectados, com 72 % e 80%, respectivamente (Tabela 3), para as linhagens A e B (Tabela 4).

Tabela 2. Espécies, gêneros e subgêneros de mosquitos infectados por *Wolbachia* no Estado do Maranhão, Brasil.

Gênero (Subgênero) Espécie	Número examinados	Status no Maranhão
<b><i>Aedes (Stegomyia)</i></b>		
<i>Ae. aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	46	-
<i>Ae. albopictus</i> (Skuse, 1894)	32	+
<b><i>Aedes (Ochlerotatus)</i></b>		
<i>Ae. scapularis</i> (Rondani, 1848)	8	+
<b><i>Aedes (Howardina)</i></b>		
<i>Ae. fulvithorax</i> (Lutz, 1904)	1	-
<b><i>Anopheles (Nyssorrhynchus)</i></b>		
<i>An. argyritarsis</i> Robineau-Desvoidy, 1827	30	-
<i>An. albitarsis s.l.</i>	23	-
<i>An. aquasalis</i> Curry, 1932	32	-
<i>An. darlingi</i> Root, 1926	8	-
<i>An. evansae</i> Brèthes, 1926	6	-
<i>An. (Nyssorrhynchus) spp.</i>	75	+
<i>An. trianullatus</i> (Neiva & Pinto, 1922)	14	-
<i>An. goeldi</i> Rozeboom & Gabaldon, 1941	7	-
<b><i>Culex (Anoedioporpa)</i></b>		
<i>Cx. conservator</i> Dyar & Knab, 1906	2	-
<b><i>Culex (Culex)</i></b>		
<i>Cx. quinquefaciatus</i> (Say, 1823)	45	+
<b><i>Culex (Melanoconion)</i></b>		
<i>Cx. Melanoconion spp.</i>	53	+
<b><i>Coquillettidia (Rhynchotaenia)</i></b>		
<i>Cq. juxtamansonia</i> (Chagas, 1907)	15	+
<i>Cq. venezuelensis</i> (Theobald, 1912)	15	+
<b><i>Toxorhynchites (Lynchiella)</i></b>		
<i>Tx. haemorrhoidalis</i> (Fabricius, 1787)	8	-
<b><i>Wyeomyia (Wyeomyia)</i></b>		
<i>Wy. arthrostigma</i> (Lutz, 1905)	3	-
<b><i>Wyeomyia (Subgênero incerto)</i></b>		
<i>Wy. melamocephala</i> Dyar & Knab, 1906	25	-
<b>TOTAL</b>	<b>448</b>	

Legenda: Espécies positivas (+) e negativas (-) para infecção por *Wolbachia*.

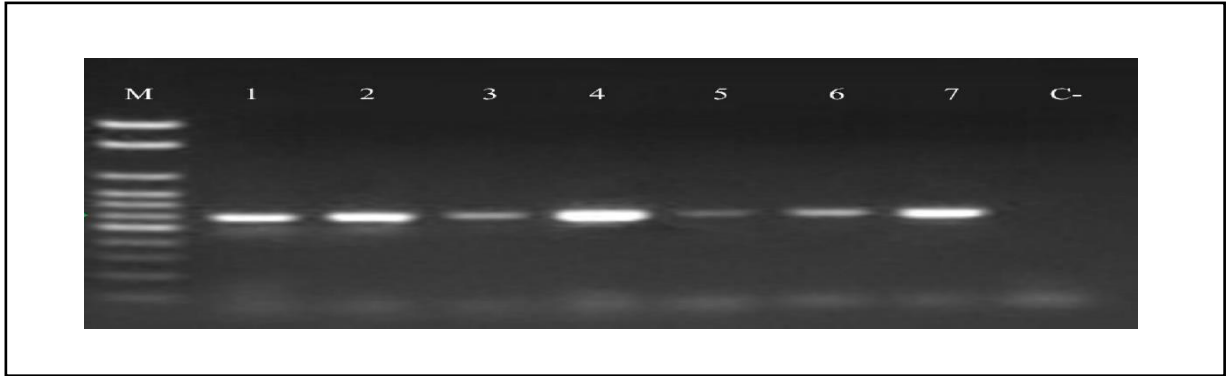


Figura 6-Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *Wsp* nas diferentes espécies de mosquitos. *Legenda:* M – marcador de peso molecular (100pb, Promega); 1 – *An. (Nys.)*; 2 – *Cx. quinquefasciatus*; 3 – *Ae. scapularis*; 4 – *Cx. (Mel.) spp*; 5 – *Cq. juxtamansonia* ; 6 – *Cq. venezuelensis*; 7 – Controle positivo (*Ae. albopictus*); C- – Controle negativo.

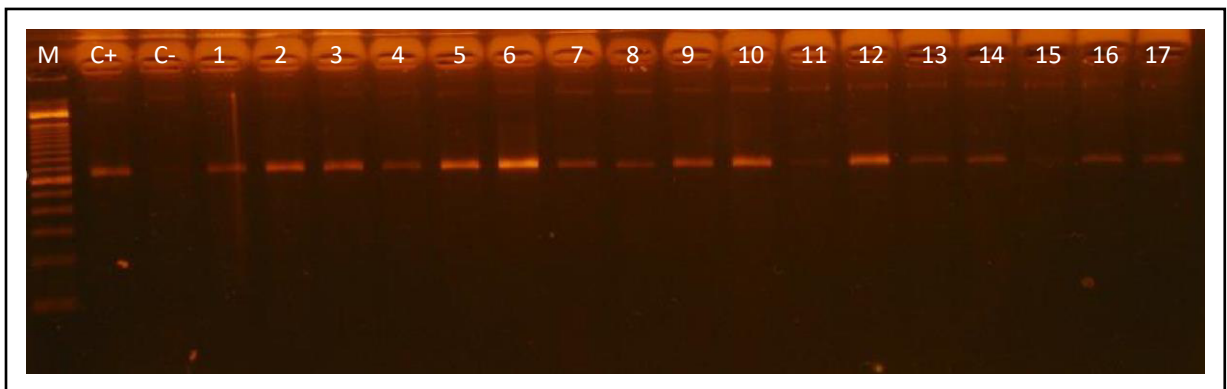


Figura 7- Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *Wsp* Super Grupo A. *Legenda:* M – marcador de peso molecular (100 pb, Promega); C+ Controle positivo (*Ae. albopictus*); Controle negativo; 1-17: Amostras positivas de mosquitos (Diptera: Culicidae) infectados por *Wolbachia*.

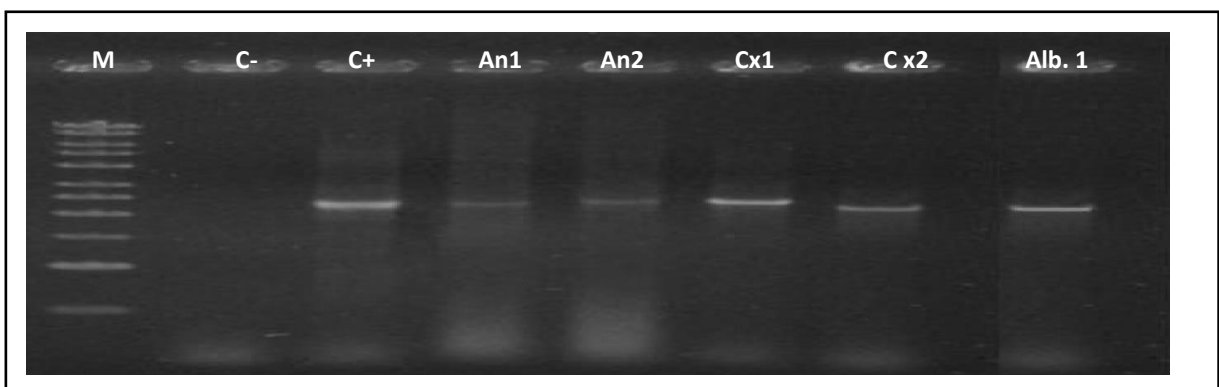


Figura 8- Gel de agarose (1%) dos produtos de PCR para o gene *Wsp* Super Grupo B. *Legenda:* M – marcador de peso molecular (100 pb, Promega); C- Controle negativo; C+ Controle positivo (*Ae. albopictus*); An1-An2: *An. (Nys) spp*. Cx.1–Cx.2: *Cx. quinquefasciatus*; Alb 1: *Ae. albopictus*.

Tabela 3. Espécies, municípios, taxa de infecção e supergrupos de *Wolbachia* detectados em mosquitos (Culicidae) no Estado do Maranhão, Brasil.

Espécie	São Luís	Vitória do Mearim	Chapadinha	Pastos Bons	Godofredo Viana	São José de Ribamar	Examinados	Positivos	Taxa % de Infecção	Supergrupos de <i>Wolbachia</i>	Subgrupos de <i>Wolbachia</i>
<i>Ae. (Stg.) aegypti</i>	34	0	0	0	0	12	46	0	0	-	
<i>Ae. (Stg.) albopictus</i>	22 (17)	5 (2)	0	0	0	5 (4)	32	23	72%	A/B	AlbA/AlbB
<i>Ae. (Nys.) scapularis*</i>	0	8 (1)	0	0	0	0	8	1	12,50%	A	AlbA
<i>An. (Nys.) argyritarsis</i>	0	2	7	0	21	0	30	0	0	-	-
<i>An. (Nys.) albitarsis</i> s.l.	0	23	0	0	0	0	23	0	0	-	-
<i>An. (Nys.) aquasalis</i>	11	0	0	0	21	0	32	0	0	-	-
<i>An. (Nys.) darlingi</i>	0	8 (6)	0	0	0	0	8	0	0	-	-
<i>An. (Nys.) evansae</i>	0	0	6	0	0	0	6	0	0	-	-
<i>An. (Nys.) spp.</i>	0	33	4	4	34 (5)	0	75	5	7%	B	N.i
<i>An. (Nys.) trianullatus</i>	0	5	4	0	5	0	14	0	0	-	-
<i>An. (Nys.) goeldii</i>	0	4	3	0	0	0	7	0	0	-	-
<i>Cx. (Cux.) quinquefasciatus</i>	24 (19)	0	0	0	8 (6)	13 (11)	45	36	80%	B	Pip
<i>Cx. (Mel.) spp.</i>	26 (1)	15 (1)	0	7	0	5	53	2	4%	A	AlbA
<i>Cx. (And.) conservator</i>	0	0	0	2	0	0	2	0	0	-	-
<i>Ae. (How.) fulvithorax</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	-	-
<i>Cq. (Rhy.) juxtamansonia*</i>	0	12 (4)	0	3	0	0	15	4	26%	A	AlbA
<i>Cq. (Rhy.) venezuelensis*</i>	0	15 (3)	0	0	0	0	15	3	20%	A	AlbA
<i>Tx. (Lyn.) haemorrhoidalis</i>	8	0	0	0	0	0	8	0	0	-	-
<i>Wy. (Wyo.) arthrostigma</i>	0	0	0	3	0	0	3	0	0	-	-
<i>Wy. melanocephala</i>	0	0	0	25	0	0	25	0	0	-	-
<b>Total</b>							<b>448</b>	<b>74</b>	<b>17%</b>		

Legenda: \*Primeiros registros da infecção por *Wolbachia* em mosquitos no Brasil. Entre parênteses, número de mosquitos infectados. N.i = Não Identificado.

A classificação de *Wolbachia* dentro dos maiores grupos A e B mostrou que 4 das 7 espécies positivas foram infectadas somente com bactérias do supergrupo A, 2 espécies pelo supergrupo B (*Cx. quinquefasciatus* e *An. (Nyssorhynchus) spp.*) e uma coinfetada por ambos os supergrupos A e B, representada pela espécie *Ae. albopictus*. Com base no número total de espécies infectadas (7-20) 57 % foram positivas para o supergrupo A (4/7); 29 % somente para o supergrupo B (2/7) e 14,2% (1/6) para a dupla infecção dupla A-B *Wolbachia* (Tabela 4).

Tabela 4. Supergrupos e taxas de infecções de *Wolbachia* para os mosquitos dos gêneros de Culicidae no Estado do Maranhão, Brasil.

Gêneros	Números examinados	Números positivos	Taxa de infecção para os gêneros	Supergrupo
<i>Aedes</i>	86	24	27 %	A/B
<i>Anopheles</i>	195	5	2,5 %	B
<i>Culex</i>	100	38	38 %	B
<i>Coquillettidia</i>	30	7	23%	A
Total	411	74	18%	

Estatisticamente significativas ( $\chi^2 = 23,89; gl 4; P < 0,01$ ).

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo revelou novos registros de infecção por *Wolbachia* em espécies de mosquitos do Brasil, que até então não haviam sido estudadas, e confirmou a infecção em espécies sabidamente já positivas. A variação da infecção na natureza é comum e está condicionada a diversos fatores tais como ecológicos e genéticos. Dessa forma, a penetrância da infecção e fixação nas espécies e populações sofre variações em diversos grupos de insetos. (OLIVEIRA et.al 2015). Como resultado, há espécies com alta frequência de infecção, espécies super infectadas, ou baixa com frequência na natureza. Várias populações de mosquitos já foram analisadas para estimar a infecção por *Wolbachia* em diferentes continentes, sendo que as taxas encontradas são bem variáveis, tanto intra quanto interespecificamente (BALDINI *et al.*, 2014; SONI *et al.*, 2017; BALDINI *et al.*, 2018; BASSENE *et al.*, 2018; SAWASDICHAI *et al.*, 2019).

Kittayapong et. al. (2000), testaram a presença do simbiote em 1.367 indivíduos, pertencentes a oitenta e nove espécies de mosquitos da Tailândia, e encontraram taxas de infecção de 28,1% nas populações. Nugapola *et al.* (2017) examinaram 22 espécies em Sri Lanka na Índia e encontraram uma taxa de infecção de 26,36%. Osei-Poku *et al.* (2012) detectaram 20,6% de mosquitos no Quênia, na África, infectados com o parasita. Neste estudo, os valores da infecção natural encontram-se baixos (17%) se comparados aos obtidos nesses e outros trabalhos (WIWATANARATANABUTR, 2013; RAHARIMALALA *et al.*, 2015).

No entanto, em análises de taxas de infecção por *Wolbachia*, tanto subestimativas quanto superestimativas podem ocorrer. A primeira poderia acontecer porque nem todas as populações e determinada espécie estão infectadas (WIWATANARATANABUTR, 2013, SAWASDICHAI *et al.*, 2019), ou porque indivíduos infectados e não infectados geralmente coexistem na mesma população, como foi descoberto recentemente em populações de *Ae. aegypti* (KITAYAPONG *et al.*, 2000, KULKARNI *et al.*, 2019). As superestimativas poderiam ser resultado de um erro amostral no qual populações ou espécies mais permissibilidade para a infecção são mais frequentemente amostradas e também como produto de falsos positivos em análises de PCR (WIWATANARATANABUTR, 2013; HONG, GOTOH, NODA, 2002). Além disso, as variações encontradas podem ocorrer devido a diferenças geográficas na prevalência, na história da infecção, no tipo de linhagem possuída pelo hospedeiro e nos fenótipos ocasionados pela *Wolbachia* (DOBSON, MARSLAND, RATTANADECHAKUL, 2002, TORTOSA *et al.*, 2010, SAWASDICHAI *et al.*, 2019). Esses



são os efeitos deletérios sobre o hospedeiro amplamente discutidos na literatura (WERREN, 2007; WERREN, BALDO, CLARK, 2008)

Apesar dessas questões relativas à subestimativas, *Wolbachia* pode simplesmente não estar presente em uma determinada população (ou espécie) (GLORIA-SORIA, CHIODO, POWELL, 2018). A ausência da bactéria em algumas espécies poderia ser explicada porque a mesma nunca teria infectado as populações amostradas, ou porque algum mecanismo evolutivo ou ecológico mantém a taxa e densidade de infecção a baixos níveis, o que diminuiria as chances de coletar indivíduos infectados ou mesmo serem detectados por PCR (WIWATANARATANABUTR, KITTAYAPONG, 2009, CHROSTEK, TEIXEIRA, 2015; KULKARNI *et al.*, 2019).

No primeiro caso, seria provável que nenhum agente transmissor da bactéria teria entrado em contato com tais populações, ou mesmo que tivesse, tal contato não seria suficiente para consumir a transmissão horizontal. No segundo caso os fatores envolvidos seriam muitos, tais como: condições ambientais (STAHLHUT *et al.*, 2010), transmissão vertical ineficiente (DOBSON, 2002), condições demográficas estocásticas (STRUNOV, KISELEVA. GOTTLIEB, 2013), os quais poderiam diminuir o avanço do simbiote dentro e entre as populações ou mesmo eliminar a bactéria da população hospedeira.

Com relação às espécies com altas taxas de infecção (super infectadas) por *Wolbachia*, *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus*, já era esperado. Essas duas espécies podem ser estudadas no futuro com objetivo de avaliar a influência da *Wolbachia* no ciclo de vida, assim como a variabilidade genética das populações simpátricas do Maranhão. Já foi observado que os mosquitos *Culex* livres de infecção possuem baixa diversidade genética, mesmo para um gene conservado como o mitocondrial (ATYAME *et al.*, 2011), assim como a espécie *Ae. albopictus* infectada por *Wolbachia* (TORTOSA *et al.*, 2010).

As cepas do super grupo B, wPip principalmente relacionada ao mosquitos do Complexo Pipiens *de Culex*, têm uma evolução única com hospedeiros desse grupo (ATYAME *et al.*, 2011). Tais linhagens possuem uma relação de coevolução estabelecida recentemente, além de alta taxa de mutações que permite que a bactéria *Wolbachia* adapte-se e influencie a evolução do hospedeiro. Isso aumenta sua frequência e fixação, por meio da incompatibilidade citoplasmática (WERREN, BANDO CLARCK 2008; ATYAME *et al.*, 2011).

Já as cepas do supergrupo A não possuem alta variabilidade genética. Além disso, essa linhagem é sensível a variações de temperatura, quando comparadas à linhagem B (WIWATANARATANABUTR, KITTAYAPONG, 2009). Assim, frequentemente, hospedeiros que estejam infectados com as cepas da linhagem A terão baixa densidade e coevolução.

O mesmo ocorre em espécies livres da infecção (TORTOSA *et al.*, 2010, ATYAME *et al.*, 2011).

A presença ou não das cepas de *Wolbachia* está diretamente relacionado à densidade bacteriana e na transmissão materna imperfeita e/ou na perda da infecção. Por exemplo, o aumento desta densidade pode levar a efeitos patológicos e por consequente, danos ao *fitness* do hospedeiro, ou seja, alteração do seu comportamento, desde a oviposição até a longevidade (DOBSON *et al.*, 1999; MCGRAW *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2019). Assim, para que ocorra uma endossimbiose tanto o hospedeiro quanto a *Wolbachia* devem encontrar um “equilíbrio” que ocorre por mutações em genes específicos. Isso permite que a bactéria possa ser transmitida às gerações seguintes (ATYAME *et al.*, 2011, KULKARNI *et al.*, 2019).

Nesse estudo, a princípio, não detectamos a infecção na espécie *Ae. aegypti*, e inicialmente, em mosquitos anofelinos do subgênero *Nyssorhynchus*. No entanto, após aumentarmos o N amostral foi possível a confirmação da infecção em anofelinos. Dessa forma, a associação de métodos como PCR convencional, PCR em Tempo Real (qPCR), de diferentes formas de coleta (ovitampas, barracas de Shannon entres outros) permite ampliar N amostral e a probabilidade de encontrar espécimes positivos. Foi bem evidente no estudo de Oliveira *et al.*, 2015 que os primers usados para qPCR em tempo real (*wsp* e *ftsZ*) mostraram um maior número de amostras positivas do que PCR convencional (usando o conjunto de primer 16S rRNA), devido a maior sensibilidade fornecida pela qPCR.

Inicialmente vários outros estudos não detectaram a infecção em *Ae. aegypti* (KITAYAPONG, 2000; GLORIA-SORIA, CHIODO, POWELL, 2018). No entanto, outros estudos, observaram DNA de *Wolbachia* em larvas de mosquitos como em Jacksonville, Flórida, em junho de 2014 (COON, BROWN, STRAND, 2016), na Tailândia (THONGSRIPONG *et al.*, 2017), na Malásia (TEO. *et al.*, 2017), em Houston, Texas (HEGDE *et al.*, 2018). Recentemente estudos mais detalhados na Flórida (EUA), no Novo México (KULKARNI *et al.*, 2019) e Filipinas (CARVAJAL *et al.*, 2019) verificaram que esse vetor pode se infectar naturalmente com as cepas *walbB* do super grupo B.

Nesses dois últimos trabalhos, os autores defendem que a detecção nessa espécie é mais difícil devido à baixa densidade da bactéria no corpo do mosquito (CARVAJAL *et al.*, 2019; KULKARNI *et al.*, 2019). O mesmo ocorre em mosquitos anofelinos (SHAW *et al.*, 2016, BALDINI *et al.*, 2018) e outros insetos (AHANTARIG *et al.*, 2008; UNCKLESS *et al.*, 2009). A baixa densidade bacteriana pode ter influenciado o resultado da PCR. Em nosso estudo, observamos que algumas amostras deixavam uma pequena banda de fragmentos de DNA, muito difíceis de ver. Dessa forma, ampliamos o número de amostras de anofelinos da região

de Godofredo Viana e obtivemos a confirmação da infecção. Assim, estudos futuros podem ser executados com metodologia proposta por Carvajal *et al.* (2019) e Kulkarni *et al.* (2019), como por exemplo, a formação de pool de mosquitos em um único tubo (durante a extração de DNA) possam ser alternativas para aumentar a densidade da bactéria e juntamente com o uso de qPCR em Tempo Real possam aumentar a probabilidade de detecção da *Wolbachia*.

Tais metodologias foram fundamentais para a detecção da infecção em mosquitos anofelinos. Os primeiros estudos afirmavam que esses mosquitos eram fisiologicamente inaptos para suportar a endossimbiose na natureza (KITAYAPONG *et al.* 2000; WIWATANARATANABUTR 2013), no entanto, na África, Baldini *et al.*, (2014) e depois outros pesquisadores detectaram a infecção para diversas espécies pertencentes ao subgênero *Cellia*: *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. coluzzii*, *An. funestus*, *An. minimus*, *An. maculatus*, *An. sawadwongporni*, *An. pseudowillmori*, *An. dirus* e *An. baimaii* (BALDINI *et al.*, 2014, 2018; SHAW *et al.*, 2016, BASSENE *et al.*, 2018, SAWASDICHAI *et al.*, 2019).

No Brasil, até onde sabemos, dois estudos avaliaram a infecção natural por *Wolbachia* em mosquitos (PASSOS, 2011, DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). No estudo de Passos (2011), detectou-se a infecção nas *An. (Anopheles) matogrossensis*, *An. (Ano.) mediopunctatus*, *An. (Ano.) shannoni*, *An. (Lophopodomyia) squamifemur* e *An. (Nyssorhynchus) oswaldoi*. Nesse estudo, também obtivemos o diagnóstico para os representantes do complexo *An. (Nyssorhynchus) spp.* No entanto, não conseguimos atingir o nível de espécie, visto que muitos desses espécimes perderam as patas ou escamas, que pudessem confirmar a identificação entomológica. Assim, mosquitos dos subgêneros *Anopheles*, *Cellia*, *Lophopodomyia* e *Nyssorhynchus* são fisiologicamente permissivos para suportar a infecção por *Wolbachia* em ambientes naturais.

No entanto, parece que os subgêneros *Anopheles* e *Cellia* são mais competentes para manter essa relação (BALDINI *et al.*, 2018, BASSENE *et al.*, 2018, SAWASDICHAI *et al.*, 2019). Não está bem certo os padrões que governam essa relação endossimbiótica mas é fundamental entender as interações entre mosquito-*Wolbachia*. Isso pode revelar os diferentes eventos que estariam envolvidos na transferência horizontal em um tempo evolutivo maior, nas possíveis diferenças fisiológicas na capacidade dos mosquitos em alojar a infecção ou, pode ser uma relíquia biogeográfica da evolução entre *Wolbachia* e os mosquitos (RASGON SCOTT, 2004). Além disso, o conhecimento das cepas que infectam tais mosquitos pode auxiliar no controle da malária (KITAYAPONG *et al.*, 2000; RICCI *et al.*, 2002; BALDINI *et al.*, 2018; BASSENE *et al.*, 2018; SAWASDICHAI *et al.*, 2019).

Nesse estudo utilizamos iniciadores específicos para determinar as cepas de *Wolbachia*, no entanto, para a infecção em anofelinos não obtivemos sucesso. Além desse problema, não conseguimos atingir o nível de espécie sendo necessário novas metodologias, visto que nem sempre a identificação é facilmente resolvida como chaves entomológicas. Aqui sugerimos que os estudos futuros utilizem Taxonomia molecular como o gene COI (*DNA Barcoding*) para determinar as espécies, também o sequenciamento do fragmento Wsp para identificar as cepas de *Wolbachia* no GenBank.

## 7. CONCLUSÕES

- O presente estudo demonstrou por meio de Reação em cadeia da polimerase (PCR) que a infecção natural por *Wolbachia* está presente em mosquitos do Maranhão.
- As espécies *Ae. albopictus* e *Cx. quinquefasciatus* possuem super infecção e são as mais indicadas para estudos com objetivo de avaliar a influência da *Wolbachia* no ciclo de vida, assim como, a variabilidade genética das populações simpátricas dessas espécies no Maranhão.
- Assim como mosquitos dos subgêneros *Anopheles*, *Cellia* e *Lophopodomyia*, o subgênero *Nyssorhynchus* também é fisiologicamente permissivo para suportar a infecção por *Wolbachia* em ambientes naturais.
- Novos estudos devem continuar sendo executados para ampliar o entendimento da dinâmica da *Wolbachia*. Principalmente em mosquitos do gênero *Aedes*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHANTARIG, Arunee; TRINACHARTVANIT, Wachareeporn; KITTAYAPONG, Pattamaporn. Relative *Wolbachia* density of field-collected *Aedes albopictus* mosquitoes in Thailand. *Journal of Vector Ecology*, v. 33, n. 1, p. 173-177, 2008.
- ALIOTA, Matthew T. et al. The wMel strain of *Wolbachia* reduces transmission of Chikungunya virus in *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 4, p. e0004677, 2016.
- ALPHEY, L. et al. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis.* v. 10, p. 295–311, 2010.
- ANDREWS, E. S.; XU, G.; RICH, S. M. Microbial communities within field-collected *Culiseta melanura* and *Coquillettidia perturbans*. *Medical and veterinary entomology*, v. 28, n. 2, p. 125-132, 2014.
- ARMBRUSTER, Peter et al. Infection of New-and Old-World *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the intracellular parasite *Wolbachia*: implications for host mitochondrial DNA evolution. *Journal of medical entomology*, v. 40, n. 3, p. 356-360, 2003.
- ATYAME, Célestine M. et al. Diversification of *Wolbachia* endosymbiont in the *Culex pipiens* mosquito. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2761-2772, 2011.
- ATYAME, Célestine M. et al. Diversification of *Wolbachia* endosymbiont in the *Culex pipiens* mosquito. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2761-2772, 2011.
- BALDINI, Francesco et al. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature communications*, v. 5, p. 3985, 2014.
- BALDINI, Francesco et al. First report of natural *Wolbachia* infection in the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in Tanzania. *Parasites & vectors*, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2018.
- BALDO, Laura et al. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, n. 11, p. 7098-7110, 2006.
- BALDO, Laura; WERREN, John H. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. *Current microbiology*, v. 55, n. 1, p. 81-87, 2007.
- BARIK, Sushanta Kumar et al. A simple, rapid and very efficient protocol for DNA isolation from mosquito species. *Protoc Exch*, 2013.
- BASSENE, Hubert et al. First report of natural *Wolbachia* infection in wild *Anopheles funestus* population in Senegal. *Malaria journal*, v. 17, n. 1, p. 1-6, 2018.

BERTICAT, Claire et al. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 269, n. 1498, p. 1413-1416, 2002.

BHATT, Samir et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504, 2013.

BIAN, Guowu et al. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS pathogens*, v. 6, n. 4, p. e1000833, 2010.

BIAN, Guowu et al. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science*, v. 340, n. 6133, p. 748-751, 2013.

BORDENSTEIN, Sarah R.; BORDENSTEIN, Seth R. Temperature affects the tripartite interactions between bacteriophage WO, *Wolbachia*, and cytoplasmic incompatibility. *PloS one*, v. 6, n. 12, 2011.

BOUCHON, Didier; RIGAUD, Thierry; JUCHAULT, Pierre. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 265, n. 1401, p. 1081-1090, 1998.

BREEUWER, J. A. J. et al. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect molecular biology*, v. 1, n. 1, p. 25-36, 1992.

BROWER, John H. Cytoplasmic Incompatibility: Occurrence in a Stored-product Pest *Ephestia cautella*. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 69, n. 6, p. 1011-1015, 1976.

CALLAINI, Giuliano; DALLAI, Romano; RIPARBELLI, Maria Giovanna. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Journal of cell science*, v. 110, n. 2, p. 271-280, 1997.

CAPPELLI, Alessia et al. Asaia activates immune genes in mosquito eliciting an anti-Plasmodium response: implications in Malaria control. *Frontiers in Genetics*, v. 10, p. 836, 2019.

CARVAJAL, Thaddeus M. et al. Detection of *Wolbachia* in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes in metropolitan Manila, Philippines. *Parasites & vectors*, v. 12, n. 1, p. 361, 2019.

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*, v. 151, n. 12, p. 4015-4022, 2005.

CHARLAT, Sylvain; HURST, Gregory DD; MERÇOT, Hervé. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *TRENDS in Genetics*, v. 19, n. 4, p. 217-223, 2003.

CHAVES, T. D. S. S. et al. Yellow fever in Brazil: Epidemiological aspects and implications for travelers. *Travel medicine and infectious disease*, v. 23, p. 1, 2018.

- CHROSTEK, Ewa; TEIXEIRA, Luis. Mutualism breakdown by amplification of *Wolbachia* genes. *PLoS Biol*, v. 13, n. 2, p. e1002065, 2015.
- CLARK, Michael E. et al. The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila*. *Mechanisms of development*, v. 111, n. 1-2, p. 3-15, 2002.
- CONSOLI, Rotraut AGB; DE OLIVEIRA, Ricardo Lourenço. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. SciELO-Editora FIOCRUZ, 1994.
- COON, Kerri L.; BROWN, Mark R.; STRAND, Michael R. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular ecology*, v. 25, n. 22, p. 5806-5826, 2016.
- CROTTI, Elena et al. *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environmental Microbiology*, v. 11, n. 12, p. 3252-3264, 2009.
- DAHMANA, Handi; MEDIANNIKOV, Oleg. Mosquito-Borne Diseases Emergence/Resurgence and How to Effectively Control It Biologically. *Pathogens*, v. 9, n. 4, p. 310, 2020.
- DE ALMEIDA, Fábio, et al. Effects of *Wolbachia* on fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 11.8: 2138-2143, 2011.
- DE AZEVEDO FERNANDES, Natália Coelho Couto et al. Outbreak of yellow fever among nonhuman primates, Espírito Santo, Brazil, 2017. *Emerging infectious diseases*, v. 23, n. 12, p. 2038, 2017.
- DE OLIVEIRA, C. D. et al. Broader prevalence of *Wolbachia* in insects including potential human disease vectors. *Bulletin of entomological research*, v. 105, n. 3, p. 305-315, 2015.
- DHEILLY, Nolwenn Marie. Holobiont–Holobiont interactions: redefining host–parasite interactions. *PLoS Pathog*, v. 10, n. 7, p. e1004093, 2014.
- DOBSON, Stephen L. et al. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 29, n. 2, p. 153-160, 1999.
- DOBSON, Stephen L.; MARSLAND, Eric J.; RATTANADECHAKUL, Wanchai. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics*, v. 160, n. 3, p. 1087-1094, 2002.
- DUMLER, J. Stephen et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.



DURON, O. Never completely trust a model: insights from cytoplasmic incompatibility beyond *Wolbachia*-*Drosophila* interactions. *Heredity*, v. 101, p. 473-474, 2008.

DUTRA, Heverton Leandro Carneiro et al. *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell host & microbe*, v. 19, n. 6, p. 771-774, 2016.

ECHAUBARD, Pierre et al. Rapid evolution of *Wolbachia* density in insecticide resistant *Culex pipiens*. *Heredity*, v. 104, n. 1, p. 15-19, 2010.

EDINGTON, Fernando; VARJÃO, Douglas; MELO, Paulo. Incidence of articular pain and arthritis after chikungunya fever in the Americas: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Joint Bone Spine*, v. 85, n. 6, p. 669-678, 2018.

ERICKSON, Sara M. et al. Mosquito-parasite interactions can shape filariasis transmission dynamics and impact elimination programs. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 9, p. e2433, 2013. *Evolutionary applications*, v. 12, n. 9, p. 1797-1811, 2019.

FAVIA, Guido et al. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 21, p. 9047-9051, 2007.

FAVIA, Guido et al. Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. In: *Transgenesis and the management of vector-borne disease*. Springer, New York, NY, 2008. p. 49-59.

FEGED-RIVADENEIRA, Alejandro et al. Malaria intensity in Colombia by regions and populations. *PLoS One*, v. 13, n. 9, p. e0203673, 2018.

FORATTINI, Oswaldo Paulo. *Culicidologia Médica: Identificação*. *Biologia, Epidemiologia*, v. 2, 2002.

FRANZ, A. W. *et al.* Stability and loss of a virus resistance phenotype over time in transgenic mosquitoes harbouring an antiviral effector gene. *Insect Mol. Biol.* V. 18, P; 661–672, 2009.

FRENTIU, Francesca D. et al. Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 8, n. 2, p. e2688, 2014.

GERTH, Michael. Classification of *Wolbachia* (Alphaproteobacteria, Rickettsiales): no evidence for a distinct supergroup in cave spiders. *BioRxiv*, p. 046169, 2016.

GHELELOVITCH, S. Sur le déterminisme génétique de la sterilité dans Le croisement entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *C. R. Acad. Sci. Paris*. v.24 p. 2386–88, 1952.

GLASER, Robert L.; MEOLA, Mark A. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PloS one*, v. 5, n. 8, p. e11977, 2010.

GLORIA-SORIA, Andrea; CHIODO, Tommaso G.; POWELL, Jeffrey R. Lack of evidence for natural *Wolbachia* infections in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, v. 55, n. 5, p. 1354-1356, 2018.

GLOWSKA, Eliza et al. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: *Syringophilidae*). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 30, p. 140-146, 2015.

GUPTA, Shivani; PREET, Shabad. Protocol optimization for genomic DNA extraction and RAPD-PCR in mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Annals of Biological Research*, v. 3, n. 3, p. 1553-1561, 2012.

HARBACH RE. Mosquito Taxonomic Inventory [internet]. [citado em 15 de março de 2020]. Disponível em: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>.

HEGDE, Shivanand 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*, v. 9, p. 2160, 2018.

HEMINGWAY, Janet et al. Averting a malaria disaster: will insecticide resistance derail malaria control?. *The Lancet*, v. 387, n. 10029, p. 1785-1788, 2016.

HENTSCHEL, Ute; STEINERT, Michael; HACKER, Jörg. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends in microbiology*, v. 8, n. 5, p. 226-231, 2000.

HERRE, Edward Allen et al. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in ecology & evolution*, v. 14, n. 2, p. 49-53, 1999.

HERTIG, Marshall. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, v. 28, n. 4, p. 453-486, 1936.

HERTIG, Marshall; WOLBACH, S. Burt. Studies on rickettsia-like micro-organisms in insects. *The Journal of medical research*, v. 44, n. 3, p. 329, 1924.

HILGENBOECKER, Kirsten et al. How many species are infected with *Wolbachia*?—a statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters*, v. 281, n. 2, p. 215-220, 2008.

HOFFMANN, Ary A. et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, v. 476, n. 7361, p. 454-457, 2011.

HOFFMANN, Ary A.; CLANCY, David; DUNCAN, Jacinta. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity*, v. 76, n. 1, p. 1-8, 1996.

HOFFMANN, Ary A.; TURELLI, Michael; SIMMONS, Gail M. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution*, v. 40, n. 4, p. 692-701, 1986.

HONG, Xiao-Yue; GOTOH, Tetsuo; NODA, Hiroaki. Sensitivity comparison of PCR primers for detecting *Wolbachia* in spider mites. *Applied Entomology and Zoology*, v. 37, n. 3, p. 379-383, 2002.

HUIGENS, M. E. et al. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in Trichogramma wasps. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 271, n. 1538, p. 509-515, 2004.

HUNTER, Martha S.; PERLMAN, Steve J.; KELLY, Suzanne E. A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1529, p. 2185-2190, 2003.

HURST, Gregory DD; JIGGINS, Francis M.; ROBINSON, Sarah JW. What causes inefficient transmission of male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*?. *Heredity*, v. 87, n. 2, p. 220-226, 2001.

JEYAPRAKASH, A.; HOY, M. A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect molecular biology*, v. 9, n. 4, p. 393-405, 2000.

JOSEPH, Hayley et al. First evidence of spatial clustering of lymphatic filariasis in an *Aedes polynesiensis* endemic area. *Acta tropica*, v. 120, p. S39-S47, 2011.

KAGEYAMA, Daisuke; HOSHIZAKI, Sugihiko; ISHIKAWA, Yukio. Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity*, v. 81, n. 3, p. 311-316, 1998.

KAMTCHUM-TATUENE, Joseph et al. The potential role of *Wolbachia* in controlling the transmission of emerging human arboviral infections. *Current opinion in infectious diseases*, v. 30, n. 1, p. 108, 2017.

KARAMI, Mohsen et al. *Wolbachia* endobacteria in natural populations of *Culex pipiens* of Iran and its phylogenetic congruence. *Journal of arthropod-borne diseases*, v. 10, n. 3, p. 347, 2016.

KITTAYAPONG, Pattamaporn et al. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, v. 37, n. 3, p. 340-345, 2000.

KLASSON, Lisa et al. Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group. *Molecular biology and evolution*, v. 25, n. 9, p. 1877-1887, 2008.

KULKARNI, Aditi, et al. *Wolbachia pipientis* occurs in *Aedes aegypti* populations in New Mexico and Florida, USA. *Ecology and evolution*, 9.10: 6148-6156, 2019.

LASSY, Craig W.; KARR, Timothy L. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mechanisms of development*, v. 57, n. 1, p. 47-58, 1996.

- LAVEN, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature*, v. 216, n. 5113, p. 383-384, 1967.
- LAVEN, H. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* v. 24 p.166–73, 1959.
- LAVEN, Hannes. Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution*, v. 5, n. 4, p. 370-375, 1951.
- LE CLEC'H, Winka et al. Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. *PloS one*, v. 8, n. 4, p. e60232, 2013.
- LEDERMANN, Jeremy P. et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 10, p. e3188, 2014.
- LO, N. et al. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 57, n. 3, p. 654-657, 2007.
- LOK, Pat; DIJK, Stijntje. Malaria outbreak in Burundi reaches epidemic levels with 5.7 million infected this year. 2019.
- MACIEL-DE-FREITAS, Rafael et al. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 6, p. 828-829, 2012.
- MARCADÉ, Isabelle et al. Mitochondrial DNA variability and *Wolbachia* infection in two sibling woodlice species. *Heredity*, v. 83, n. 1, p. 71-78, 1999.
- MAVINGUI, Patrick et al. Whole-genome sequence of *Wolbachia* strain wAlbB, an endosymbiont of tiger mosquito vector *Aedes albopictus*. 2012.
- MCGRAW, E. A. et al. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 5, p. 2918-2923, 2002.
- MCMENIMAN, Conor J. et al. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, v. 323, n. 5910, p. 141-144, 2009.
- MERÇOT, Hervé; POINSOT, Denis. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *Comptes rendus biologies*, v. 332, n. 2-3, p. 284-297, 2009.
- MILLER, Wolfgang J.; EHRMAN, Lee; SCHNEIDER, Daniela. Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 12, p. e1001214, 2010.
- MIN, Kyung-Tai; BENZER, Seymour. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 20, p. 10792-10796, 1997.

MORAIS, Sirlei Antunes et al. Low genetic diversity in *Wolbachia*-infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54, n. 6, p. 325-329, 2012.

MORAN, Nancy A.; TELANG, Aparna. Bacteriocyte-associated symbionts of insects. *Bioscience*, v. 48, n. 4, p. 295-304, 1998.

MOREIRA, Luciano A. et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, 2009.

MOREIRA, Marta et al. *Wolbachia* (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) Infections in Isolated Aphid Populations from Oceanic Islands of the Azores Archipelago: Revisiting the Supergroups M and N. *Environmental entomology*, v. 48, n. 2, p. 326-334, 2019.

MORRISON, I., N., et al. Genetic Improvements to the Sterile Insect Technique for Agricultural Pests. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.* v.18 (2), p. 275-295, 2010.  
*Nature communications*, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2016.

NGUYEN, Tran Hien et al. Field evaluation of the establishment potential of wMelPop *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. *Parasites & vectors*, v. 8, n. 1, p. 563, 2015.

NKYA, T., E; et al. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 43 (4). p. 407-416, 2013.

NUGAPOLA, NW Nalaka P.; DE SILVA, WA Priyanka P.; KARUNARATNE, SHP Parakrama. Distribution and phylogeny of *Wolbachia* strains in wild mosquito populations in Sri Lanka. *Parasites & vectors*, v. 10, n. 1, p. 230, 2017.

NWACHUKWU, William E. et al. The response to re-emergence of yellow fever in Nigeria, 2017. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 92, p. 189-196, 2020.

OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 47, n. 1, p. 6-7, 2016.

O'NEILL, Scott L. Cytoplasmic symbionts in *Tribolium confusum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 53, n. 1, p. 132-134, 1989.

OSEI-POKU, Jewelna et al. Identification of *Wolbachia* strains in mosquito disease vectors. *PLoS One*, v. 7, n. 11, p. e49922, 2012.

PAIVA, Byanca Regina de et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Tropica*, v. 99, n. 2-3, p. 252-259, 2006.

PASSOS, Ricardo Augusto dos. Distribuição e diversidade de *Wolbachia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae) em mosquitos (Diptera, Culicidae) no Estado do Amazonas e o efeito do

tratamento com tetraciclina em populações de *Aedes albopictus* Skuse, 1894 mantidas em laboratório. 2011.

PANARAM, Kanchana; MARSHALL, Jeremy L. F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods?. *Genetica*, v. 130, n. 1, p. 53-60, 2007.

POINSOT, Denis; CHARLAT, Sylvain; MERCOT, Herve. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: Confronting the models with the facts. *Bioessays*, v. 25, n. 3, p. 259-265, 2003.

POSSAS, Cristina et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 10, 2018.  
 Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 261, n. 1362, p. 325-330, 1995.

RASGON, Jason L.; SCOTT, Thomas W. An initial survey for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections in selected California mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, v. 41, n. 2, p. 255-257, 2004.

REBÊLO, José M. Macário et al . Distribuição das espécies do gênero *Anopheles* (Diptera, Culicidae) no Estado do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro , v. 23, n. 12, p. 2959-2971, Dec. 2007.

REBÊLO, José Manuel Macário et al. The fauna of phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in different phylogeographic regions of the state of Maranhão, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 54, n. 3, p. 494-500, 2010.

RICCI, Irene et al. Searching for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae): large polymerase chain reaction survey and new identifications. *Journal of medical entomology*, v. 39, n. 4, p. 562-567, 2002.

RICCI, Irene et al. Searching for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae): large polymerase chain reaction survey and new identifications. *Journal of medical entomology*, v. 39, n. 4, p. 562-567, 2002.

RICHARDSON, Paul M.; HOLMES, W. Patrick; SAUL II, George B. The effect of tetracycline on reciprocal cross incompatibility in *Mormoniella* (*Nasonia*) *vitripennis*. *J. Invertebr. Pathol.* v. 50, n. 3, p.176-83, 1987.

RIEGLER, M., *et al.* Tandem repeat markers as novel diagnostic tools for high resolution fingerprinting of *Wolbachia*. *BMC microbiology*, v. 12 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S12, 2012.

RIGAUD, Thierry; MOREAU, Jérôme; JUCHAULT, Pierre. *Wolbachia* infection in the terrestrial isopod *Oniscus asellus*: sex ratio distortion and effect on fecundity. *Heredity*, v. 83, n. 4, p. 469-475, 1999.

ROUSSET, Francois et al. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 250, n. 1328, p. 91-98, 1992.

SAMBROOK, J., W. RUSSELL. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001

SARMA, D. K. et al. Suitability of the boiling method of DNA extraction in mosquitoes for routine molecular analyses. *Int. J. Mosq. Res.*, v. 1, n. 3, p. 15-17, 2014.

SAWASDICHAI, Sunisa et al. Detection of diverse *Wolbachia* 16S rRNA sequences at low titers from malaria vectors in Kayin state, Myanmar. *Wellcome open research*, v. 4, 2019.

SAWASDICHAI, Sunisa et al. Low-density genetically diverse natural *Wolbachia* infections in malaria vectors in Kayin state, Myanmar. *Wellcome open research*, v. 4, 2019.

SERBUS, Laura R. et al. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annual review of genetics*, v. 42, p. 683-707, 2008.

SERBUS, Laura R. et al. The impact of host diet on *Wolbachia* titer in *Drosophila*. *PLoS pathogens*, v. 11, n. 3, 2015.

SHAIKEVICH, Elena et al. *Wolbachia* symbionts in mosquitoes: Intra-and intersupergroup recombinations, horizontal transmission and evolution. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 134, p. 24-34, 2019.

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

SINKINS, Steven P. et al. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. *Nature*, v. 436, n. 7048, p. 257, 2005.

SONI, Monika et al. Molecular typing and phylogeny of *Wolbachia*: A study from Assam, North-Eastern part of India. *Acta tropica*, v. 176, p. 421-426, 2017.

SOTO, Max Carlos Ramírez. Epidemia por el virus del zika: un reto para los sistemas de salud de las Americas. *Boletín-Instituto Nacional de Salud*, v. 22, n. 1-3, p. 1-3, 2016.

STAHLHUT, Julie K. et al. The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. *Molecular ecology*, v. 19, n. 9, p. 1940-1952, 2010.

STOUTHAMER Richard. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga* 38:3–6. 1993.

STOUTHAMER, Richard; BREEUWER, Johannes AJ; HURST, Gregory DD. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 71-102, 1999.

STRUNOV, Anton; KISELEVA, Elena; GOTTLIEB, Yuval. Spatial and temporal distribution of pathogenic *Wolbachia* strain wMelPop in *Drosophila melanogaster* central nervous system under different temperature conditions. *Journal of invertebrate pathology*, v. 114, n. 1, p. 22-30, 2013.

TEICH, Vanessa; ARINELLI, Roberta; FAHHAM, Lucas. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. JBES: Brazilian Journal of Health Economics/Jornal Brasileiro de Economia da Saúde, v. 9, n. 3, 2017.

TELSCHOW, Arndt; HAMMERSTEIN, Peter; WERREN, John H. The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evolution*, v. 59, n. 8, p. 1607-1619, 2005.

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. *Trop Biomed*, v. 34, p. 583-597, 2017.

THONGSRIPONG, Panpim 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*, v. 8, n. 2, p. 1352-1368, 2018.

TORTOSA, P. et al. Chikungunya-*Wolbachia* interplay in *Aedes albopictus*. *Insect molecular biology*, v. 17, n. 6, p. 677-684, 2008.

TSAI, Kun-Hsien et al. Molecular (sub) grouping of endosymbiont *Wolbachia* infection among mosquitoes of Taiwan. *Journal of medical entomology*, v. 41, n. 4, p. 677-683, 2004.

TURELLI, Michael; HOFFMANN, Ary A. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature*, v. 353, n. 6343, p. 440-442, 1991.

UGHASI, Josephine et al. *Mansonia africana* and *Mansonia uniformis* are vectors in the transmission of *Wuchereria bancrofti* lymphatic filariasis in Ghana. *Parasites & vectors*, v. 5, n. 1, p. 89, 2012.

UNCKLESS, Robert L. et al. *Wolbachia* as populations within individual insects: causes and consequences of density variation in natural populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 276, n. 1668, p. 2805-2811, 2009.

VAN DEN HURK, Andrew F. et al. Impact of *Wolbachia* on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 11, p. e1892, 2012.

WALKER, T. J. P. H. et al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, v. 476, n. 7361, p. 450, 2011.

WEISS, E.; MOULDER, J. W.; ORDER, I. *Rickettsiales* Gieszczykiewicz 1939. Krieg, NR, JG Holt, eds, v. 1, 1984.

WERNEGREN, Jennifer J. Endosymbiosis: lessons in conflict resolution. *PLoS Biol*, v. 2, n. 3, p. e68, 2004.

WERREN, John H. Biology of *Wolbachia*. *Annual review of entomology*, v. 42, n. 1, p. 587-609, 1997.

WERREN, John H.; BALDO, Laura; CLARK, Michael E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 10, p. 741, 2008.



WERREN, John H.; WINDSOR, Donald M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium?. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 267, n. 1450, p. 1277-1285, 2000.

WERREN, John H.; WINDSOR, Donald; GUO, Li Rong. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 262, n. 1364, p. 197-204, 1995b.

WERREN, John H.; ZHANG, Wan; GUO, Li Rong. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 261, n. 1360, p. 55-63, 1995a.

WHO. Vector-borne diseases. Key facts. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. 2018 [atualizado em 2 de março de 2020].

WHO. Mosquito control: can it stop Zika at source? ;Geneva: WHO, Available from: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/articles/mosquito-control/en/>. 2018 [atualizado em 17 Fevereiro 2018; Acesso 04 outubro de 2018].

WIWATANARATANABUTR, Itsanun. Geographic distribution of *Wolbachia* infections in mosquitoes from Thailand. Journal of invertebrate pathology, v. 114, n. 3, p. 337-340, 2013.

WIWATANARATANABUTR, Itsanun; KITTAYAPONG, Pattamaporn. Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus*. Journal of invertebrate pathology, v. 102, n. 3, p. 220-224, 2009.

XI, Zhiyong; RAMIREZ, Jose L.; DIMOPOULOS, George. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog, v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008.

YEN, Janice Harumi; BARR, A. Ralph. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. Nature, v. 232, n. 5313, p. 657, 1971.

ZHOU, Weiguo; ROUSSET, Francois; O'NEILL, Scott. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 265, n. 1395, p. 509-515, 1998.

ZILBER-ROSENBERG, Ilana; ROSENBERG, Eugene. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. FEMS microbiology reviews, v. 32, n. 5, p. 723-735, 2008.

ZOUACHE, Karima et al. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. 2011

ZUG, Roman; HAMMERSTEIN, Peter. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. PloS one, v. 7, n. 6, p. e38544, 2012.