Stella Noguera Pereira

Análise do fator transcricional de meiose *grauzone* em *Culex*
quinquefasciatus infectado por *Wolbachia*

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina
Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientador: Dr. Lincoln Suesdek

São Paulo

2017

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Stella Noguera

Análise do fator transcricional de meiose *grauzone* em *Culex quinquefasciatus* infectado por *Wolbachia* / Stella Noguera Pereira. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Lincoln Suesdek

Descritores: 1. MEIOSE. 2. CICLO CELULAR. 3. GENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO. 4. GENÉTICA MOLECULAR. 5. CULICIDAE.

USP/IMTSP/BIB-18/2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por tudo. Pelo suporte financeiro, apoio moral, torcida, força, carinho, pelas caronas ao laboratório durante finais de semana, pela compreensão das portas fechadas, horas enfiada no quarto. Vocês são responsáveis por todas as coisas incríveis que aconteceram na minha vida.

Ao Dr. Lincoln Suesdek por permitir que eu fizesse do laboratório minha segunda casa por esses anos, pela oportunidade, incentivo, confiança, paciência, disponibilidade e pelas lições não só acadêmicas, mas de vida.

Aos colegas do MosquitoLab: Aurélio, Caroline, Camila, Fábio, Fernanda, Flávia, Karina, Paloma e Vivian. Pela amizade, convívio, preocupação, distração, risadas e discussões sobre todos os tipos imagináveis de assuntos. Pelos LabMeetings que são muito mais do que apenas discussões sobre artigos. À Karina pela ajuda incrível com a formatação das minhas referências bibliográficas. Ao “Fio” (Fábio) pelas inúmeras ajudas experimentais e pelas conversas sobre mosquitos e sobre a vida. À Carol, minha companheira, que me ajudou em todos os momentos, compartilhando resultados e metodologias que foram superadas juntas em incríveis horas de conversas em qualquer local, hora ou dia.

Às técnicas do MosquitoLab Fernanda e Regina pelo apoio com experimentos e por cuidarem dos meus “filhos” mosquitos com amor.

Ao Instituto de Medicina Tropical e ao Instituto Butantan pelo espaço e apoio.

À Dra. Margareth Capurro pela colaboração no projeto, pela disponibilidade de reagentes e amostras e espaço para a realização de experimentos.

Aos colegas do laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados: André, Bianca, Danilo, Ediane, Helena, Rafaella e Regina pelas sugestões, apoio, hospitalidade, preocupação e disponibilidade.

À Dra. Bianca Burini Kojin pela ajuda metodológica tanto no começo do projeto, quanto durante o desenvolvimento.

À Professora Alcira Tania Bijovsky de Katzin por ceder mosquitos para nossa colônia.

Aos funcionários da Usina Elevatória da Traição que nos disponibilizaram ajuda nas coletas de larvas de mosquitos selvagens à margem do Rio Pinheiros.

À Marcia Bicudo de Paula da Faculdade de Saúde Pública pela disponibilidade em ajudar na identificação de mosquitos *Culex quinquefasciatus*.

Ao Professor José Bento Pereira e a técnica Raquel pela ajuda e pontualidade na disponibilidade dos *Culex quinquefasciatus* do Rio de Janeiro.

À secretária Eliane (Seção de Pós-Graduação IMT-USP) pelo suporte no mestrado e ao bibliotecário Carlos pela revisão das normas técnicas.

À FAPESP pela bolsa de mestrado (2013/26014-8) e pelo auxílio regular à pesquisa (2014/27172-9) que fomentou o desenvolvimento deste projeto.

À Paula, “minha pessoa”, que é mais do que uma amiga, mas uma irmã por escolha, que está sempre do meu lado.

E à Cynthia, Priscila e Natalya pelos anos de amizade, confiabilidade, conversas, compreensão e apoio.

“The scientist does not study nature because it is useful;

he studies it because he delights in it,

and he delights in it because it is beautiful.

If nature were not beautiful, it would not be worth knowing,
and if nature were not worth knowing, life would not be worth living”

Jules Henri Poincaré

RESUMO

Pereira S.N. Análise do fator transcricional de meiose *grauzone* em *Culex quinquefasciatus* infectado por *Wolbachia* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

Wolbachia pipientis é uma alfa-protobactéria intracelular obrigatória, endossimbionte de artrópodes e nematódeos que é herdada por via materna ao longo das gerações. A presença desta bactéria nos tecidos germinativos pode provocar nos hospedeiros alterações fenotípicas reprodutivas, como partenogênese, feminização genética de machos, morte de machos, incompatibilidade citoplasmática (IC) e alterações de *fitness*. Alguns mecanismos moleculares dessas alterações baseiam-se na modulação da expressão gênica do hospedeiro, ou seja, a bactéria pode suprimir ou estimular genes de forma a produzir ambiência favorável à manutenção da endossimbiose. Devido a esse potencial manipulador, *Wolbachia* tem sido testada como “ferramenta” para controle populacional de insetos vetores de patógenos. O mosquito *Culex quinquefasciatus*, naturalmente infectado por *Wolbachia* na região Neotropical, é um importante vetor de diversos patógenos que atingem humanos e animais. A presença da bactéria causa IC e altera o *fitness* no mosquito, mediante alterações temporais na ovogênese, fecundidade e fertilidade reprodutivas. Sabe-se que a presença da *Wolbachia* altera a expressão do gene *grauzone* e há fortes indícios de que esta expressão diferencial induza à IC em *Cx. quinquefasciatus*. Sabe-se também que este gene possui duas cópias parálogas em *Cx. quinquefasciatus*, porém estudos observaram a relevância de apenas um parólogo como importante regulador dos ciclos celulares da ovogênese e espermatogênese. No entanto, as bases genéticas dos fenótipos IC e “*fitness* alterado” do modelo

Wolbachia-Cx. quinquefasciatus Neotropical ainda permanecem desconhecidas. Objetivamos inicialmente neste modelo quantificar e silenciar a expressão do gene *grauzone* (ambos parálogos) para suportar a hipótese pré-existente de que a superexpressão deste gene em mosquitos infectados por *Wolbachia* causa as alterações fenotípicas reprodutivas. Durante o desenvolvimento do projeto houve intercorrências que alteraram o rumo do trabalho: a necessidade de substituição da colônia experimental de mosquitos devido a baixas demográficas e à alta variabilidade intraespecífica do gene *grauzone*. Frente às intercorrências, formulamos como neo-objetivo a comparação filogenética entre as variantes do gene *grauzone*. Detectamos também variabilidade em um dos parálogos e concluímos que as cópias parálogas do gene encerram proteínas estruturalmente distintas e talvez funcionalmente distintas no tocante à alteração reprodutiva (IC) causada pela presença da *Wolbachia*. Foi possível observar que fêmeas infectadas apresentam amplificações de *grauzone* mais intensas quando comparadas com fêmeas não-infectadas no 4º dia de emergência, corroborando dados da literatura. Em conjunto, esses achados indicam que é promissora a continuidade do estudo do papel de *grauzone* na IC, mas demonstra também que este gene é mais complexo do que se imaginava, o que demandará maior esforço investigativo. A expectativa de uso futuro de *Wolbachia* como controlador biológico de mosquitos-vetores poderá se beneficiar de estudos como aqui proposto.

Descritores: Meiose. Ciclo Celular. Genética do Desenvolvimento. Genética Molecular. Culicidae.

ABSTRACT

Pereira S.N. Analysis of the transcriptional factor of meiosis *grauzone* in *Culex quinquefasciatus* infected by *Wolbachia* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

Wolbachia pipientis is an obligate intracellular alpha-protobacterium, endosymbiont of arthropods and nematodes, which is inherited through maternal route over generations. The presence of this bacterium in germinative tissues can cause reproductive phenotypic alterations in the hosts, such as parthenogenesis, genetic feminization of males, death of males, cytoplasmic incompatibility (CI) and fitness changes. Some molecular mechanisms of these alterations are based on the modulation of gene expression of the host, that is, the bacterium can suppress or stimulate genes in order to produce favorable environment for the maintenance of the endosymbiosis. Due to this potential manipulator, *Wolbachia* has been tested as a "tool" for population control of pathogen vector insects. The mosquito *Culex quinquefasciatus*, naturally infected by *Wolbachia* in the Neotropical region, is an important vector of several pathogens that affect humans and animals. The presence of the bacteria causes CI and changes the fitness in the mosquito, through temporal changes in ovogenesis, reproductive fertility and fertility. The presence of *Wolbachia* is known to alter the expression of the *grauzone* gene and there are strong indications that this differential expression induces the CI in *Cx. quinquefasciatus*. It is known that this gene occurs with two paralogs copies in *Cx. quinquefasciatus*, but studies have observed the relevance of only one paralog as important regulator of oogenesis and spermatogenesis cell cycles. However, the genetic basis of the phenotypes "changed fitness" and CI of *Wolbachia*-*Cx. quinquefasciatus* Neotropical model remain

unknown. We initially aimed at quantifying and knockdown of *grauzone* gene (both paralogs) to support the preexisting hypothesis that overexpression of this gene in *Wolbachia*-infected mosquitoes causes reproductive phenotypic changes. During the development of the project there were interurrences that altered the course of work: the need to replace mosquito populations due to demographic lows and the high intraspecific variability of *grauzone* gene. In view of the interurrences we formulated the neo-objective phylogenetic comparison between the variants of the *grauzone* gene. We also detected variability in one of the paralogs and concluded that the paralogs copies of the gene contain structurally distinct and perhaps functionally distinct proteins with respect to the reproductive alteration (CI) caused by the presence of *Wolbachia*. It was possible to observe that infected females show more intense *grauzone* amplifications when compared to uninfected females on the 4th day of emergence, corroborating data from the literature. Taken together, these findings indicate that the continuity of the study of the role of *grauzone* in CI is promising, but also demonstrates that this gene is more complex than previously thought, which will require more investigative effort. The expectation of future use of *Wolbachia* as a biological control of mosquito-vectors may benefit from studies as proposed here.

Descriptors: Meiosis. Cell Cycle. Development Genetics. Molecular Genetics. Culicidae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Linha do tempo contextualizando experimentos e substituições de colônias realizadas durante o desenvolvimento do projeto entre os meses de 04/2014 e 09/2017.....	33
Figura 2 -	Fotografia de gel de agarose enviado pela BPI Biotecnologia apresentando a positividade de amplificações do fragmento do gene <i>wsp</i> para amostras das três colônias de mosquitos. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA <i>Ladder</i> ; amostras: PIN, SELV e IBEX; (+): controle positivo da reação, amostra PIN; Bco: controle negativo da reação, água Milli-Q. Esta fotografia foi recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A.....	52
Figura 3 -	Fotografia de gel de agarose enviado pela BPI Biotecnologia apresentando a positividade de amplificações do fragmento do gene <i>ftsZ</i> para amostras das três colônias de mosquitos. Da esquerda para direita: amostras: PIN, SELV e IBEX; (+): controle positivo da reação, amostra PIN; Bco: controle negativo da reação, água Milli-Q; Peso molecular 100bp DNA <i>Ladder</i> . Esta fotografia foi recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A.....	53
Figura 4 -	Fotografia de gel de agarose gentilmente cedida pelo colega Fábio de Almeida apresentando a eficiência do tratamento de tetraciclina para a colônia PIN para a desinfecção de <i>Wolbachia</i> . As amostras são DNA de fêmeas <i>Cx. quinquefasciatus</i> individuais submetidas a amplificação do fragmento do gene <i>wsp</i> após o tratamento. Por ordem: 100bp DNA <i>Ladder</i> ; amostras: 1 a 17, DNA de fêmeas que sofreram o tratamento, não demonstrando amplificação para o gene <i>wsp</i> ; +: controle positivo da reação, amostra PIN infectado; -: controle negativo da reação, água Milli-Q.	54
Figura 5 -	Fotografia de gel de agarose enviado pela BPI Biotecnologia apresentando o insucesso do tratamento de tetraciclina na colônia IBEX, onde as amostras individuais de mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i> mostraram-se positivas na amplificação do gene <i>wsp</i> . Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA <i>Ladder</i> ; amostras: 9, 14, 15, 21, 30, 32, 35, 36; (+): controle positivo da reação, amostra PIN infectada; Bco: controle negativo da reação, água Milli-Q. Esta fotografia foi recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A.	55

Figura 6 -	Fotografia de gel de agarose enviado pela BPI Biotecnologia apresentando o insucesso do tratamento de tetraciclina na colônia IBEX, onde as amostras individuais de mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i> mostraram-se positivas na amplificação do gene <i>ftsZ</i> . Da esquerda para direita: amostras: 9, 14, 15, 21, 30, 32, 35, 36; (+): controle positivo da reação, amostra PIN infectada; Bco: controle negativo da reação, água Milli-Q; Peso molecular 100bp DNA <i>Ladder</i> . Esta fotografia foi recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A.	56
Figura 7 -	Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin dos parálogos do gene <i>grauzone</i> em mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i> CPIJ005623 e CPIJ015950 em suas formas transcritas. Em destaque verde encontra-se o fragmento diagnóstico entre os parálogos, em rosa a inserção de um nucleotídeo no parálogos CPIJ005623 e em azul as substituições nucleotídicas	58
Figura 8 -	Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin do parálogo CPIJ005623 na sua forma transcrita e genômica, apresentando em destaque azul o <i>intron</i> deste parálogos. . .	59
Figura 9 -	Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin do parálogo CPIJ015950 na sua forma transcrita e genômica, apresentando em destaque azul e verde os <i>introns</i> deste parálogo.	60
Figura 10 -	Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin dos parálogos do gene <i>grauzone</i> em mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i> CPIJ005623 e CPIJ015950 em suas formas genômicas. Em destaque rosa e amarelo as inserções/deleções que ocorrem entre os parálogos.	61
Figura 11 -	Fotografia de gel de agarose apresentando a amplificação do fragmento de <i>grauzone</i> com iniciadores grau2 em amostras de DNA complementar em <i>pool</i> de amostras das colônias PIN <i>wPip+</i> e <i>wPip-</i> , SELV <i>wPip+</i> e IBEX <i>wPip+</i> com aproximadamente 600 pb. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA <i>Ladder</i> ; amostras: 1: PIN <i>wPip+</i> , 2; PIN <i>wPip-</i> , 3; SELV <i>wPip+</i> , 4: IBEX <i>wPip+</i>	63
Figura 12 -	Fotografia de gel de agarose apresentando a amplificação do fragmento de gene <i>grauzone</i> com iniciadores grau1 em amostras em <i>pool</i> de DNA genômico de amostras PIN <i>wPip+</i> com aproximadamente 400 pb. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA <i>Ladder</i> ; amostras: 1, 2 e 3 diferentes amostras em <i>pool</i> de amostras PIN <i>wPip+</i>	64

Figura 13 -	Alinhamentos realizados na plataforma BLAST do sequenciamento de amostra de DNA genômico da colônia PIN de amplificação do gene <i>grauzone</i> grau1 com identidade de 98% com os acessos XM_001847451 e XM_001866304, correspondentes aos parálogos de <i>grauzone</i> observados em <i>Cx. quinquefasciatus</i> CPIJ005623 e CPIJ015950, respectivamente. A - Query: amplificado de grau1; Sbjct: número de acesso GenBank XM_001847451 (CPIJ005623); B - Query: amplificado de grau1; Sbjct: número de acesso GenBank XM_001866304 (CPIJ015950).	66
Figura 14 -	Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin dos parálogos transcritos do gene <i>grauzone</i> em mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i> CPIJ005623 e CPIJ015950. Em destaque amarelo encontra-se o fragmento diagnóstico entre os parálogos e em azul a localização os iniciadores grau1. . .	67
Figura 15 -	Alinhamentos realizados na plataforma BLAST da sequência proteica do sequenciamento da amostra de DNA colônia PIN com amplificação do fragmento do gene <i>grauzone</i> grau1 com identidade de 100 % com o acesso XP_001847503, correspondente ao parálogo CPIJ005623 e 97 % com o acesso XP_001866339, correspondente ao parálogo CPIJ015950. A - Query: amplificado de grau1; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001847503 (CPIJ005623) B - Query: amplificado de grau1; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001866339 (CPIJ015950).	68
Figura 16 -	Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin dos parálogos transcritos do gene <i>grauzone</i> em mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i> CPIJ005623 e CPIJ015950. Em destaque amarelo encontra-se o fragmento diagnóstico entre os parálogos e em verde a localização os iniciadores grau2.	70
Figura 17 -	Fotografia de gel de agarose apresentando o fragmento do gene <i>grauzone</i> amplificado com iniciadores grau2 em amostras de <i>pool</i> de DNA genômico de mosquitos da colônia PIN, SELV e IBEX com aproximadamente 600 pb. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA <i>Ladder</i> ; amostras: 1: <i>pool</i> de mosquitos PIN, 2: <i>pool</i> de mosquitos SELV e 3: <i>pool</i> de mosquitos IBEX.	71
Figura 18 -	Alinhamentos realizados na plataforma BLAST do sequenciamento de amostra de DNA genômico da colônia PIN de amplificação do gene <i>grauzone</i> grau2 com identidade de 97 % com os acessos XM_001847451 e XM_001866304, correspondentes aos parálogos de <i>grauzone</i> observados em <i>Cx. quinquefasciatus</i> CPIJ005623 e CPIJ015950, respectivamente. A - Query: amplificado de grau2; Sbjct: número de acesso GenBank XM_001847451 (CPIJ005623); B - Query: amplificado de grau2; Sbjct: número de acesso GenBank XM_001866304 (CPIJ015950).	72

Figura 19 -	Alinhamentos realizados na plataforma BLAST da sequência proteica do sequenciamento da amostra de DNA colônia PIN com amplificação do fragmento do gene <i>grauzone</i> grau2 com identidade de 98 % com os acessos XP_001866339 e XP_001847503, correspondentes aos parálogos CPIJ015950 e CPIJ005623, respectivamente. A - Query: amplificado de grau2; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001866339 (CPIJ015950); B - Query: amplificado de grau2; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001847503 (CPIJ005623).	73
Figura 20 -	Fotografia de gel de agarose apresentando adição do promotor T7 em amplificadas de fragmentos de <i>grauzone</i> grau2 em amostras de <i>pool</i> de DNA genômico de mosquitos das colônias PIN, SELV e IBEX, onde ao lado de cada banda de <i>grauzone</i> , encontra-se o amplificado com T7. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA <i>Ladder</i> ; amostras: 1: PIN grau2; 2: PIN grau2 + T7, 3: SELV grau2, 4: SELV grau2 + T7, 5: IBEX grau2, 6: IBEX grau2 + T7.	74
Figura 21 -	Fotografia de gel de agarose apresentando a adição do promotor T7 no fragmento do gene MSP1 quando comparado com o fragmento gerado do gene sem o promotor. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA <i>Ladder</i> ; amostras: 1: fragmento do gene MSP1 com a adição do promotor T7, 2: fragmento do gene MSP1 sem a adição do promotor.	75
Figura 22 -	Esquema representativo do gene <i>grauzone</i> e como os iniciadores foram utilizados para aperfeiçoar os fragmentos gerados para a montagem do gene <i>grauzone</i> completo.	77
Figura 23 -	Resultado do alinhamento pela plataforma MultAlin do sequenciamento da amostra genômica PIN para o gene <i>grauzone</i> completo com as sequências dos parálogos em suas formas genômicas. Em azul estão destacados os nucleotídeos que apresentaram diferença.	80
Figura 24 -	Resultado do alinhamento pela plataforma MultAlin do sequenciamento da amostra genômica DNA14 (colônia IBEX) para o gene <i>grauzone</i> completo com as sequências dos parálogos em suas formas genômicas. Em azul estão destacados os nucleotídeos que apresentaram diferença. . .	81
Figura 25 -	Resultado do alinhamento pela plataforma MultAlin do sequenciamento das amostras genômicas DNA14 e PIN para o gene <i>grauzone</i> completo. Em azul estão destacados os nucleotídeos que apresentaram diferença.	83
Figura 26 -	Alinhamentos realizados na plataforma BLAST da sequência proteica completa do gene <i>grauzone</i> do sequenciamento da amostra de DNA colônia PIN com identidade de 90 % com as sequências XP_001847503 e XP_001866339,	

	correspondentes aos parálogos CPIJ005623 e CPIJ015950, respectivamente. A - Query: amplificado PIN; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001847503 (CPIJ005623); B - Query: amplificação PIN; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001866339 (CPIJ015950).	84
Figura 27 -	Dendrograma de sequências de <i>Grauzone</i> de mosquitos que alinham na plataforma BLAST com a sequência de <i>grauzone</i> sequenciada da amostra PIN. Em destaque amarelo: sequência completa do gene <i>grauzone</i> gerado do sequenciamento da amostra PIN.	86
Figura 28 -	Alinhamentos realizados na plataforma BLAST da sequência proteica completa do gene <i>grauzone</i> do sequenciamento da amostra de DNA14 (colônia IBEX) com identidade de 67 % com a sequência XP_001847503 (CPIJ005623) e 68 % com a sequência XP_001866339 (CPIJ015950). A - Query: amplificado DNA14; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001847503 (CPIJ005623); B - Query: amplificação DNA14; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001866339 (CPIJ015950).	87
Figura 29 -	Dendrograma de sequências de <i>grauzone</i> de mosquitos que alinham na plataforma BLAST com a sequência de <i>grauzone</i> sequenciada da amostra DNA14 (colônia IBEX). Em destaque amarelo: sequência completa do gene <i>grauzone</i> gerado do sequenciamento da amostra DNA14.	89
Figura 30 -	Alinhamento realizado na plataforma BLAST das sequências proteicas dos parálogos de <i>grauzone</i> CPIJ005623 e CPIJ015950, com identidade entre estas de 96 %. Query: CPIJ015950 e Sbjct: CPIJ005623.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
cDNA	DNA complementar
Cx.	<i>Culex</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA14	Amostra individual de mosquito da colônia IBEX
dNTP	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ftsZ	Gene de proteína sensível à temperatura de filtragem Z em <i>Wolbachia</i>
gap	Espaçamento de nucleotídeos em alinhamentos
geração F1	primeiros descendentes da geração parental
geração P	geração parental
grau1	iniciadores adquiridos pela literatura (Pinto et al., 2013)
grau2	iniciadores adquiridos pelo software <i>Primer3</i>
HCl	Ácido clorídrico
IBEX	Colônia de mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i> provenientes do Instituto de Biologia do Exército no estado do Rio de Janeiro
IC	Incompatibilidade citoplasmática
M	Molar
MCO	<i>Multicopper oxidase</i>
ml	Mililitro

mM	Milimolar
MSP1	Proteína de superfície de merozoítos de <i>Plasmodium falciparum</i>
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nl	Nanolitro
nm	Nanômetro
p/v	Peso/Volume
pb	Pares de base
PCR	Reação da polimerase em cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico do meio
PIN	Primeira colônia de mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i> proveniente do Rio Pinheiros
<i>pool</i>	concentração de diversos indivíduos em uma única amostra
RCF	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação da polimerase em cadeia com transcrição reversa
SELV	Colônia de mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i> coletados do Rio Pinheiros
sRNA	Pequenos RNAs não codificantes
TAE	Tris-acetado-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidade
wPip -/N-Infec	Mosquitos livres da infecção por <i>Wolbachia</i>
wPip+/Infec	Mosquitos com infecção por <i>Wolbachia</i>
<i>wsp</i>	Gene de proteína de superfície em <i>Wolbachia</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	<i>Wolbachia pipientis</i>	20
1.2	Interação <i>Wolbachia</i> -Hospedeiro	24
1.3	<i>Culex quinquefasciatus</i>	25
1.4	<i>Cx. quinquefasciatus</i> e <i>Wolbachia</i> - modulação do gene <i>grauzone</i>	28
1.5	Problema biológico envolvendo <i>Wolbachia</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i> Neotropical	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MÉTODOS	33
3.1	Colônias de mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i>	33
3.1.1	Colônia PIN	34
3.1.2	Colônia SELV	34
3.1.3	Colônia IBEX	35
3.2	Ética em uso animal.	36
3.3	Teste de infecção por <i>Wolbachia</i>	36
3.4	Tratamento com antibiótico para estabelecimento da colônia livre de <i>Wolbachia</i> (wPip-).	39
3.5	Diferenciação dos parálogos do gene <i>grauzone</i> em <i>Cx.</i> <i>quinquefasciatus</i>	40
3.6	Quantificação do gene <i>grauzone</i>	41
3.6.1	Extração de RNA	41

3.6.2	Tratamento com DNase	41
3.6.3	Síntese da primeira fita de cDNA	42
3.6.4	RT-PCR semiquantitativa	42
3.7.	Geração RNA dupla fita para silenciamento do gene <i>grauzone</i> em fêmeas <i>Cx. quinquefasciatus</i> wPip+.	43
3.7.1	Extração de DNA genômico	43
3.7.2	Amplificação de fragmento do gene <i>grauzone</i> por grau1. . .	44
3.7.3	Análise qualitativa de material	45
3.7.4	Sequenciamento de fragmento do gene <i>grauzone</i> por grau1.	45
3.7.5	Preparação de sequências e análises	45
3.7.6	Iniciadores grau2 para gene <i>grauzone</i>	46
3.7.7	Sequenciamento do fragmento do gene <i>grauzone</i> por grau2.	46
3.7.8	Amplificação do fragmento do gene <i>grauzone</i> com promotor T7	47
3.7.9	Purificação do fragmento do gene <i>grauzone</i> com T7	47
3.7.10	Produção de RNA dupla fita	48
3.8	Sequenciamento completo do gene <i>grauzone</i>	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Colônias de mosquitos <i>Cx. quinquefasciatus</i>	50
4.1.1	Colônia PIN	50
4.1.2	Colônia SELV	50
4.1.3	Colônia IBEX	51
4.2.	Teste de infecção por <i>Wolbachia</i>	51
4.3	Tratamento com antibiótico para estabelecimento da colônia wPip-	53

4.4	Diferenciação dos parálogos do gene <i>grauzone</i> em <i>Cx. quinquefasciatus</i>	57
4.5	Quantificação do gene <i>grauzone</i>	62
4.5.1	Extração de RNA	62
4.5.2	RT-PCR semiquantitativa	62
4.6	Geração RNA dupla fita do gene <i>grauzone</i> em fêmeas <i>Cx. quinquefasciatus wPip+</i>	64
4.6.1	Amplificação de fragmento do gene <i>grauzone</i> por grau1.	64
4.6.2	Sequenciamento de fragmento do gene <i>grauzone</i> por grau1.	65
4.6.3	Iniciadores grau2 para gene <i>grauzone</i>	69
4.6.4	Sequenciamento do fragmento do gene <i>grauzone</i> por grau2.	71
4.6.5	Amplificação do fragmento do gene <i>grauzone</i> com promotor T7.	74
4.6.6	Produção de RNA dupla fita	76
4.7	Sequenciamento completo do gene <i>grauzone</i>	76
5	DISCUSSÃO GERAL	92
6	CONCLUSÃO	95
7	REFERÊNCIAS	96
	ANEXO A - Relatório da empresa BPI Biotecnologia para infecção de <i>Wolbachia</i>	112
	ANEXO B - Relatório da empresa BPI Biotecnologia para tentativa de sequenciamento completo do gene <i>grauzone</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i>	115
	ANEXO C - Relatório da empresa BPI Biotecnologia para sequenciamento completo do gene <i>grauzone</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i>	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Wolbachia pipientis*

Wolbachia pipientis é uma alphaprotobactéria intracelular obrigatória da ordem Rickettsiales reportada primeiramente em tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens*^{1, 2} (a partir deste ponto, esta bactéria será chamada apenas de *Wolbachia*). Taxonomicamente, esta espécie é bastante diversa, por isso é classificada atualmente em 16 “supergrupos” monofiléticos (“A” a “F” e “H” a “Q”)³⁻⁶.

A distribuição desta bactéria abrange artrópodes e nematódeos, sendo encontrada presente em milhões de espécies, sendo reportada como o parasita reprodutivo mais abundante em hospedeiros artrópodes, infectando entre 40 e 66 % destes hospedeiros^{7, 8}.

A transmissão principal desta bactéria ocorre verticalmente, ou “transovarianamente”, pois *Wolbachia* presente nos ovários das fêmeas hospedeiras são herdadas nos polos germinativos dos ovos, fazendo com que a prole desta fêmea consequentemente seja infectada com *Wolbachia*^{9, 10}. Porém a eficiência desta transmissão pode apresentar falhas¹¹, uma vez que existem fatores que influenciam na transmissão, como altas temperaturas e fungos antibióticos^{12, 13}. Para manter-se frequentemente em populações de hospedeiros, a *Wolbachia* necessita de invasão externa, como no caso de transmissão horizontal¹⁰.

A transmissão horizontal é o nome dado a transmissão da bactéria entre táxons de hospedeiros artrópodes^{14, 15} como foi hipotetizado e testado no contato parasitoides-parasitado¹⁶⁻¹⁹, presa-predador²⁰⁻²⁴ e no caso de injúrias²⁵, o que é explicado pelo tropismo por nichos de células tronco somáticas²⁶. Estes indícios

somado ao fato de ter estudos indicando incongruência entre filogenias de hospedeiros e *Wolbachia*²⁷⁻²⁹ suporta a hipótese de transferência horizontal de *Wolbachia*, porém o processo desta transferência não é bem conhecido ainda³⁰.

Em hospedeiros nematódeos, a presença desta bactéria é classificada como uma relação mutualista obrigatória^{31, 32} onde, coevolutivamente³³, a simbiose tornou-se necessária para a reprodução, sobrevivência^{31, 34-43} e desenvolvimento larval⁴⁴ de nemátodes.

Já a presença dessa bactéria parasita em hospedeiros artrópodes, acarreta importantes modificações fenotípicas na reprodução destes hospedeiros, beneficiando sempre as fêmeas, visto que são elas que capacitam a transmissão vertical⁴⁵. As alterações fenotípicas reportadas são a feminização genética de machos, morte preferencial de machos, indução de partenogênese, incompatibilidade citoplasmática (ou incompatibilidade reprodutiva), e até alterações de aptidão reprodutiva (*fitness*)^{9, 10, 46-49}.

A feminização genética de machos ocorre quando a *Wolbachia* inibe a diferenciação da glândula androgênica, o que impede a geração do hormônio determinante de sexo, fazendo com que os machos desenvolvam característica externas e reprodutivas femininas⁵⁰⁻⁵³. É observada a formação de dois tipos de feminização: as chamadas “fêmeas intersexo”, que são geneticamente machos com fenótipos femininos funcionais com a presença de pequenos apêndices masculinos (endopoditos), podendo produzir o dobro da prole de uma fêmea normal⁵¹; e os chamados “machos intersexo”, que são indivíduos com características externas sexuais parcialmente feminizadas, porém são estéreis. Quando uma população inteira apresenta infecção por *Wolbachia*, a taxa de machos naturais na população é menor que 15 %⁵⁰.

A morte preferencial de machos é caracterizada pela morte na embriogênese de filhotes machos em fêmeas infectadas^{9, 45}. Essa alteração é vantajosa para fêmeas

infectadas, que podem se beneficiar com a alimentação dos ovos de machos mortos, a redução da probabilidade de consanguinidade e a redução da intensidade de interações entre os filhotes, como o canibalismo de fêmeas e a competição entre os sexos⁵⁴⁻⁵⁶. As espécies que apresentam essa alteração normalmente depositam seus ovos em jangada, o que faz com que os ovos que se desenvolveram tenham mais facilidade no acesso ao benefício⁴⁵.

A indução de partenogênese foi descoberta em espécies onde os machos são haploides e fêmeas apresentam partenogênese telítoca (geração de prole fêmea a partir de ovos não-fertilizados)⁹ e quando livres de *Wolbachia*, a geração de machos é normalizada³⁰. A bactéria atua sobre os ovos haplóides, que geram machos, atuando na primeira divisão mitótica na fase de segregação na metáfase, duplicando o número de cromossomos¹⁰, fazendo que todos os ovos, fertilizados ou não, sejam fêmeas apresentando a infecção por *Wolbachia*³⁰.

Já a incompatibilidade citoplasmática (IC) ocorre na incompatibilidade entre o espermatozoide e o ovócito, quando machos infectados cruzam com fêmeas não-infectadas (incompatibilidade unidirecional) ou portadoras de cepas incompatíveis de *Wolbachia* (incompatibilidade bidirecional), resultando na diminuição ou supressão da viabilidade dos zigotos originários⁵⁷⁻⁶⁰. Geralmente tal incompatibilidade é assimétrica, pois não ocorre quando a fêmea está infectada e o macho não está¹⁰ e a intensidade da IC pode variar proporcionalmente com a densidade de infecção por *Wolbachia*^{30, 61}.

Além das alterações reprodutivas citadas acima, ainda são observadas alterações de reprodução (*fitness*), que pode aumentar a quantidade e viabilidade de ovos (aumento de *fitness* do hospedeiro) em alguns casos^{47, 62, 63}, ou reduzir a quantidade e viabilidade de ovos (reduzindo o *fitness* do hospedeiro), porém neste caso as fêmeas infectadas exibem mais tempo de vida e o tempo desenvolvimento e oviposição é reduzido, quando comparado com fêmeas não-infectadas⁴⁸.

Devido a tais efeitos reprodutivos e a rápida distribuição entre populações de hospedeiros, *Wolbachia* tem sido há tempos cogitada como possível ferramenta para controle populacional de insetos com importância médica, veterinária e agrícola^{46, 64, 65}. Inicialmente foi proposto aproveitar-se do fenômeno da incompatibilidade citoplasmática (IC) e introduzir machos infectados em populações naturalmente não-infectadas, o que resultaria em cópula sem geração de prole e posteriormente, supressão populacional⁴⁶. Atualmente, existe o projeto “*MosquitoMate*”, que está liberando mosquitos *Aedes albopictus* machos infectados com um supergrupo diferente de *Wolbachia* do que a população selvagem nas regiões de Kentucky, New York e Califórnia, fazendo com que ocorra incompatibilidade bidirecional entre os machos introduzidos e fêmeas selvagens, consequentemente diminuindo a população de mosquitos da área, diminuindo o índice de transmissão de doenças transmitidas por este mosquito⁶⁶⁻⁶⁸.

Porém existem mosquitos importante por transmitirem doenças, como o *Aedes aegypti* que não apresentam *Wolbachia* naturalmente⁶⁹, então a ideia inicial de introdução de mosquitos infectados com *Wolbachia* em populações livres da infecção foi desenvolvida^{70, 71} com o intuito de estabelecer incompatibilidade unidirecional entre mosquitos selvagens e os liberados. No entanto foi verificado que a presença de *Wolbachia* (wMel) em mosquitos que não apresentam a infecção naturalmente, bloqueia a replicação de patógenos^{72, 73}, fazendo com que o patógeno não consiga estabelecer uma permanência estável no hospedeiro, diminuindo a taxa de infecção dentro do mosquito.

Já foi verificado este efeito em *Ae. aegypti* testados para dengue^{74, 75}, Chikungunya⁷⁶, vírus do Oeste do Nilo⁷⁷ e Zika^{78, 79}. Por isso, foi desenvolvido o projeto “*EliminateDengue*”, que já está em fase de liberação de mosquitos *Aedes aegypti* em regiões da Austrália, Brasil, Colômbia, Indonésia, Vietnã e Índia (<http://www.eliminatedengue.com>).

Contudo, as bases moleculares das alterações de fenótipo ainda não são bem compreendidas, intrigando assim os pesquisadores e impulsionando as investigações genéticas da interação *Wolbachia*-hospedeiro.

1.2 Interação *Wolbachia*-Hospedeiro

Recentes estudos indicam que a influência de *Wolbachia* sobre o fenótipo do hospedeiro pode ocorrer por modulação da expressão gênica. Vários estudos têm abordado a endossimbiose do ponto de vista genético⁸⁰. Por exemplo, transcriptomas do crustáceo terrestre *Armadillidium vulgare* infectado por *Wolbachia* evidenciaram a modulação de genes no ovário e em tecidos importantes para a permanência da infecção⁸¹. Na vespa *Asobara tabida* foi verificado que *Wolbachia* pode interferir na expressão de genes envolvidos no desenvolvimento, na programação da morte celular e na imunidade, especialmente por meio da regulação do stress oxidativo⁸².

Quando a *Wolbachia* foi introduzida artificialmente em espécies de mosquitos que não apresentavam a infecção naturalmente, verificou-se que a interação gênica da endossimbiose estimulou a resposta imune do novo hospedeiro. Em *Anopheles gambiae* a transcrição de genes do sistema imune é estimulada, reduzindo significativamente os níveis de *Plasmodium* no mosquito, diminuindo consequentemente, as chances de transmissão da doença⁸³.

Wolbachia também tem a capacidade de modificar geneticamente a fisiologia do hospedeiro mediante modulações do perfil expressional de microRNAs (miRNA) do hospedeiro⁸⁰. Esse estudo demonstrou que o miRNA “*aae-miR-2940*” somente é expresso em *Ae. aegypti* infectados por *Wolbachia*. A expressão do gene-alvo deste miRNA (uma metaloprotease) foi reduzida após introdução artificial de *Wolbachia* no

mosquito⁸⁰. Ademais, o miRNA aae-miR-2940 suprime em *Ae. aegypti* a expressão do gene DNA-metiltransferase (AaDnmt2; altamente conservado de metazoários). A modulação deste gene parece ter influências inversas sobre a estabilidade de *Wolbachia* e do vírus dengue no hospedeiro *Ae. aegypti*⁸⁴.

Essas alterações de perfil expressional gênico do hospedeiro podem ser moduladas pela atuação de pequenos RNAs não codificantes (sRNAs). Sabe-se que sRNAs são produzidos por bactérias intracelulares tanto facultativas quanto obrigatórias, e em alguns casos, interferem na expressão gênica do hospedeiro⁸⁵. Recentemente diagnosticaram a presença de sRNAs em *Wolbachia*, e por métodos de sequenciamento e bioinformática estimaram que é possível que esses sRNAs atuem significativamente na biologia da *Wolbachia* e de seus hospedeiros⁸⁶.

Embora a pioneira e quase centenária detecção de *Wolbachia* tenha sido no complexo de espécies *Cx. pipiens*¹, os efeitos gênicos da endossimbiose em membros daquele complexo ainda são pouco conhecidos. *Cx. quinquefasciatus*, uma das entidades do complexo, apenas recentemente foi profundamente investigada quanto aos efeitos da *Wolbachia* sobre a reprodução do hospedeiro^{48, 87}.

1.3 *Culex quinquefasciatus*

O mosquito *Cx. quinquefasciatus* Say apresenta ampla distribuição geográfica nas regiões tropicais e subtropicais do mundo^{88, 89}, com alto nível de domiciliação e sinantropia⁹⁰⁻⁹⁴. Suas fêmeas são hematófagas noturnas (crepúsculo vespertino e à noite), apresentam preferência por humanos, mas também fazem repasto sanguíneo em aves e apresentam índices de saurotropia^{91, 95, 96}. Esta espécie apresenta inegável importância epidemiológica, uma vez que possui competência vetorial para os

nematóides *Wuchereria bancrofti*^{96, 97} noturna (período de aumento da microfilaremia periférica em humanos)⁹⁸, *Brugia malayi*⁹⁹, *Saurofilaria* sp.¹⁰⁰, *Oswaldofilaria* sp.¹⁰⁰ e *Dirofilaria immitis*^{101, 102}, protozoários como *Plasmodium cathemerium*¹⁰³, *Plasmodium relictum*¹⁰⁴, *Plasmodium gallinaceum*¹⁰⁵ e *Hepatozoon breinli*¹⁰⁶, além de diversos vírus como Nilo Ocidental¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, encefalite japonesa^{110, 111}, encefalite Saint Louis^{112, 113}, febre do Vale Rift^{114, 115}, Sindbis¹¹⁶, Avipoxvirus¹¹⁷, Reticuloendoteliossis¹⁰⁰, encefalite equina ocidental¹¹⁸, encefalite Murray Valley¹¹⁹, Kunjin¹¹⁹, Ross River¹¹⁹, Floresta Barmah¹²⁰, além de ser vetor secundário do vírus Oropouche⁹⁶.

Por apresentarem competência vetora para diversos vírus, incluindo alguns Flavivírus, este mosquito tornou-se uma preocupação para possível competência para outros arbovírus que são transmitidos por outros mosquitos, como o *Ae. aegypti* e por ser um mosquito com alta densidade populacional em diversas regiões.

Pesquisadores testaram a competência do mosquito para vírus dengue, porém alguns não observaram a replicação do vírus¹²¹ e outros não encontraram mosquitos infectados na natureza¹²². Entretanto outros verificaram que quando o vírus é injetado, há uma replicação razoável do vírus, porém eles não conseguiram encontrar partículas infecciosas do vírus depois da injeção, além de não conseguirem infectar o mosquito a partir da alimentação sanguínea¹²³. Por isso o *Cx. quinquefasciatus* foi excluído como vetor para dengue.

Já no caso de Chikungunya, foram encontrados mosquitos, durante surtos da doença, infectados com o vírus¹²⁴, porém testes mostraram que os mosquitos não apresentavam competência para transmissão ou condições de sobrevivência para o vírus, além de alguns locais de surto da doença, os *Cx. quinquefasciatus* encontrados terem menos preferência a humanos, uma vez que não foram encontrados mosquitos com ingestão de sangue humano, o que leva a crer que este mosquito não é vetor para Chikungunya¹²⁵⁻¹²⁸.

Em 2014¹²⁹, foram encontrados mosquitos *Cx. perfuscus*¹³⁰ da África apresentando naturalmente infecção por Zika vírus circulante no local. Mesmo sendo de espécies diferentes, o *Cx. quinquefasciatus* por ser o mais abundante no Brasil e pelo surto que observamos no país nos anos de 2015 e 2016, ele se tornou alvo de preocupação, levando vários estudos à testar a competência de diversas populações deste mosquito em relação à diferentes cepas de Zika vírus.

Mosquitos coletados em diferentes localidades dos Estados Unidos da América mostraram-se infectantes com vírus de cepas africanas¹³¹⁻¹³⁴, asiáticas¹³⁵, porto-riquenhas^{131, 133, 134, 136}, hondurenhas¹³³ e mexicana¹³², porém estes mosquitos se mostraram refratários a disseminação do vírus, não sendo encontradas partículas virais nos corpos ou nas glândulas salivares e saliva, depois de alguns dias da alimentação infectada.

O mesmo resultado de refração ao vírus foi observados em mosquitos australianos testados para cepa de Zika africana¹³⁷, mosquitos polinésios para Zika asiática¹³⁸ e mosquitos brasileiros para Zika brasileira^{139, 140}.

Porém a disseminação do vírus em *Cx. quinquefasciatus* foi observada por Guedes et al.¹⁴¹ que verificou a competência de mosquitos de Recife (PE) com Zika coletada de pacientes locais e mostraram que ocorre a replicação do vírus no mosquito chegando até a saliva a partir de alimentações sanguíneas infectadas com baixas doses de vírus. Tal resultado é suportado por Guo et al.¹⁴² que observaram a resposta de *Cx. quinquefasciatus* da região da China para Zika de pacientes locais infectados e verificou que ocorria dispersão viral até as glândulas salivares e saliva, conseguindo completar o ciclo, infectando com sucesso filhotes de camundongos com estes mosquitos testados e conclui que este mosquito pode ser vetor secundário deste vírus.

Sugestões para esses diferentes resultados observados entre os trabalhos pode ser explicado pela diferença genéticas entre populações de *Cx.*

quinquefasciatus observadas, pelas diferentes cepas virais utilizadas, ou ainda pela diferente resposta que cada população de mosquitos tem a frente de cada cepa viral^{131, 133}, por enquanto a resposta para a transmissão do vírus Zika por esta espécie de mosquito especificamente ainda não foi concluída.

Em partes do planeta *Cx. quinquefasciatus* pode ocorrer mutuamente com outro mosquito pertencente ao mesmo Complexo *Pipiens*, o *Cx pipiens*¹⁴³ e essa mutualidade pode levar a geração de híbridos *Cx. pipiens/quinquefasciatus*¹⁴⁴⁻¹⁴⁹.

Estes híbridos já foram observados na América do Norte¹⁵⁰⁻¹⁵³, México¹¹³, Argentina¹⁵⁴⁻¹⁵⁷, Macaronésia¹⁵⁸, África^{159, 160} e Grécia¹⁶¹ e estes híbridos geram certa preocupação, uma vez que a competência vetora de *Cx. quinquefasciatus*, descrito acima, pode ser somada com a competência vetora de *Cx. pipiens* que é vetor importante de diversos patógenos em outras regiões do planeta e a geração de híbridos entre eles pode resultar em uma distribuição flutuante e causar impactos significativos a transmissão de patógenos^{113, 162-167}.

Recentemente foi sequenciado o genoma de *Cx. quinquefasciatus*¹⁶⁸ e a partir deste foi possível o aumento dos conhecimentos genéticos sobre este mosquito e como aspectos exógenos podem interferir nesta base, como é o caso do gene *grauzone* que foi estudado recentemente neste mosquito⁸⁷.

1.4 *Cx. quinquefasciatus* e *Wolbachia* - modulação do gene *grauzone*

O gene *grauzone* foi primeiramente observado na espécie de mosca *Drosophila melanogaster*¹⁶⁹, e desde então, estudos têm dissecado o seu papel regulatório do ciclo celular da ovogênese e espermatogênese da mosca, mais especificamente, na metáfase II meiótica^{170, 171}. Esse gene é codificador de uma

proteína do tipo “*Zinc Finger C2H2*”, que é um fator de transcrição gênica atuante como regulador do ciclo celular meiótico nos processos de gametogênese de machos e fêmeas⁸⁷.

Em mosquitos *Cx. quinquefasciatus* foi observado que a presença da *Wolbachia* estimula a expressão de um gene *grauzone* homólogo ao de *Drosophila*, sendo este homólogo ocorrendo em duas cópias parálogas: CPIJ005623 e CPIJ015950 depósito nos bancos de dados online GenBank e Vectorbase). Segundo a literatura estes parálogos são diagnosticados por um fragmento de 56 nucleotídeos que encontram-se presentes no CPIJ005623 e ausente no CPIJ005950, sendo que esse fragmento diferenciado leva a duas substituições de aminoácidos e o parálogo estudado até o momento foi o CPIJ005623, pois na população estudada era o recorrente⁸⁷.

O gene *grauzone* presente no complexo *Cx. pipiens*, por ter uma superexpressão induzida por *Wolbachia* e por ter função majoritária na gametogênese, foi apontado como “personagem” central na IC observada nesses mosquitos⁸⁷. A teoria de Pinto et al.⁸⁷, suportada por diversas evidências, postula que *grauzone* aumentado em fêmeas infectadas por *Wolbachia* acelera a velocidade da ovogênese e resultaria na produção de ovócitos heterocrônicos em relação aos espermatozoides de macho não-infectado por *Wolbachia*. Esta heterocronia no momento da singamia inviabilizaria a formação do zigoto e seria a razão da IC.

1.5 Problema biológico envolvendo *Wolbachia* e *Cx. quinquefasciatus* Neotropical

Nosso grupo^{48, 172, 173} estudou uma população de *Cx. quinquefasciatus* (PIN, proveniente da cidade de São Paulo) naturalmente portadora de *Wolbachia*. Verificamos que esta linhagem infectada (wPip+) foi cruzada experimentalmente com indivíduos não-infectados pela bactéria (wPip-), ocorreu IC. Além desta incompatibilidade reprodutiva, registramos heterocronia no processo vitelogênico e outras alterações relacionadas à reprodução do mosquito. Detectamos também que fêmeas infectadas apresentam ovogênese mais rápida, oviposição prematura e maior longevidade quando comparadas às fêmeas livre de *Wolbachia* em laboratório. Em contraste, aspectos gerais de *fitness*, como fecundidade e fertilidade, são inferiores nas fêmeas portadoras de *Wolbachia*.

Neste modelo biológico *Cx. quinquefasciatus/Wolbachia*, uma de nossas linhas de pesquisa é buscar produtos gênicos que estejam envolvidos com os fenótipos observados, porém ainda não observamos diferenças de expressão gênica durante a ovogênese que fossem correlatas às diferenças de *fitness* causadas por *Wolbachia*¹⁷³.

Pinto et al.⁸⁷ evidenciaram a interação de *Wolbachia* com o gene *grauzone* em espécies do Complexo *Pipiens* de linhagens Paleárticas de mosquitos e enfatizou que as observações tendem a ser específicas para cada modelo biológico, de forma que não sabemos se as interpretações do estudo citado acima são válidas para o modelo Neotropical que investigamos. Além disso, aquele estudo não testou se há associação do gene *grauzone* modulado por *Wolbachia* com as alterações de *fitness* dos mosquitos.

Diante do exposto, notamos que as bases gênicas dos fenótipos “*fitness* alterado” e IC do modelo *Wolbachia/Cx. quinquefasciatus* Neotropical ainda permanecem desconhecidas.

Pretendendo investigar se as alterações reprodutivas observadas em *Cx. quinquefasciatus* estariam relacionadas com a superexpressão do gene *grauzone* provocada pela presença de *Wolbachia*, hipotetizamos que silenciando o gene em fêmeas infectadas, reproduziríamos nestas a ovogênese mais lenta de uma fêmea não-infectada que apresenta expressões de *grauzone* normais pela ausência de *Wolbachia*.

Propomos descrever o diferencial entre os dois parálogos de *grauzone* descrito na literatura, testar se a expressão das cópias parálogas do gene *grauzone* é diferencial entre *Cx. quinquefasciatus* infectados (*wPip*+) e não-infectados (*wPip*-). Propomos também silenciar, independentemente da cópia paróloga, o gene *grauzone* em fêmeas *wPip*+ e analisar possíveis alterações em sua aptidão reprodutiva. Porém devido à necessidade de substituição da colônia experimental de mosquitos e à alta variabilidade intraespecífica do gene *grauzone*, propomos também comparar filogeneticamente as variantes do gene *grauzone* na espécie *Cx. quinquefasciatus*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar se a alteração fenotípica de incompatibilidade citoplasmática (IC) observada na interação *Wolbachia-Cx. quinquefasciatus* está correlacionada à superexpressão do gene *grauzone*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a sequência dos parálogos CPIJ005623 e CPIJ015950 do gene *grauzone* descritos na literatura e detectar possíveis variações deste gene;
- b) Descrever o perfil de expressão dos parálogos do gene *grauzone* em fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* infectadas por *Wolbachia* (wPip+), no 4º dia após emergência e comparar com os níveis de expressão em fêmeas não-infectadas por *Wolbachia* (wPip-);
- c) Silenciar a expressão das cópias parálogas do gene *grauzone* em fêmeas wPip+, no 3º dia após emergência (dia anterior ao pico expressional) e verificar se ocorre redução de IC.

3 MÉTODOS

Figura 1 – Linha do tempo contextualizando experimentos e substituições de colônias realizadas durante o desenvolvimento do projeto entre os meses de 04/2014 e 09/2017.

3.1 Colônias de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*

Durante o desenvolvimento deste projeto, cultivamos três colônias de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*, nomeadas PIN, SELV e IBEX, expostas respectivamente a seguir.

3.1.1 Colônia PIN

A colônia de *Cx. quinquefasciatus* PIN, foi capturada nas margens do Rio Pinheiros/São Paulo em 1995 e mantidos no laboratório da Professora Alcira Tania Bijovsky de Katzin, no Departamento de Parasitologia de Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Em 2009, mosquitos desta colônia foram cedidos para estabelecimento de uma colônia no horto do Instituto Butantan, onde foram mantidos nas condições de temperaturas entre 25 °C e 28 °C com umidade relativa entre 65 % a 75 %. As larvas foram alimentadas com comida para peixes (*Sera® Vipar*, Heinsberg, Alemanha) e os adultos com provisão *ad libitum* de solução aquosa de sacarose a 10 % (p/v). Os indivíduos adultos eram mantidos dentro de gaiolas de tamanho de 40x40x40 cm dentro das quais, machos e fêmeas copulam livremente.

No início deste estudo a colônia PIN, ainda estabelecida neste laboratório, foi utilizada para experimentos essenciais para o desenvolvimento do projeto, por tanto há diversos experimentos citados abaixo com utilização desta colônia. Porém no início de 2016, a colônia PIN foi perdida por causa indeterminada (figura 1), e como os experimentos já estavam em andamento tivemos que obter outra colônia, SELV.

3.1.2 Colônia SELV

Mosquitos *Cx. quinquefasciatus* selvagens (SELV) foram coletados nas margens do Rio Pinheiros em diferentes campanhas decorridas no primeiro semestre de 2016 e foram identificados pela especialista Marcia Bicudo de Paula da Faculdade

de Saúde Pública. Utilizamos os critérios de criação da colônia anterior, porém estes mosquitos mostraram-se refratários aos procedimentos de colonização, como no repasto sanguíneo (realizados no período vespertino em razão dos hábitos noturnos do mosquito) que diversas vezes as fêmeas não realizavam o repasto e os poucos repastos realizados em algumas fêmeas apresentaram baixa produção de ovos. Mesmo não ocorrendo a estabilização da colônia, alguns experimentos foram realizados com estes mosquitos (figura 1).

Como o exíguo prazo não era viável para estabilização de uma colônia selvagem, decidimos procurar mosquitos *Cx. quinquefasciatus* já habituados com os processos de colonização, como é o caso da linhagem IBEX.

3.1.3 Colônia IBEX

Entramos em contato com o Professor José Bento Pereira, responsável pelo Laboratório de Referência Nacional da Rede MoReNAa (Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas) (Laficave) do Instituto de Biologia do Exército (IBEX - Rio de Janeiro) que muito gentilmente nos cedeu mosquitos *Cx. quinquefasciatus* coletados no Rio de Janeiro e mantidos há mais de 13 anos.

Como estes mosquitos já estavam adaptados à colonização, quando eles chegaram à nossas mãos, não apresentaram dificuldades em serem colonizados em nosso laboratório com as mesmas condições que utilizamos para as colônias PIN e para a temporária SELV.

3.2 Ética em uso animal

Para viabilizar a reprodução e obtenção de posteriores gerações de mosquitos, mosquitos fêmeas eram alimentadas mensalmente com sangue de camundondos BALB/c anestesiados com injeção intraperitoneal de 100 mg/kg do anestésico quetamina e 10 mg/kg do relaxante muscular xilazina, protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (28/nov/2013 - Nº 6574100516) e Comissão de Pesquisa e Ética e pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (04/dez/2013 - Protocolo 261A).

3.3 Teste de infecção por *Wolbachia*

A infecção de *Wolbachia* foi detectada na colônia PIN primeiramente com microscopia eletrônica¹⁷² e confirmada por meio de reação da polimerase em cadeia (PCR) do gene “*Wolbachia surface protein*” (*wsp*) (tabela 1), utilizando os iniciadores (oligonucleotídeo iniciador das reações) específicos para a amplificação de fragmento do gene *wsp*, pareando o supergrupo B de *Wolbachia*, 183 FO (5' AAGGAACCGAAGTTCATG 3') e 691 RE (5' AAAAATTAAACGCTACTCCA 3') nas condições de 94 °C por 2 minutos para desnaturação, seguidas de 40 ciclos de replicação de 1 minuto a 94 °C, 55 °C para a anelamento dos iniciadores de 1 minuto e 72 °C para a extensão da fita de DNA³.

Enviamos para a empresa BPI Biotecnologia (anexo A) amostras de DNA extraído de fêmeas em *pool* das colônias, PIN (para controle positivo), SELV e IBEX

para o teste de infecção por *Wolbachia*. A empresa realizou PCR dos fragmentos do gene “de proteína de superfície em *Wolbachia*” (*wsp*) e o gene “de proteína sensível à temperatura de filtragem Z em *Wolbachia*” (*ftsZ*) nas amostras (tabela 1), utilizando os iniciadores específicos para o fragmento de *wsp*, FO 5' GTCCAATARSTGATGAR GAAAC 3' e RE 5' CYGCACCAAYAGYRCTR TAAA 3' e *ftsZ*, FO 5' ATYATGGARCA TATAAARGATAG 3' e RE 5' TCAGYAATGGATTGATAT 3' com desnaturação a 94 °C por 2 minutos e submetidas a 37 ciclos de replicação de 30 segundos a 94 °C, anelamento dos iniciadores de 59 °C para *wsp* e 54 °C para *ftsZ* por 45 segundos e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C para a extensão da fita de DNA, finalizando com mais um ciclo de 10 minutos a 72 °C para concluir as extensões do DNA¹⁷⁴.

Tabela 1 – Lista de iniciadores utilizados no desenvolvimento deste projeto com respectivos experimentos e autores.

Nome	Experimento	Tamanho aproximado (pb)	Autor
<i>wsp</i> 183 e 691	Teste infecção por <i>Wolbachia</i> / Tratamento com tetraciclina	400	3
<i>wsp</i>	Teste infecção por <i>Wolbachia</i> / Tratamento com tetraciclina (anexo A)	600	174
<i>ftsZ</i>	Teste infecção por <i>Wolbachia</i> / Tratamento com tetraciclina (anexo A)	500	174

grau1	Amplificação <i>grauzone</i>	400	87
grau2 / GRAU-Int	RT-PCR / Amplificação <i>grauzone</i> / Adição promotor T7 / RNA dupla-fita / sequenciamento completo (BPI Biotecnologia, anexo C)	600	Stella Noguera Pereira e Dr. Lincoln Suesdek
MSP1	Adição promotor T7 / RNA dupla-fita	600	Dra. Margareth Capurro
Grau-Cq	Tentativa do sequenciamento completo <i>grauzone</i> (BPI Biotecnologia, anexo B)	1930	BPI Biotecnologia
Grau-Cq_Seq_1	Tentativa do sequenciamento completo <i>grauzone</i> (BPI Biotecnologia, anexo B)	677	BPI Biotecnologia
Grau-Cq_Seq_2	Tentativa do sequenciamento completo <i>grauzone</i> (BPI Biotecnologia, anexo B)	204	BPI Biotecnologia

---

Grau-cDNA	Sequenciamento completo <i>grauzone</i> (BPI Biotecnologia, anexo C)	1620	BPI Biotecnologia

---

Grau-deg-com cauda M13	Sequenciamento completo <i>grauzone</i> (BPI Biotecnologia, anexo C)	1620	BPI Biotecnologia

---

3.4 Tratamento com antibiótico para estabelecimento da colônia livre de *Wolbachia* (wPip-)

O tratamento para a desinfecção das colônias de *Cx. quinquefasciatus* ocorre como se segue: Na primeira semana após a emergência dos mosquitos, foram obtidos aleatoriamente, aproximadamente 400 mosquitos adultos (geração P), machos e fêmeas infectados por *Wolbachia* (wPip+) e foram mantidos normalmente com solução de sacarose a 10 % (p/v). Na semana seguinte, foi oferecida a mesma solução adicionada a 1 mg/ml (p/v) de cloridrato de tetraciclina em água tamponada (pH 7,0), sendo trocada todos os dias, por uma semana (modificado¹⁷⁵).

Durante os cinco dias seguintes do tratamento com antibiótico, as fêmeas foram mantidas com 10 % (p/v) de solução de sacarose e, após estes dias, foi oferecido alimentação sanguínea. A prole destes mosquitos (geração F1) quando adulta foi submetida a um novo tratamento com cloridrato de tetraciclina, como descrito anteriormente, e para as fêmeas foi oferecido alimentação sanguínea. Trinta fêmeas alimentadas foram separadas para postura individual e, após oviposição, sacrificadas para a obtenção do DNA (item 3.7.1). A efetividade do tratamento foi

confirmada por PCR de fragmentos dos genes *wsp* e *ftsZ*, utilizando os iniciadores descritos acima (item 3.3 e tabela 1) e as proles das fêmeas que mostraram-se livres de infecção foram agrupadas e, a partir delas, foi iniciada a colônia não-infectada por *Wolbachia*, que será chamada de *wPip*- a partir deste momento.

Esse procedimento é extremamente agressivo para os mosquitos, sendo recomendado e realizado apenas para colônias robustas. Portanto a colônia SELV não passou por esse processo, enquanto a colônia PIN passou por este processo algumas vezes durante a sua história, pelo menos 3 vezes durante o desenvolvimento deste projeto. A colônia IBEX foi submetida ao tratamento uma vez sendo que a desinfecção desta foi testada pela empresa BPI Biotecnologia que se utilizou dos mesmos procedimentos descritos no item 3.3.

3.5 Diferenciação dos parálogos do gene *grauzone* em *Cx. quinquefasciatus*

Para entendermos o diferencial entre os 2 parálogos de *grauzone* descritos pela literatura para *Cx. quinquefasciatus*⁸⁷, utilizamos as sequências XM_001847451 (correspondente ao parálogo CPIJ005623) e XM_001866304 (correspondente ao parálogo CPIJ015950) do banco de dados GenBank para as análises com as sequências transcritas (sem *intron* - DNA complementar) e para as análises com sequências gênicas (com *intron*) utilizamos as sequências CPIJ005623 e CPIJ015950 do banco de dados VectorBase e para os alinhamentos utilizamos a plataforma MultAlin.

3.6 Quantificação do gene *grauzone*

3.6.1 Extração de RNA

A extração do RNA total foi realizada com o reagente *Trizol*® (*Invitrogen*, Carlsbad, USA), seguindo normas do fabricante. Foram utilizadas fêmeas PIN *wPip*+, PIN *wPip*-, SELV *wPip*+ e IBEX *wPip*+ no 4º dia após a emergência, momento que corresponde ao descrito na literatura como pico de acúmulo de transcrito do gene *grauzone*⁸⁷ em *pool* de 10 fêmeas cada.

Todos os indivíduos foram homogeneizados em 500 µl de *Trizol*®, o RNA foi separado através da adição de 100 µl de clorofórmio seguida de 15 minutos de centrifugação a 4 °C a 12.000 RCF, após purificação com etanol 75 % o material foi ressuspensionado em 20 µl de água livre de nucleases.

3.6.2 Tratamento com DNase

Visando a eliminação de moléculas de DNA da amostra, os RNAs totais gerados anteriormente pelo método com *Trizol*® foram tratados com deoxyribonuclease I (*DNase I Amp Grade; Invitrogen*, Carlsbad, USA), onde 1 µg do RNA total gerado foi adicionada a 1 unidade de *Reaction Buffer DNase I 10x* (*Invitrogen*, Carlsbad, USA) e 1 µL *DNase I* para uma reação final de 10 µL. Cada reação foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, interrompida no gelo,

adicionado EDTA à concentração final de 2,5 mM e aquecido a 65 °C por 10 minutos para inativação da enzima.

3.6.3 Síntese da primeira fita de cDNA

Para a síntese da primeira fita do cDNA foi utilizado o *SuperScript II Reverse Transcriptase Kit* (Invitrogen, Carlsbad, USA) onde 2 µg do RNA tratado com *DNase* adicionado a 500 ng de Oligo (dT) (Invitrogen, Carlsbad, USA) e dNTPs 0,1 mM foi incubado a 65 °C por 5 minutos e rapidamente transferido para o gelo. Depois foi adicionado 4 µL de tampão 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375 mM. MgCl₂ 15 mM) a cada material e 2 µL de Ditiontreitol (DTT) 0,1 mM e incubados por 42 °C por 2 minutos. Por fim foi adicionado 200 unidades da enzima *SuperScript II RNase H-reverse Transcriptase*, seguido de nova incubação a 42 °C por 50 minutos. A inativação da enzima foi efetuada a 70 °C por 15 minutos.

3.6.4 RT-PCR semiquantitativa

Foi realizada reação de PCR a partir do material gerado na síntese da primeira fita de cDNA para verificação da qualidade do mesmo, contendo 2 µL de cDNA como molde, 10 µM de cada iniciador, 0,125 µL da enzima *OneTaq® DNA Polymerase*, 5 µL do *Buffer OneTaq GC Reaction* (que contém 5 % de DMSO) para uma reação final de 25 µL. Essa reação foi realizada em equipamento *Mastercycler Personal* (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) com os seguintes parâmetros de

ciclagem: 5 minutos a 94 °C para desnaturação inicial e 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 50 °C por 1 minuto seguido de 30 segundos a 68 °C e 5 minutos a 68 °C para a extensão final. Os iniciadores de sequência grau2 (FO 5' GGCGCGACGATCAAGC 3' e RE 5' GGCGCGTGGACCTCTT 3') têm como alvo o fragmento do gene *grauzone* de *Cx. quinquefasciatus* com aproximadamente 600 pb na região anterior do gene, por estarmos trabalhando com sequência de DNA complementar (tabela 1).

Posteriormente iríamos realizar o PCR em *Real-Time* porém este experimento foi prorrogado, uma vez que as padronizações e análises futuras deste PCR quantitativo poderiam ser prejudicadas pela recém-descoberta, em nossas análises, de variabilidade do gene *grauzone* dentro das populações de *Cx. quinquefasciatus* com as quais estávamos começando a trabalhar.

3.7. Geração RNA dupla-fita visando silenciamento do gene *grauzone* em fêmeas *Cx. quinquefasciatus* wPip+

3.7.1 Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizado utilizando o *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen, Valencia, USA) seguindo o manual do fabricante, independente da colônia, as amostras foram realizadas em *pool* de cinco fêmeas recém-sacrificadas, a não ser em testes de desinfecção, onde a extração foi realizada individualmente. Brevemente, foram adicionados 180 µl de *buffer* ATL e 20 µl de proteinase K estes foram incubados em 65 °C por 1 hora. Após a incubação 200 µl do *buffer* AL e 200 µl de etanol absoluto foram adicionados, a solução foi transferida

para a coluna do mesmo *kit*. Em seguida foram feitas lavagens com *buffer* AW1 e AW2, o material foi eluído com 200 µl de *buffer* AE e armazenados em freezer -20°C.

3.7.2 Amplificação de fragmento do gene *grauzone*

Após a geração do DNA na extração citada no item 3.7.1, foram realizadas reações de PCR de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* da colônia PIN com os iniciadores do trabalho existente com o gene *grauzone* descritos na literatura para esta espécie de mosquito⁸⁷ (tabela 1) grau1 (FO 5' TACAAGCTGTCGTGCGATGT 3' e RE 5' TGCTTCTTGAGGGAACCTTG 3'), como intuito de amplificação dos dois parálogos descritos para o gene *grauzone* em *Cx. quinquefasciatus*, uma vez que as sequências dos parálogos são bem semelhantes (como descrito no 4.4). Para cada reação foram utilizados 1 µL de DNA, 0,6 U da enzima *OneTaq® DNA Polymerase* (*New England Bio Labs*, Ipswich, USA), 5 µl de *OneTaq® GC Reaction Buffer* (que contém 5 % de DMSO), 10 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada iniciador e água Milli-Q para totalizar 25 µl com a ciclagem em *Mastercycler Personal* (*Eppendorf AG*, Hamburg, Germany) de 30 segundos a 94 °C para desnaturação inicial e 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 50 °C por 1 minuto seguido de 30 segundos a 68 °C e 30 segundos a 68 °C para a extensão final para a geração de um fragmento esperado de aproximadamente 400 pb.

3.7.3 Análise qualitativa de material

Para verificar a eficiência das amplificações realizadas por PCR foram realizadas eletroforeses em gel de agarose a 2 %. Foi utilizada cuba horizontal com solução Tris-acetado-EDTA (TAE) como tampão de corrida, por aproximadamente 40 minutos sob tensão elétrica de 80 V e corrente de 60 mA. Os géis foram corados com *SyBr safe* (Life Technologies, Carlsbad, USA) e fotografados em fotodocumentador digital UVP sob irradiação Ultravioleta de 300 nm.

3.7.4 Sequenciamento de fragmento do gene *grauzone*

Para confirmar se o produto de amplificação do fragmento de *grauzone* abrangia os parálogos e se possuíam similaridade genética ao gene descrito na literatura depositado no GenBank, realizamos o sequenciamento dos fragmentos a partir das amplificações realizadas com o DNA genômico de fêmeas PIN *wPip+* com o *BigDye kit* (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) conforme recomendação do fabricante e a leitura foi realizada na GENOMIC Engenharia Molecular.

3.7.5 Preparação de sequências e análises

Das sequências geradas pelo sequenciamento montamos os *contigs* com o auxílio do *software ChromasPro* e *Geneious 4.8.3*, as sequências-consenso foram comparadas aos dados do GenBank, traduzidas pelo *MEGA Software 7.0* e alinhadas pela plataforma MultAlin (disponível no link: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

3.7.6 Iniciadores para gene *grauzone*

Como os iniciadores que adquirimos da literatura não funcionaram para amplificação de ambos os parálogos do gene *grauzone* em *Cx. quinquefasciatus*, desenhamos com o auxílio do *software Primer3*, novos iniciadores grau2, tabela 1, (FO 5' GGCGCGACGATCAAGC 3' e RE 5' GGCGCGTGGACCTCTT 3') que estão localizados na região mais próxima da região 5' do gene, com um fragmento de aproximadamente 600 pb, utilizando como base o genoma de *Cx. quinquefasciatus* depositado no banco de dados online GenBank¹⁶⁸. Para as ciclagens foram utilizados 1 µL de DNA como molde, 0,2 µM de cada iniciador, 0,6 U da enzima *OneTaq® DNA Polymerase*, 5 µL do *OneTaq® GC Reaction Buffer* (que contém 5% de DMSO) e água Milli-Q para totalizar 25 µl. Essa reação foi realizada em equipamento *Mastercycler Personal* (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) com os seguintes parâmetros de ciclagem: 5 minutos a 95 °C para desnaturação inicial e 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 59 °C por 1 minuto seguido de 30 segundos a 68 °C e 5 minutos a 68 °C para a extensão final.

3.7.7 Sequenciamento do fragmento do gene *grauzone*

A amplificação gerada no item 3.7.6 foi observada utilizando os parâmetros do item 3.7.3 e para confirmar se o produto de amplificação do gene *grauzone* realmente possuía similaridade genética ao gene *grauzone* descrito na literatura e depositado no banco de dados online GenBank, realizamos o sequenciamento dos *amplicons*, utilizando do mesmo material genético (PIN) e as análises descritas no item 3.7.5.

3.7.8 Amplificação do fragmento do gene *grauzone* com promotor T7

Para a produção do RNA dupla-fita do experimento de silenciamento de expressão, é necessário que o fragmento do gene seja adicionado a um promotor T7, por isso o fragmento gerado na reação de PCR anterior, foi submetido a nova PCR com os novos iniciadores para o gene *grauzone* grau2 contendo a sequência do promotor de polimerase T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA 3') nas extremidades 5', utilizando as condições de amplificação do item 3.7.6.

3.7.9 Purificação do fragmento do gene *grauzone* com T7

Todos os produtos da amplificação do fragmento obtidos do gene *grauzone* foram purificados para eliminar qualquer impureza gerada durante a amplificação do fragmento com o promotor T7. A purificação foi realizada com o *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen, Valencia, USA), seguindo o manual do fabricante.

3.7.10 Produção de RNA dupla-fita

Na produção do RNA dupla-fita (dsRNA) foi utilizado o *MEGAscript RNAi kit* (Life Technologies, Carlsbad, USA) e para a purificação o *RNeasy MinElute Cleanup* (Qiagen, Valencia, USA) seguindo os manuais dos fabricantes. O gene codificador de proteína de superfície de membrana de *Plasmodium falciparum* com adição do T7 na extremidade 5' (MSP1 - FO 5' TAATACGACTCACTATAGGCTGATGCAAGCGAT TCAGAT 3' e RE 5' TAATACGACTCACTATAGGGTGTATTTCCAGA ATTGGCC 3' - tabela 1) clonado em plasmídeo gentilmente cedido pelo laboratório Mosquitos Geneticamente Modificados, seria utilizado como controle negativo no silenciamento.

Como o projeto apresentou mudanças nas populações trabalhadas e consequentemente passamos a lidar com uma gama de variantes de *grauzone* maior, o experimento de silenciamento e as análises que seriam realizadas a partir deste foram pausadas para a melhor esclarecimento das diferenças entre as populações.

3.8 Sequenciamento do gene *grauzone* completo

Devido a necessidade de substituições de populações de mosquitos geramos a hipótese de que a sequência de *grauzone* da nova colônia IBEX seja distinta de outras populações de mosquitos, tanto quanto à anterior PIN, quanto às já estudadas de outras localidades como Europa, Ásia e Norte-americano¹⁶⁸.

Para esta confirmação enviamos amostras de DNA em *pool* de fêmeas PIN wPip-, SELV wPip+ e IBEX wPip+ para a empresa BPI Biotecnologia para a amplificação e leitura da sequência completa deste gene (ambos parálogos) utilizando amostras das colônias PIN, SELV e IBEX para verificarmos os possíveis polimorfismos populacionais.

A empresa BPI Biotecnologia utilizou primeiramente para a abordagem de sequenciamento completo do gene, iniciadores desenhados com base na sequência genômica de *Cx. quinquefasciatus*¹⁶⁸ (tabela 1), objetivando a amplificação de ambos parálogos do gene *grauzone* (tentativa descrita no anexo B).

Porém esta abordagem utilizada pela BPI Biotecnologia não gerou amplificações dos fragmentos do gene com tamanho de cobertura esperado (fotografia dos géis de agarose com as amplificações no anexo B). Os amplicons apresentaram-se muito maiores do que o esperado, provavelmente em consequência das variedades encontradas nas amostras utilizadas. Por isso nova tentativa foi realizada pela mesma empresa BPI Biotecnologia, adquirindo 2 novos iniciadores (tabela 1) com o auxílio do *software Primer3*, 1- iniciadores que abrangem o gene completo, onde os iniciadores anelam com a região ATG inicial do gene e a região final (*stop codon*); 2- iniciadores degenerados correspondente a mesma porção do par anterior, porém apresentando a adição da cauda universal M13 na porção 5' para maior especificidade no sequenciamento (Para sequências dos iniciadores verificar

anexo C). Além dos iniciadores degenerados, a empresa BPI também utilizou os iniciadores grau2, já descrito acima no item 3.7.6, como amplificadores internos do gene (tabela 1).

As sequências foram preparadas seguindo o item 3.7.5 e os dendrogramas foram montados com a plataforma BLAST, alinhamentos disponibilizados pela própria plataforma.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Colônias de mosquitos *Cx. quinquefasciatus*

4.1.1 Colônia PIN

A colônia coletada no Rio Pinheiros, São Paulo, manteve-se em nosso laboratório dividida em duas colônias distintas: uma infectada por *Wolbachia* e outra livre de infecção por *Wolbachia*. Ao longo da existência desta colônia ocorreram aproximadamente 5 contaminações de infecção por *Wolbachia* na colônia não-infectada. A cada contaminação o tratamento com tetraciclina ocorria novamente e em vista da necessidade da robustez da colônia, gerações de mosquitos eram exigidas com mais rapidez aumentando os endocruzamentos totais, que podem ter provocado o enfraquecimento dos mosquitos, causando a perda da colônia.

4.1.2 Colônia SELV

A colônia SELV foi coletada em ambiente bem hostil (Rio Pinheiros na Usina Elevatória da Traição) em campanhas durante o segundo trimestre de 2016, porém não foi capaz de ser estabelecida com robustez, uma vez que os mosquitos coletados, após a emergência para adultos, apresentaram rejeição no momento do repasto sanguíneo e a postura de ovos. Mesmo com o estabelecimento de postura

dos ovos em águas poluídas do Rio Pinheiros, as larvas não cresciam fortes o suficiente apresentando dificuldades na emergência pupal, portanto descartamos o uso desta colônia.

4.1.3 Colônia IBEX

Os mosquitos gentilmente enviados pelo Professor José Bento Pereira, responsável pelo Laboratório de Referência Nacional da Rede MoReNAa (Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas) (Laficave) do Instituto de Biologia do Exército (IBEX - Rio de Janeiro) já estavam acostumados com a colonização fazendo com que a estabilização fosse realizada com facilidade. Os mosquitos não apresentaram dificuldades no repasto sanguíneo, na postura de ovos e na emergência pupal, sendo mantida com sucesso em nosso laboratório.

4.2. Teste de infecção por *Wolbachia*

A partir da amplificação do fragmento do gene *wsp* na colônia PIN, realizado previamente pelo colega de laboratório Fábio de Almeida, foi possível o sequenciamento para a verificação dos iniciadores do gene³ (tabela 1), e foi constatado que a *Wolbachia* infectante desta população é a cepa “B”⁴⁸.

Com a perda da colônia PIN e a utilização de novas colônias, enviamos para a empresa BPI Biotecnologia amostras das colônias PIN, SELV e IBEX para a amplificação de fragmentos dos genes *wsp* e *ftsZ*¹⁷⁴ (tabela 1). Amostra preservada

de DNA da colônia PIN foi enviada como controle positivo para infecção, uma vez que já possuíamos essa informação e as SELV e IBEX para o diagnóstico.

A BPI Biotecnologia nos disponibilizou o relatório dos testes (mais detalhes, anexo A) onde verificamos que as colônias se mostravam infectadas pela bactéria. Na figura 2 (fotografia recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A) observamos a amplificação do fragmento para o gene *wsp* nas três colônias e na figura 3 (fotografia recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A) observamos a amplificação das colônias pelo fragmento do gene *ftsZ*. Para ambas amplificações foram utilizadas amostras de DNA em *pool* de 10 mosquitos de cada colônia.

Figura 2 - Fotografia de gel de agarose enviado pela BPI Biotecnologia apresentando a positividade de amplificações do fragmento do gene *wsp* para amostras das três colônias de mosquitos. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA *Ladder*; amostras: PIN, SELV e IBEX; (+): controle positivo da reação, amostra PIN; Bco: controle negativo da reação, água Milli-Q. Esta fotografia foi recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A.

Figura 3 - Fotografia de gel de agarose enviado pela BPI Biotecnologia apresentando a positividade de amplificações do fragmento do gene *ftsZ* para amostras das três colônias de mosquitos. Da esquerda para direita: amostras: PIN, SELV e IBEX; (+): controle positivo da reação, amostra PIN; Bco: controle negativo da reação, água Milli-Q; Peso molecular 100bp DNA Ladder. Esta fotografia foi recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A

4.3 Tratamento com antibiótico para estabelecimento da colônia

wPip-

A colônia PIN passou pelo tratamento com antibiótico algumas vezes durante sua história, pelo menos 3 vezes durante o desenvolvimento deste projeto e como podemos verificar na figura 4, gentilmente cedida pelo colega Fábio de Almeida, o resultado de um dos tratamentos da colônia PIN. Para esta figura foram utilizados os iniciadores *wsp*³ (tabela 1), amostra positiva (+) corresponde à amplificação da colônia PIN infectada e as amostras numeradas (1-17) são amostras individuais de fêmeas que passaram pelo tratamento, não demonstrando amplificações do gene, o

que demonstra que o tratamento funcionou nestas fêmeas e que as proles das mesmas podem ser unidas para a formação da colônia livre de infecção (wPip-).

Figura 4 - Fotografia de gel de agarose gentilmente cedida pelo colega Fábio de Almeida apresentando a eficiência do tratamento de tetraciclina para a colônia PIN para a desinfecção de *Wolbachia*. As amostras são DNA de fêmeas *Cx. quinquefasciatus* individuais submetidas a amplificação do fragmento do gene *wsp* após o tratamento. Por ordem: 100bp DNA Ladder, amostras: 1 a 17, DNA de fêmeas que sofreram o tratamento, não demonstrando amplificação para o gene *wsp*; +: controle positivo da reação, amostra PIN infectado; -: controle negativo da reação, água Milli-Q.

A temporária colônia de SELV não foi submetida a este tratamento, em virtude da agressividade do tratamento e da fragilidade da colônia.

Já a colônia IBEX foi submetida ao tratamento e amostras individuais de DNA das fêmeas que foram submetidas foram enviados para a empresa BPI Biotecnologia para verificação do tratamento com amplificação os genes de *Wolbachia wsp* e *ftsZ*¹⁷⁴ (tabela 1). Podemos observar no relatório enviado (anexo A) que este tratamento não apresentou sucesso em eliminar *Wolbachia*. Nas figuras 5 e 6 podemos observar

imagens recortadas para melhor entendimento as amplificações dos fragmentos dos genes *wsp* e *ftsZ*, respectivamente (vide imagem intacta no anexo A). Para ambas amplificações foram utilizadas as mesmas amostras de DNA (fêmeas submetidas ao tratamento) e para controle positivo foi utilizada amostra da colônia PIN.

Figura 5 - Fotografia de gel de agarose enviado pela BPI Biotecnologia apresentando o insucesso do tratamento de tetraciclina na colônia IBEX, onde as amostras individuais de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* mostraram-se positivas na amplificação do gene *wsp*. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA *Ladder*; amostras: 9, 14, 15, 21, 30, 32, 35, 36; (+): controle positivo da reação, amostra PIN infectada; Bco: controle negativo da reação, água Milli-Q. Esta fotografia foi recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A.

Figura 6 - Fotografia de gel de agarose enviado pela BPI Biotecnologia apresentando o insucesso do tratamento de tetraciclina na colônia IBEX, onde as amostras individuais de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* mostraram-se positivas na amplificação do gene *ftsZ*. Da esquerda para direita: amostras: 9, 14, 15, 21, 30, 32, 35, 36; (+): controle positivo da reação, amostra PIN infectada; Bco: controle negativo da reação, água Milli-Q; Peso molecular 100bp DNA *Ladder*. Esta fotografia foi recortada para melhor entendimento; vide imagem intacta no anexo A.

A diferença de intensidade entre as bandas observadas nas figuras 5 e 6 pode dever ao fato de a densidade da infecção por *Wolbachia* ser variável entre indivíduos, como já reportado na literatura³⁰. Suspeitamos que o tratamento não tenha funcionado devido à possível baixa qualidade da tetraciclina que utilizamos e não a comprometimentos da colônia. Por isso, foi adquirida nova tetraciclina para eliminação da desconfiança e o tratamento está sendo realizado novamente pelo grupo técnico deste laboratório para a geração de colônia de *Cx. quinquefasciatus* livre da infecção por *Wolbachia*.

4.4 Diferenciação dos parálogos do gene *grauzone* em *Cx. quinquefasciatus*

Utilizando as sequências depositadas no GenBank, em sua forma transcrita (DNA complementar, cDNA) para análise dos parálogos de *grauzone*, conseguimos observar (figura 7) o fragmento diagnóstico de 56 pb em destaque verde como foi descrito na literatura⁸⁷ entre os nucleotídeos 994 e 1050, em destaque rosa, vemos uma deleção entre os dois parálogos e em azul nos nucleotídeos 52, 513 e 1113, substituições de nucleotídeos.

Figura 7 - Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin dos parálogos do gene *grauzone* em mosquitos *Cx. quinquefasciatus* CPIJ005623 e CPIJ015950 em suas formas transcritas. Em destaque verde encontra-se o fragmento diagnóstico entre os parálogos, em rosa a inserção de um nucleotídeo no parálogos CPIJ005623 e em azul as substituições nucleotídicas.

Quando comparamos as sequências de cada parálogo em suas formas transcritas ou não-transcritas (DNA genômico e DNA complementar), verificamos que ambos parálogos apresentam *introns*. Na figura 8, observamos o alinhamento das sequências de DNA genômico e DNA complementar do parálogo CPIJ005623, e verificamos em destaque azul a presença de um *intron* entre os nucleotídeos 1402 e 1462, totalizando 60 pb.

Figura 8 - Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin do parálogo CPIJ005623 na sua forma transcrita e genômica, apresentando em destaque azul o *intron* deste parálogo.

Já quando comparamos as formas DNA genômico e DNA complementar do parálogo CPIJ015950, figura 9, verificamos a presença de dois *introns*, um em destaque azul e outro em verde.

O *intron* destacado em azul, localizado entre os nucleotídeos 1401 e 1461, corresponde ao *intron* verificado no outro parálogo (também em azul, figura 8). O deslocamento de um nucleotídeo quando comparamos os dois *introns* ocorre devido

a deleção que observamos quando comparamos os dois parálogos (Figura 7, destaque rosa).

O *intron* em verde que ocorre entre os nucleotídeos 994 e 1050, é o que observamos na figura 7 como fragmento diagnóstico dos parálogos. Esse exato fragmento ocorre no parálogo CPIJ005623, porém como um fragmento de *exon*, e não de *intron* como observamos no parálogo CPIJ015950, por isso quando comparamos as formas transcritas dos parálogos, este fragmento se destaca.

Figura 9 - Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin do parálogo CPIJ015950 na sua forma transcrita e genômica, apresentando em destaque azul e verde os *introns* deste parálogo.

Quando comparamos os parálogos em suas formas genômicas (figura 10) conseguimos observar que não ocorre nenhum fragmento diagnóstico entre os parálogos, apenas a deleção observada anteriormente (destaque rosa, figura 7) e duas deleções uma em cada parálogo (destaque amarelo).

Figura 10 - Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin dos parálogos do gene *grauzone* em mosquitos *Culex quinquefasciatus* CPIJ005623 e CPIJ015950 em suas formas genômicas. Em destaque rosa e amarelo as inserções/deleções que ocorrem entre os parálogos.

Então esses parálogos são diferenciados apenas em suas formas transcritas em DNA complementares, sem a presença dos *introns*. Porém não podemos concluir

que o fragmento diagnóstico seja realmente um *intron*, uma vez que mais estudos sobre predições de *exons* e *introns* se fazem necessários. Como iremos trabalhar com ambos parálogos no gene *grauzone* e utilizaremos formar transcritas (DNA complementar) e não-transcritas (DNA genômico), iremos focar nossos estudos de amplificação gênica na região próxima à extremidade 5', entre os nucleotídeos 1 e 990, anterior ao fragmento diagnóstico.

4.5 Quantificação da expressão do gene *grauzone*

4.5.1 Extração de RNA

RNA total de fêmeas em *pool* de *Cx. quinquefasciatus* wPip+ PIN e wPip- PIN no quarto dia após a emergência pupal⁸⁷, wPip+ SELV e wPip+ IBEX foi extraído em quantidades ótimas de aproximadamente 1.000 ng/μL por *pool*.

4.5.2 RT-PCR semiquantitativa

Após tratamento com DNase as amostras anteriores foram submetidas à síntese da primeira fita de cDNA, como podemos observar na figura 11, as amplificações das amostras com os iniciadores de *grauzone* grau2 (tabela 1), que amplifica a região entre os nucleotídeos 335 e 905 aproximadamente, para amplificação dos dois parálogos.

Cada poço corresponde a um *pool* de 10 mosquitos, onde poço 1 é amostra PIN wPip+, poço 2 PIN wPip-, poço 3 wPip+ SELV e poço 4 wPip+ IBEX. Podemos observar levemente que a amostra PIN wPip- apresentou-se um pouco mais fraca quando comparada com as outras amostras wPip+. Acreditamos que isso seja devido ao fato descrito na literatura⁸⁷ do aumento dos acúmulos de transcritos do gene *grauzone* quando os mosquitos apresentam infecção por *Wolbachia*.

Figura 11 - Fotografia de gel de agarose apresentando a amplificação do fragmento de *grauzone* com iniciadores grau2 em amostras de DNA complementar em *pool* de amostras das colônias PIN wPip+ e wPip-, SELV wPip+ e IBEX wPip+ com aproximadamente 600 pb. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA *Ladder*; amostras: 1: PIN wPip+, 2: PIN wPip-, 3: SELV wPip+, 4: IBEX wPip+.

A PCR quantitativa Real-Time não foi realizada pois as padronizações e análises futuras deste PCR quantitativo poderiam ser prejudicadas pela variação do gene *grauzone* dentro das populações de *Cx. quinquefasciatus* que estávamos começando a trabalhar.

4.6 Geração RNA dupla-fita do gene *grauzone* em fêmeas *Cx. quinquefasciatus* wPip+

4.6.1 Amplificação de fragmento do gene *grauzone* por grau1

Após a extração de DNA genômico de amostras em *pool* de mosquitos recém-sacrificados da colônia PIN, realizamos amplificação do fragmento do gene *grauzone* a partir dos iniciadores grau1 já descritos na literatura⁸⁷ (tabela 1). Como observamos na figura 12 ocorreu amplificação com tamanho esperado de aproximadamente 400 pb.

Figura 12 - Fotografia de gel de agarose apresentando a amplificação do fragmento de gene *grauzone* com iniciadores grau1 em amostras em *pool* de DNA genômico de amostras PIN wPip+ com aproximadamente 400 pb. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA *Ladder*, amostras: 1, 2 e 3 diferentes amostras em *pool* de amostras PIN wPip+.

4.6.2 Sequenciamento de fragmento do gene *grauzone* por *grau1*

O produto da amplificação anterior foi sequenciado para confirmar se o gene amplificado era de fato *grauzone*. O resultado foi a geração de uma sequência de 373 pb que quando comparada com as sequências depositadas no banco de dados GenBank gerou identidade, como observamos na figura 13, de 98 % com as sequências XM_001847451 (A) e XM_001866304 (B), correspondentes aos parálogos CPIJ005623 e CPIJ015950, respectivamente.

A *Culex quinquefasciatus* transcription factor grauzone, mRNA

Sequence ID: [XM_001847451.1](#) Length: 1560 Number of Matches: 1

Range 1: 669 to 1041 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
645 bits(349)	0.0	365/373(98%)	0/373(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTGCGATGTTTGC	GTGCGATGTTTGC		60
Sbjct 669	GTGCGATGTTTGC	GTGCGATGTTTGC		728
Query 61	CGTGACACGAGCGGGCTATCTCAAGTGTGCAACAAGAAGATCTACAAAAAGTGCTG	CGTGACACGAGCGGGCTATCTCAAGTGTGCAACAAGAAGATCTACAAAAAGTGCTG		120
Sbjct 729	CGTGACACGAGCGGGCTATCTCAAGTGTGCAACAAGAAGATCTACAAAAAGTGCTG	CGTGACACGAGCGGGCTATCTCAAGTGTGCAACAAGAAGATCTACAAAAAGTGCTG		788
Query 121	GATGATTGAGCACATTCAACTGCATTTGAATCCGGACGCGTTCATTGTGCACTTTGTA	GATGATTGAGCACATTCAACTGCATTTGAATCCGGACGCGTTCATTGTGCACTTTGTA		180
Sbjct 789	GATGATTGAGCACATTCAACTGCATTTGAATCCGGACGCGTTCATTGTGCACTTTGTA	GATGATTGAGCACATTCAACTGCATTTGAATCCGGACGCGTTCATTGTGCACTTTGTA		848
Query 181	CAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAGGTCCACGCGCCGGA	CAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAGGTCCACGCGCCGGA		240
Sbjct 849	CAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAGGTCCACGCGCCGGA	CAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAGGTCCACGCGCCGGA		908
Query 241	AGAGAACCGCCACTTCAAGTGCAGAACTGCTTCAAAACGTTCTGTGTCACGCCCCTCT	AGAGAACCGCCACTTCAAGTGCAGAACTGCTTCAAAACGTTCTGTGTCACGCCCCTCT		300
Sbjct 909	AGAGAACCGCCACTTCAAGTGCAGAACTGCTTCAAAACGTTCTGTGTCACGCCCCTCT	AGAGAACCGCCACTTCAAGTGCAGAACTGCTTCAAAACGTTCTGTGTCACGCCCCTCT		968
Query 301	CAACGCCACATCATGGTCGCGCACGGTTCGTCGCGTGTCTCAATGTCCAAAGTCCT	CAACGCCACATCATGGTCGCGCACGGTTCGTCGCGTGTCTCAATGTCCAAAGTCCT		360
Sbjct 969	CAACGCCACATCATGGTCGCGCACGGTTCGTCGCGTGTCTCAATGTCCAAAGTCCT	CAACGCCACATCATGGTCGCGCACGGTTCGTCGCGTGTCTCAATGTCCAAAGTCCT		1028
Query 361	CGCTTCGCAAGGT	CGCTTCGCAAGGT		373
Sbjct 1029	CGCTTCGCAAGGT	CGCTTCGCAAGGT		1041

B *Culex quinquefasciatus* transcription factor grauzone, mRNA

Sequence ID: [XM_001866304.1](#) Length: 1503 Number of Matches: 1

Range 1: 669 to 994 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
558 bits(302)	3e-155	318/326(98%)	0/326(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTGCGATGTTTGC	GTGCGATGTTTGC		60
Sbjct 669	GTGCGATGTTTGC	GTGCGATGTTTGC		728
Query 61	CGTGACACGAGCGGGCTATCTCAAGTGTGCAACAAGAAGATCTACAAAAAGTGCTG	CGTGACACGAGCGGGCTATCTCAAGTGTGCAACAAGAAGATCTACAAAAAGTGCTG		120
Sbjct 729	CGTGACACGAGCGGGCTATCTCAAGTGTGCAACAAGAAGATCTACAAAAAGTGCTG	CGTGACACGAGCGGGCTATCTCAAGTGTGCAACAAGAAGATCTACAAAAAGTGCTG		788
Query 121	GATGATTGAGCACATTCAACTGCATTTGAATCCGGACGCGTTCATTGTGCACTTTGTA	GATGATTGAGCACATTCAACTGCATTTGAATCCGGACGCGTTCATTGTGCACTTTGTA		180
Sbjct 789	GATGATTGAGCACATTCAACTGCATTTGAATCCGGACGCGTTCATTGTGCACTTTGTA	GATGATTGAGCACATTCAACTGCATTTGAATCCGGACGCGTTCATTGTGCACTTTGTA		848
Query 181	CAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAGGTCCACGCGCCGGA	CAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAGGTCCACGCGCCGGA		240
Sbjct 849	CAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAGGTCCACGCGCCGGA	CAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAGGTCCACGCGCCGGA		908
Query 241	AGAGAACCGCCACTTCAAGTGCAGAACTGCTTCAAAACGTTCTGTGTCACGCCCCTCT	AGAGAACCGCCACTTCAAGTGCAGAACTGCTTCAAAACGTTCTGTGTCACGCCCCTCT		300
Sbjct 909	AGAGAACCGCCACTTCAAGTGCAGAACTGCTTCAAAACGTTCTGTGTCACGCCCCTCT	AGAGAACCGCCACTTCAAGTGCAGAACTGCTTCAAAACGTTCTGTGTCACGCCCCTCT		968
Query 301	CAACGCCACATCATGGTCGCGCACG	CAACGCCACATCATGGTCGCGCACG		326
Sbjct 969	CAACGCCACATCATGGTCGCGCACG	CAACGCCACATCATGGTCGCGCACG		994

Figura 13 - Alinhamentos realizados na plataforma BLAST do sequenciamento de amostra de DNA genômico da colônia PIN de amplificação do gene *grauzone* grau1 com identidade de 98 % com os acessos XM_001847451 e XM_001866304, correspondentes aos parálogos de *grauzone* observados em *Cx. quinquefasciatus* CPIJ005623 e CPIJ015950, respectivamente. A - Query: amplificado de grau1; Sbjct: número de acesso GenBank XM_001847451 (CPIJ005623); B - Query: amplificado de grau1; Sbjct: número de acesso GenBank XM_001866304 (CPIJ015950).

Porém podemos observar que o alinhamento com o parálogo CPIJ015950 não foi eficiente na porção 3' da sequência por aproximadamente 50 pb, para entendermos esta falha identificamos a localização dos iniciadores adquiridos (destaque azul, figura 14) e verificamos que o iniciador “reverse”, está localizado na região do fragmento diagnóstico de parálogos. Como foi exposto no item 4.4 (figura 9), este fragmento é diagnóstico nas sequências transcritas do gene, porém a plataforma BLAST realiza seus anelamentos com sequências transcritas de *grauzone* e como nossa amostra foi gerada de DNA genômico, então o iniciador “reverse” apresentou amplificação, porém no alinhamento pela plataforma BLAST não conseguiu fazer o anelamento correto.

Figura 14 - Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin dos parálogos transcritos do gene *grauzone* em mosquitos *Cx. quinquefasciatus* CPIJ005623 e CPIJ015950. Em destaque amarelo encontra-se o fragmento diagnóstico entre os parálogos e em azul a localização os iniciadores grau1.

Para verificarmos se a dissimilaridade de 2 % entre a sequência que obtivemos por sequenciamento e as sequências de parálogos *grauzone* depositadas no GenBank resultava diferença significativa na produção da proteína, a sequência gerada foi transcrita e traduzida pelo *MEGA Software 7.0* e quando analisada na plataforma BLAST mostrou-se 100 % idêntica a sequência XP_001847503 (A - CPIJ005623) e 97 % com a sequência XP_001866339 (B - CPIJ015950), ambas denominadas “fator de transcrição *grauzone* de *Culex quinquefasciatus* depositadas no GenBank como observamos nos alinhamentos da figura 15.

Figura 15 - Alinhamentos realizados na plataforma BLAST da sequência proteica do sequenciamento da amostra de DNA colônia PIN com amplificação

do fragmento do gene *grauzone* grau1 com identidade de 100 % com o acesso XP_001847503, correspondente ao parálogo CPIJ005623 e 97 % com o acesso XP_001866339, correspondente ao parálogo CPIJ015950. A - Query: amplificado de grau1; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001847503 (CPIJ005623) B - Query: amplificado de grau1; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001866339 (CPIJ015950).

Devido a falha no alinhamento com a amostra de DNA genômico e a sequência depositada transcrita, o alinhamento proteico também apresentou uma falha na região C-terminal da sequência, correspondente à região não-alinhada na figura 14 – B.

O fato do iniciador estar inserido no fragmento diagnóstico dos parálogos não seria um problema se fossemos trabalhar apenas com DNA genômico, porém este iniciador não poderia ser utilizado com amostras transcritas, pois o iniciador “*reverse*” não amplificaria com eficiência os dois parálogos. Portanto decidimos desenhar outros iniciadores que anelam na região 5’ ao fragmento diagnóstico dos parálogos (item 4.6.3).

4.6.3 Iniciadores grau2 para gene *grauzone*

Os novos iniciadores desenhados com o auxílio do *software Primer3*, grau2 (tabela 1) anelam na porção 5’ anterior a região do fragmento diagnóstico do gene, como podemos observar no alinhamento apresentado na figura 16.

Figura 16 - Resultado do alinhamento realizado pela plataforma MultAlin dos parálogos transcritos do gene *grauzone* em mosquitos *Cx. quinquefasciatus* CPIJ005623 e CPIJ015950. Em destaque amarelo encontra-se o fragmento diagnóstico entre os parálogos e em verde a localização os iniciadores grau2.

A amplificação do gene *grauzone* para *Cx. quinquefasciatus* a partir das amostras de DNA genômico da colônia PIN, os iniciadores grau2 gera um fragmento de tamanho esperado de aproximadamente 600 pb e também foram utilizados nas amostras das colônias SELV e IBEX, ambas amplificando um fragmento de aproximadamente 600pb, como esperado, do gene *grauzone* como podemos observar na figura 17.

Figura 17 - Fotografia de gel de agarose apresentando o fragmento do gene *grauzone* amplificado com iniciadores grau2 em amostras de *pool* de DNA genômico de mosquitos da colônia PIN, SELV e IBEX com aproximadamente 600 pb. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA *Ladder*, amostras: 1: pool de mosquitos PIN, 2: pool de mosquitos SELV e 3: pool de mosquitos IBEX.

4.6.4 Sequenciamento do fragmento do gene *grauzone* por grau2

O sequenciamento do fragmento do gene *grauzone* na colônia PIN com os iniciadores grau2 gerou uma sequência de 583 pb, quando analisada na plataforma BLAST gera 97 % de similaridade com as sequências XM_001847451 (A) e XM_001866304 (B) (“fator de transcrição *grauzone* de *Culex quinquefasciatus*”), correspondentes aos parálogos CPIJ005623 e CPIJ015950, respectivamente, como podemos observar na figura 18.

A *Culex quinquefasciatus* transcription factor grauzone, mRNA

Sequence ID: [XM_001847451.1](#) Length: 1560 Number of Matches: 1

Range 1: 334 to 905 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
968 bits(524)	0.0	557/573(97%)	1/573(0%)	Plus/Plus
Query 11	GGCGCGACGATCAAGCAGGAGTTTATTAAAGCACGAGCCGACGAAACGGAGTGGGTCGGG	70		
Sbjct 334	GGCGCGACGATCAAGCAGGAGTTTATTAAAGCACGAACCGACGAGACGGAGTGGGTCGGG	393		
Query 71	GTGGACACTTATTGTGAAACGCGGATTACGGCGATCAGGATTGGGTGCTGGATGATGGG	130		
Sbjct 394	GTGGACACTTATTGTGAGACGCGGATTACGGCGATCAGGACTGGGTGCTGGATGATGGG	453		
Query 131	GAAGGAGGAAGAGGATGGGAGGGTGACGTTACGGATTCAATGAGTGAGGGTGAGGGCGA	190		
Sbjct 454	G-AGGAGGTAGAGGATGGGAGGGTGACGTTACGGATTCAATGAGTGATGGTGAGGGCGA	512		
Query 191	AGAGGGGACGGAGTTTGTGACGACGTTAAACCGAAGCGGAAGTATACGAAGAGGAAGGA	250		
Sbjct 513	AGAGGGGACGGAGTTTGTGACGACGTTAAACCGAAGCGGAAGTATACGAAGAGGAAGAA	572		
Query 251	CCGGTTGATGGCTAAGAAACCAAAAATTATCAAGAAGGAACAGGATTTGAATAATCCGCC	310		
Sbjct 573	CCGGTTGATGGCTAAGAAACCAAAAATTATCAAGAAGGAACAGGATTTGGATAATCCGCC	632		
Query 311	GATTGACAAGCTGGTTCTGCAGCACTACAAGCTGTCGTGCGATGTTTGCAGCGAACCCT	370		
Sbjct 633	GATTGACAAGCTGGTTCTGCAGCACTACAAGCTGTCGTGCGATGTTTGCAGCGAACCCT	692		
Query 371	GGAAGACTTCACCGAGCTGCGGAAGCACTACAAGTACGTACACAACGAGCCGGGTATCT	430		
Sbjct 693	GGAAGATTTACCGAGCTGCGGAAGCACTACAAGTACGTACACAACGAGCCGGGTATCT	752		
Query 431	CAAGTGTTCGAACAAGAAATCTACAAAAAGTCTGGATGATTGAGCACATTCAACTGCA	490		
Sbjct 753	TAAGTGTTCGAACAAGAAATCTACAAAAAGTCTGGATGATTGAGCACATTCAACTGCA	812		
Query 491	TTTGAATCCGGACGCGTTCCATTGTGCACTTTGTAAACAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGT	550		
Sbjct 813	TTTGAATCCGGACGCGTTCCATTGTGCGCTCTGCAACAAAAGCTACAGCTCGAGCAAAGT	872		
Query 551	TCTTAAAGAACACACCAAAGAGGTCCACGCGCC	583		
Sbjct 873	TCTTAAAGAACACACCAAAGAGGTCCACGCGCC	905		

B *Culex quinquefasciatus* transcription factor grauzone, mRNA

Sequence ID: [XM_001866304.1](#) Length: 1503 Number of Matches: 1

Range 1: 334 to 905 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
963 bits(521)	0.0	556/573(97%)	1/573(0%)	Plus/Plus
Query 11	GGCGCGACGATCAAGCAGGAGTTTATTAAAGCACGAGCCGACGAAACGGAGTGGGTCGGG	70		
Sbjct 334	GGCGCGACGATCAAGCAGGAGTTTATTAAAGCACGAACCGACGAGACGGAGTGGGTCGGG	393		
Query 71	GTGGACACTTATTGTGAAACGCGGATTACGGCGATCAGGATTGGGTGCTGGATGATGGG	130		
Sbjct 394	GTGGACACTTATTGTGAGACGCGGATTACGGCGATCAGGACTGGGTGCTGGATGATGGG	453		
Query 131	GAAGGAGGAAGAGGATGGGAGGGTGACGTTACGGATTCAATGAGTGAGGGTGAGGGCGA	190		
Sbjct 454	G-AGGAGGTAGAGGATGGGAGGGTGACGTTACGGATTCAATGAGTGATGGTGAGGGCGA	512		
Query 191	AGAGGGGACGGAGTTTGTGACGACGTTAAACCGAAGCGGAAGTATACGAAGAGGAAGGA	250		
Sbjct 513	GAAGGGGACGGAGTTTGTGACGACGTTAAACCGAAGCGGAAGTATACGAAGAGGAAGAA	572		
Query 251	CCGGTTGATGGCTAAGAAACCAAAAATTATCAAGAAGGAACAGGATTTGAATAATCCGCC	310		
Sbjct 573	CCGGTTGATGGCTAAGAAACCAAAAATTATCAAGAAGGAACAGGATTTGGATAATCCGCC	632		
Query 311	GATTGACAAGCTGGTTCTGCAGCACTACAAGCTGTCGTGCGATGTTTGCAGCGAACCCT	370		
Sbjct 633	GATTGACAAGCTGGTTCTGCAGCACTACAAGCTGTCGTGCGATGTTTGCAGCGAACCCT	692		
Query 371	GGAAGACTTCACCGAGCTGCGGAAGCACTACAAGTACGTACACAACGAGCCGGGTATCT	430		
Sbjct 693	GGAAGATTTACCGAGCTGCGGAAGCACTACAAGTACGTACACAACGAGCCGGGTATCT	752		
Query 431	CAAGTGTTCGAACAAGAAATCTACAAAAAGTCTGGATGATTGAGCACATTCAACTGCA	490		
Sbjct 753	TAAGTGTTCGAACAAGAAATCTACAAAAAGTCTGGATGATTGAGCACATTCAACTGCA	812		
Query 491	TTTGAATCCGGACGCGTTCCATTGTGCACTTTGTAAACAAAAGTTACAGCTCGAGCAAAGT	550		
Sbjct 813	TTTGAATCCGGACGCGTTCCATTGTGCGCTCTGCAACAAAAGCTACAGCTCGAGCAAAGT	872		
Query 551	TCTTAAAGAACACACCAAAGAGGTCCACGCGCC	583		
Sbjct 873	TCTTAAAGAACACACCAAAGAGGTCCACGCGCC	905		

Figura 18 - Alinhamentos realizados na plataforma BLAST do sequenciamento de amostra de DNA genômico da colônia PIN de amplificação do gene *grauzone* grau2 com identidade de 97 % com os acessos XM_001847451 e XM_001866304, correspondentes aos parálogos de *grauzone*

observados em *Cx. quinquefasciatus* CPIJ005623 e CPIJ015950, respectivamente. A - Query: amplificado de grau2; Sbjct: número de acesso GenBank XM_001847451 (CPIJ005623); B - Query: amplificado de grau2; Sbjct: número de acesso GenBank XM_001866304 (CPIJ015950).

Ocorreu uma dissimilaridade de 3 % entre a sequência do gene obtido com as sequências dos parálogos do gene depositadas, então a sequência gerada foi transcrita e traduzida pelo *MEGA Software 7.0*. Quando analisada na plataforma BLAST (figura 19), mostrou identidade de 98 % às sequências XP_001866339 e XP_001847503, descrita como “fator de transcrição *grauzone* (*Culex quinquefasciatus*)”, correspondentes aos parálogos CPIJ015950 e CPIJ005623, respectivamente.

A transcription factor grauzone [Culex quinquefasciatus]

Sequence ID: [XP_001866339.1](#) Length: 500 Number of Matches: 1

[► See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 112 to 302 GenPept Graphics				▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
392 bits(1008)	1e-133	Compositional matrix adjust.	187/191(98%)	190/191(99%)	0/191(0%)
Query 4	GATIKQEFIKHEPDETEWVGVDTYCETRIQGDQDVLDDGEEEDGEGDVTDSMSEGE				63
Sbjct 112	GATIKQEFIKHEPDETEWVGVDTYCETRIQGDQDVLDDGEE EDGEGDVTDSMS+GEGE				171
Query 64	EGTEFVQDVKPKRKYTKRDLMAKKPKIIEKEQDLNPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPL				123
Sbjct 172	EGTEFVQDVKPKRKYTKRDLMAKKPKIIEKEQDLNPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPL				231
Query 124	EDFTELKHKYVHNEPGYLKCCNKKIYKCCWIEHIQLHLPDAFHCALCNKSYSSSKV				183
Sbjct 232	EDFTELKHKYVHNEPGYLKCCNKKIYKCCWIEHIQLHLPDAFHCALCNKSYSSSKV				291
Query 184	LKEHTKEVHAP				194
Sbjct 292	LKEHTKEVHAP				302

B transcription factor grauzone [Culex quinquefasciatus]

Sequence ID: [XP_001847503.1](#) Length: 519 Number of Matches: 1

[► See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 112 to 302 GenPept Graphics				▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
392 bits(1007)	3e-133	Compositional matrix adjust.	187/191(98%)	190/191(99%)	0/191(0%)
Query 4	GATIKQEFIKHEPDETEWVGVDTYCETRIQGDQDVLDDGEEEDGEGDVTDSMSEGE				63
Sbjct 112	GATIKQEFIKHEPDETEWVGVDTYCETRIQGDQDVLDDGEE EDGEGDVTDSMS+GEGE				171
Query 64	EGTEFVQDVKPKRKYTKRDLMAKKPKIIEKEQDLNPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPL				123
Sbjct 172	EGTEFVQDVKPKRKYTKRDLMAKKPKIIEKEQDLNPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPL				231
Query 124	EDFTELKHKYVHNEPGYLKCCNKKIYKCCWIEHIQLHLPDAFHCALCNKSYSSSKV				183
Sbjct 232	EDFTELKHKYVHNEPGYLKCCNKKIYKCCWIEHIQLHLPDAFHCALCNKSYSSSKV				291
Query 184	LKEHTKEVHAP				194
Sbjct 292	LKEHTKEVHAP				302

Figura 19 - Alinhamentos realizados na plataforma BLAST da sequência proteica do sequenciamento da amostra de DNA colônia PIN com amplificação do fragmento do gene *grauzone* grau2 com identidade de 98 % com os acessos XP_001866339 e XP_001847503, correspondentes aos parálogos CPIJ015950 e CPIJ005623, respectivamente. A - Query: amplificado de grau2; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001866339 (CPIJ015950); B - Query: amplificado de grau2; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001847503 (CPIJ005623).

4.6.5 Amplificação do fragmento do gene *grauzone* com promotor T7

A amplificação gerada no item 4.6.3 foi resubmetida a nova PCR para a adição do promotor T7 nas extremidades 5', como podemos observar na figura 20, para continuação do silenciamento do gene *grauzone*. Na imagem observamos a amplificação do fragmento do gene sem o promotor de cada colônia (amostras 1 - PIN, 3 - SELV e 5 - IBEX) e ao lado o fragmento com a adição do promotor apresentando-se ligeiramente maior (amostras 2 - PIN, 4 - SELV e 6 - IBEX).

Figura 20 - Fotografia de gel de agarose apresentando adição do promotor T7 em amplificados de fragmentos de *grauzone* grau2 em amostras de *pool*

de DNA genômico de mosquitos das colônias PIN, SELV e IBEX, onde ao lado de cada banda de *grauzone*, encontra-se o amplificado com T7. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA *Ladder*, amostras: 1: PIN grau2; 2: PIN grau2 + T7, 3: SELV grau2, 4: SELV grau2 + T7, 5: IBEX grau2, 6: IBEX grau2 + T7

Foi realizado também a amplificação do fragmento do gene MSP1 em amostras de plasmídeo (item 3.7.9) juntamente com a adição do promotor T7 ao fragmento obtido do gene, como podemos observar na figura 21 que com a adição do promotor (1) o fragmento encontra-se ligeiramente maior quando comparado com o fragmento sem a adição do promotor (2).

Figura 21 - Gel de agarose apresentando a adição do promotor T7 no fragmento do gene MSP1 quando comparado com o fragmento gerado do gene sem o promotor. Da esquerda para direita: Peso molecular 100bp DNA *Ladder*; amostras: 1: fragmento do gene MSP1 com a adição do promotor T7, 2: fragmento do gene MSP1 sem a adição do promotor.

4.6.6 Produção de RNA dupla-fita

Durante a geração do RNA dupla-fita do gene MSP1 não ocorreram problemas, sendo sintetizado facilmente. Porém o processo de obtenção de RNA dupla-fita de *grauzone* de mosquitos PIN apresentou alguns atrasos, porque não estava sendo gerado em concentrações suficientes para as injeções. Porém com o auxílio da Dra. Bianca Burini Kojin, conseguimos produzi-lo em quantidades suficientes para injeções nos mosquitos.

Porém, como o processo de geração do RNA dupla-fita em quantidades significativas para seu uso em silenciamento atrasou e a colônia PIN já apresentava enfraquecimento, por tanto o silenciamento não foi realizado pois sabíamos que precisaríamos trocar de colônia. Quando adquirimos a colônia IBEX, de outro estado, pensamos que a sequência de *grauzone* destes novos mosquitos seria distinta o suficiente para que talvez o silenciamento não funcionasse.

Para verificar a diferença entre o gene *grauzone* das colônias contatamos a empresa BPI Biotecnologia para realização do sequenciamento completo do gene para verificarmos se este gene realmente variava entre as colônias (item 3.8 e 4.7).

4.7 Sequenciamento completo do gene *grauzone*

Com a hipótese de que o gene *grauzone* da colônia IBEX fosse distinta de outras sequências de *grauzone* para *Cx. quinquefasciatus* de outras localidades como Europa, Ásia e Norte-americano, já estudados em outros trabalhos^{168, 87}, enviamos amostras de DNA em *pool* de fêmeas IBEX 1, IBEX 2 (*pool* de IBEX wPip+),

Infec (*pool*/ PIN *wPip*+) e N-Infec (*pool*/ PIN *wPip*-) para a empresa BPI Biotecnologia para a amplificação e leitura completa deste gene em nossas populações.

Primeiramente foi realizada tentativa com iniciadores desenhados com base na sequência genômica de *Cx. quinquefasciatus*¹⁶⁸, que pode ser observada com detalhes no anexo B o relatório enviado pela própria empresa.

Porém, as amplificações não foram bem-sucedidas, provavelmente devido a variabilidade inter-individual, uma vez que as amostras de DNA das colônias eram em *pool* de 10 mosquitos.

Decidimos então realizar nova tentativa, que pode ser consultada no anexo C, que é o relatório enviado pela empresa com mais detalhes de iniciadores e amplificações.

Os iniciadores Grau-cDNA e Grau-deg foram utilizados para amplificação completa do gene e o iniciador Grau-int (*grau2*) para amplificação interna, para controle no momento das montagens dos sequenciamentos (tabela 1; esquema demonstrando utilização dos iniciadores: figura 22).

Figura 22 - Esquema representativo do gene *grauzone* e como os iniciadores foram utilizados para aperfeiçoar os fragmentos gerados para a montagem do gene *grauzone* completo.

Foram utilizadas amostras enviadas anteriormente (anexo B - IBEX 1, IBEX 2, Infec e N-Infec) e amostras enviadas para a realização do item 3.3 e 4.2: PIN e SELV, ambas em *pool* de mosquitos wPip+ e a amostra DNA14 (amostra individual IBEX wPip+).

Foram realizados diversos testes para que os iniciadores apresentassem amplificações visíveis nas amostras (detalhes dos testes podem ser verificados anexo C).

Em suma foram amplificadas as amostras IBEX 1, IBEX 2, N-Infec, PIN, SELV e DNA14 (representante individual da colônia IBEX), sendo a amostra N-Infec a única wPip-, enquanto todas as outras são wPip+. Como os iniciadores internos (Grau-int) e externos (Grau-cDNA) só amplificaram as amostras PIN e DNA14, ambas wPip+, apenas estas duas amostras foram enviadas para sequenciamento e a partir destes sequenciamentos foi possível a geração da montagem do gene completo das amostras PIN e DNA14 (anexo C).

Os fragmentos obtidos com os iniciadores internos e os fragmentos sequenciados com o iniciador Grau-cDNA foram usados para construir uma sequência-consenso da amostra PIN no programa *Geneious* 4.8.3. A empresa BPI Biotecnologia realizou alguns alinhamentos, como podemos verificar nos alinhamentos expostos no anexo C, porém como as amostras sequenciadas eram de DNA genômico e a plataforma BLAST faz alinhamento com sequências já transcritas do gene, os alinhamentos geraram um fragmento na sequência PIN (anexo C - figura 14), que é o *intron* do gene, que já foi retirado nas sequências do GenBank, que chamamos de fragmento diagnóstico. Devido a isso, quando recebemos as sequências nós realinhamos a sequência obtida com as sequências dos parálogos em sua forma genômica (item 3.5 e 4.4) e apresentamos as análises a seguir.

Do sequenciamento da amostra PIN foi obtida sequência de 1530 pb que quando alinhada com os parálogos de *grauzone* (figura 23), podemos observar que

aproximadamente 40 pares de bases da porção 5' e 50 pb da porção 3' do gene não apresentou sequência, pois a porção inicial e final da sequência não é eficiente, além de alguns nucleotídeos diferentes, que são mutações devido à variação populacional das amostras do alinhamento, pois dentro da amostra PIN, que é um pool de 10 mosquitos, não ocorreu variações individuais, demonstrando que estes mosquitos PIN já estavam com efeito de gargalo da garrafa forte uma vez que o sequenciamento mostrou-se estável e além de indicar que a sequência do gene *grauzone* nos mosquitos coletados às margens do Rio Pinheiros é semelhante às populações que apresentam seu gene depositado nos bancos de dados.

Figura 23 - Resultado do alinhamento pela plataforma MultAlin do sequenciamento da amostra genômica PIN para o gene *grauzone* completo com as sequências dos parálogos em suas formas genômicas. Em azul estão destacados os nucleotídeos que apresentaram diferença.

Os fragmentos obtidos na amostra DNA14 com os iniciadores Grau-int e Grau-cDNA foram usados para fazer uma sequência consenso de 1075 pares de bases que foi alinhada com as sequências de DNA genômico dos parálogos, como observamos na figura 24.

Podemos observar na figura que este sequenciamento apresentou muitos problemas na leitura do sequenciamento com os iniciadores Grau-cDNA. Na porção 3' (aproximadamente 40 pb) já era esperado uma leitura falha, mas a porção 5'

apresentou problemas em aproximadamente 260 pb, o que não é corriqueiro. Também verificamos diversos fragmentos longos que não apresentaram leitura, abrindo “*gaps*” no alinhamento.

Podemos dizer que o problema foi o sequenciamento dos iniciadores Grau-cDNA e não nos iniciadores internos (grau2) pois a porção deste iniciador localizada entre os nucleotídeos 340 e 900 apresenta boa leitura.

Estas diferenças que foram observadas no sequenciamento da amostra IBEX (DNA14) pode ser respondido pela variação residual da colônia. Mesmo a colônia sendo estabelecida há mais de 13 anos (item 3.1 e 4.1), é possível que a variabilidade inter-individual da colônia ainda ocorra. Isso explica porque as amplificações das amostras em *pool* das colônias IBEX e SELV não ocorreram eficientemente, pelo fato de a variabilidade entre as amostras ser muito grande, e os iniciadores mais específicos para amplificação em um gene completo não conseguiram apresentar eficiência. Para responder a esta variabilidade residual dentro da colônia, precisaríamos sequenciar individualmente mais mosquitos das colônias SELV e IBEX, porém infelizmente não será possível com a colônia SELV, devido a preparação das amostras todas em *pool*, pois não imaginávamos que a colônia se extinguiria tão rapidamente e que iríamos precisar de amostras individuais para o sequenciamento completo do gene.

Outra explicação para a falha do sequenciamento na amostra DNA 14 seria a presença de duplicação deste gene, assim essas sequências que foram amplificadas seriam pseudogenes ou duplicações funcionais de *grauzone*. Porém para confirmação teríamos que realizar localização *in situ* ou “pintura cromossômica”, o que será destinado para futuros estudos.

Alinhamos as sequências de PIN e DNA 14 e podemos observar que, mesmo com as falhas apresentadas no sequenciamento do DNA 14, as sequências das duas populações apresentam diferenças nucleotídicas, destacadas em azul na figura 25,

demonstrando que há variabilidade do gene *grauzone* entre as populações das colônias.

Figura 25 - Resultado do alinhamento pela plataforma MultAlin do sequenciamento das amostras genômicas DNA14 e PIN para o gene *grauzone* completo. Em azul estão destacados os nucleotídeos que apresentaram diferença.

Analizamos o gene *grauzone* gerado pelo sequenciamento da colônia PIN para verificarmos se ocorriam diferenças significativas na formação da proteína, mesmo com as pequenas diferenças de nucleotídeos. Então transcrevemos, traduzimos a sequência-consenso e pela plataforma BLAST comparamos a sequência com os parálogos de *grauzone*. Como podemos observar estes

alinhamentos na figura 26, a sequência de Grauzone da amostra PIN (Query) mostrou-se com 90 % de identidade com as sequências XP_001847503 (A) e XP_001866339 (B), correspondentes as sequências CPIJ005623 e CPIJ015950, respectivamente.

A transcription factor grauzone [Culex quinquefasciatus]
Sequence ID: [XP_001847503.1](#) Length: 519 Number of Matches: 1
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 15 to 304 [GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
483 bits(1244)	5e-164	Compositional matrix adjust.	249/305(82%)	251/305(82%)	15/305(4%)
Query 1	ADPPPATXAPXXKACGLCLCKNSSITPVGPEDDAMETROKVDKIFYFXXXRGRXXEGLIX				60
Sbjct 15	ADPPPATAP KACGLCLCKNSSITPVGPEDDAM RQKVDKIFYF RGR EGLI				72
Query 61	ETXXETVXGFYXAEQVLRNQQLRSTMETVASGSLSTGGATIKQEFIKHXPDETEWV				120
Sbjct 73	ET ETV GFY YAEQVLRNQQLRSTM VASGSLSTGGATIKQEFIKH PDETEWV				130
Query 121	GVDTYCETRIQGDQXWVLDGEEEXEDGEDVDTSMETXGEGXEGTEFVQDVKPKRKYTK				180
Sbjct 131	GVDTYCETRIQGDQ WVLDGEE EDGEDVDTSM S GEG EGTEFVQDVKPKRKYTK				188
Query 181	RKXRLMETAKPKIIEKEQDLNPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPLEXFTLRKHXYKH				240
Sbjct 189	RK RLM AKKPKIIEKEQDL NPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPLE FTLRKHXYKH				246
Query 241	EPGYKCCNKKIYKCCWMETIEHIQLHLPDASMETCALXQKLQLEQSSSTOPRTHQGRP				300
Sbjct 247	EPGY KCCNKKIYKCCW IEHIQLHLPDA CAL K SSS + H +				299
Query 301	RAGRE 305				
Sbjct 300	HAPEE 304				

B transcription factor grauzone [Culex quinquefasciatus]
Sequence ID: [XP_001866339.1](#) Length: 500 Number of Matches: 1
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 15 to 304 [GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
483 bits(1242)	6e-164	Compositional matrix adjust.	248/305(81%)	250/305(81%)	15/305(4%)
Query 1	ADPPPATXAPXXKACGLCLCKNSSITPVGPEDDAMETROKVDKIFYFXXXRGRXXEGLIX				60
Sbjct 15	ADP PAT AP KACGLCLCKNSSITPVGPEDDAM RQKVDKIFYF RGR EGLI				72
Query 61	ETXXETVXGFYXAEQVLRNQQLRSTMETVASGSLSTGGATIKQEFIKHXPDETEWV				120
Sbjct 73	ET ETV GFY YAEQVLRNQQLRSTM VASGSLSTGGATIKQEFIKH PDETEWV				130
Query 121	GVDTYCETRIQGDQXWVLDGEEEXEDGEDVDTSMETXGEGXEGTEFVQDVKPKRKYTK				180
Sbjct 131	GVDTYCETRIQGDQ WVLDGEE EDGEDVDTSM S GEG EGTEFVQDVKPKRKYTK				188
Query 181	RKXRLMETAKPKIIEKEQDLNPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPLEXFTLRKHXYKH				240
Sbjct 189	RK RLM AKKPKIIEKEQDL NPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPLE FTLRKHXYKH				246
Query 241	EPGYKCCNKKIYKCCWMETIEHIQLHLPDASMETCALXQKLQLEQSSSTOPRTHQGRP				300
Sbjct 247	EPGY KCCNKKIYKCCW IEHIQLHLPDA CAL K SSS + H +				299
Query 301	RAGRE 305				
Sbjct 300	HAPEE 304				

Figura 26 - Alinhamentos realizados na plataforma BLAST da sequência proteica completa do gene *grauzone* do sequenciamento da amostra de DNA colônia PIN com identidade de 90 % com as sequências XP_001847503 e XP_001866339, correspondentes aos parálogos CPIJ005623 e CPIJ015950, respectivamente. A - Query: amplificado PIN; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001847503 (CPIJ005623); B - Query: amplificação PIN; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001866339 (CPIJ015950).

Em um dendrograma com as sequências da proteína Grauzone de mosquitos já depositadas no GenBank, a amostra PIN (grifada de amarelo) apresenta-se bem próxima aos parálogos, como já se era esperado (Figura 27), porém mais perto do parálogo CPIJ015950.

Figura 27 - Dendrograma de sequências de Grauzone de mosquitos que alinham na plataforma BLAST com a sequência de *grauzone* sequenciada da amostra PIN. Em destaque amarelo: sequência completa do gene *grauzone* gerado do sequenciamento da amostra PIN.

Para as análises proteicas com a amostra do DNA14 (Query) não foi transcrita, devido a uma falha justamente na região do *intron*, porém a sequência foi traduzida e na figura 28 podemos ver o alinhamento com os parálogos de *grauzone*, com identidade de 71 % com a XP_001847503 (A) correspondente ao parálogo CPIJ005623 e 73 % com a XP_001866339 correspondente a CPIJ015950 (B).

A transcription factor *grauzone* [*Culex quinquefasciatus*]Sequence ID: [XP_001847503.1](#) Length: 519 Number of Matches: 1[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 87 to 472 GenPept Graphics				▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
475 bits(1222)	8e-163	Compositional matrix adjust.	272/407(67%)	279/407(68%)	97/407(23%)
Query 19	KQVLRNQQLRSTMETVASGSLSTDGGATIKQEFIKHEPDXTWVGVDTYCETRIQGDQ				78
Sbjct 87	+QVLRNQQLRSTM VASGSLSTDGGATIKQEFIKHEPD TEWVGVDTYCETRIQGDQ				144
Query 79	DWVLDDGEEEDGEGDVTDSMETSEGEEGTEFVQDVKPKRKYTKRKDRMETAKPKI				138
Sbjct 145	DWVLDDGEE EDGEGDVTDSM S+GEEGTEFVQDVKPKRKYTKRK+RLM AKKPKI				200
Query 139	IKKEQDLNPPIDKLVLOHYKLSCDVCAEPLEDXTELKHKYVHNEPGYLKCCNKKIYK				198
Sbjct 201	IKKEQDLNPPIDKLVLOHYKLSCDVCAEPLED TELRKHKYVHNEPGYLKCCNKKIYK				260
Query 199	KCWMETIXHIXLHNPXAFHCACXCNKSTAR-----				228
Sbjct 261	KCWM I HI LHLNP AFHCA CNKS +				318
Query 229	-----KVLASQGSLLKHLVAMETHGEGEQHVA-TSARXLXHHX				265
Sbjct 319	SNAHLNAHIMVAHGSVPCPCPKVLASQGSLLKHLVAM--HGEGEQHVCDVCAVFRSKQ				376
Query 266	-----XVXXXROYCLTKHMETRRMETHVXEIALSCELCGKQV				302
Sbjct 377	CFETHVQGLGTRLDNKVQCSVCSWLTDKYCLTKHM--RRM--HVEEIALSCELCGKQV				432
Query 303	RNQDALNCHVRAHTESRYXCDMETCKKKFYAGTHCDPSHRRGHLQL			349	
Sbjct 433	RNQDALNCHVRAHTESRY CDM CKKKF P H R H+ +				472

B transcription factor *grauzone* [*Culex quinquefasciatus*]Sequence ID: [XP_001866339.1](#) Length: 500 Number of Matches: 1[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 87 to 453 GenPept Graphics				▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
465 bits(1197)	3e-159	Compositional matrix adjust.	265/388(68%)	271/388(69%)	78/388(20%)
Query 19	KQVLRNQQLRSTMETVASGSLSTDGGATIKQEFIKHEPDXTWVGVDTYCETRIQGDQ				78
Sbjct 87	+QVLRNQQLRSTM VASGSLSTDGGATIKQEFIKHEPD TEWVGVDTYCETRIQGDQ				144
Query 79	DWVLDDGEEEDGEGDVTDSMETSEGEEGTEFVQDVKPKRKYTKRKDRMETAKPKI				138
Sbjct 145	DWVLDDGEE EDGEGDVTDSM S+GEEGTEFVQDVKPKRKYTKRK+RLM AKKPKI				200
Query 139	IKKEQDLNPPIDKLVLOHYKLSCDVCAEPLEDXTELKHKYVHNEPGYLKCCNKKIYK				198
Sbjct 201	IKKEQDLNPPIDKLVLOHYKLSCDVCAEPLED TELRKHKYVHNEPGYLKCCNKKIYK				260
Query 199	KCWMETIXHIXLHNPXAFHCACXCNKS-----TARKVLA				232
Sbjct 261	KCWM I HI LHLNP AFHCA CNKS T K				318
Query 233	SQGSLLKH-----LVAMETHGEGEQHVA-TSARXLXHHX-----				265
Sbjct 319	SNAHLNAHIMVAHEALVAM--HGEGEQHVCDVCAVFRSKQCFETHVQGLGTRLDNKVQ				376
Query 266	---XVXXXROYCLTKHMETRRMETHVXEIALSCELCGKQVRNQDALNCHVRAHTESRY				321
Sbjct 377	CSVCSWLTDKYCLTKHM--RRM--HVEEIALSCELCGKQVRNQDALNCHVRAHTESRY				432
Query 322	XCDMETCKKKFYAGTHCDPSHRRGHLQL			349	
Sbjct 433	CDM CKKKF P H R H+ +				453

Figura 28 - Alinhamentos realizados na plataforma BLAST da sequência proteica completa do gene *grauzone* do sequenciamento da amostra de DNA14 (colônia IBEX) com identidade de 67 % com a sequência XP_001847503 (CPIJ005623) e 68 % com a sequência XP_001866339 (CPIJ015950). A - Query: amplificado DNA14; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001847503 (CPIJ005623); B - Query: amplificação DNA14; Sbjct: número de acesso GenBank XP_001866339 (CPIJ015950).

Quando comparamos a proteína da amostra DNA14 com as sequências depositadas de Grauzone de outros mosquitos (figura 29) verificamos que a amostra (grifada em amarelo) fica distante, porém mais próxima à sequência XP_001866339 (parálogo CPIJ015950) quando comparada com a distância para o parálogo CPIJ005623, sequência XP_001847503.

Figura 29 - Dendrograma de seqüências de Grauzone de mosquitos que alinham na plataforma BLAST com a seqüência de *grauzone* sequenciada da amostra DNA14 (colônia IBEX). Em destaque amarelo: seqüência completa do gene *grauzone* gerado do sequenciamento da amostra DNA14.

Essa aproximação das amostras tanto PIN quanto DNA14 se dá pelo fato de o fragmento diagnóstico ocorrer como *intron* no parálogo CPIJ015950 e como *exon* no parálogo CPIJ005623, como verificado anteriormente no item 4.4.

Comparando rapidamente as seqüências proteicas dos dois parálogos (figura 30) verificamos que ocorre o fragmento diferencial entre os aminoácidos 331 e 352 onde Query é o parálogo CPIJ015950 e Subject é o CPIJ005623.

transcription factor grauzone [Culex quinquefasciatus]
Sequence ID: [XP_001847503.1](#) Length: 519 Number of Matches: 1
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 519		GenPept	Graphics			
Score		Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1029 bits(2660)		0.0	Compositional matrix adjust.	497/519(96%)	498/519(95%)	19/519(3%)
Query	1	MEFEQEOPPEVPAAEDPSPATSAPAIKACGLCLCKNSSITPVGPEDDAMRQKVDKIFYFQ				60
Sbjct	1	MEFEQEOPPEVPAAEDP PATSAPAIKACGLCLCKNSSITPVGPEDDAMRQKVDKIFYFQ				60
Query	61	IVRGRGAELICETCRETVDGFYEYAEQVLRNQQLRSTMVASGSLTDGGATIKQEFI				120
Sbjct	61	IVRGRGAELICETCRETVDGFYEYAEQVLRNQQLRSTMVASGSLTDGGATIKQEFI				120
Query	121	KHEPDETEWVGVDYCE TRIQGDQDWLDDGEEVEDGEGDVTDSMSDGEEGTEFVQDV				180
Sbjct	121	KHEPDETEWVGVDYCE TRIQGDQDWLDDGEEVEDGEGDVTDSMSDGEEGTEFVQDV				180
Query	181	KPKRKYTKRKNRLMAKKPKIIKKEQDLNPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPLDFTELRRKH				240
Sbjct	181	KPKRKYTKRKNRLMAKKPKIIKKEQDLNPPIDKLVLQHYKLSCDVCAEPLDFTELRRKH				240
Query	241	YKYVHNPEGYLKCCNKKIYKCCWMIIEHQLHNPDAFHLCALCNKSYSSSKVLKEHTKEVH				300
Sbjct	241	YKYVHNPEGYLKCCNKKIYKCCWMIIEHQLHNPDAFHLCALCNKSYSSSKVLKEHTKEVH				300
Query	301	APEENRHFKECTCFKPFVSNALNAHIMVAHEA-----LVAMHGEG				341
Sbjct	301	APEENRHFKECTCFKPFVSNALNAHIMVAH + LVAMHGEG				360
Query	342	EQHVCDVCARVFRSKQCFETHVQHLGTRLDNKKVQCSVCSVWLTDKYCLTKHMRMHVEE				401
Sbjct	361	EQHVCDVCARVFRSKQCFETHVQHLGTRLDNKKVQCSVCSVWLTDKYCLTKHMRMHVEE				420
Query	402	IALSCELCGQVRNQDALNCHVRRATESRYECDMCKKKFKRPHHMRHIAIHHTGEDIY				461
Sbjct	421	IALSCELCGQVRNQDALNCHVRRATESRYECDMCKKKFKRPHHMRHIAIHHTGEDIY				480
Query	462	SCNHCTERFNTKNQYLRKTAHPVEYEAEMRKRMKDA		500		
Sbjct	481	SCNHCTERFNTKNQYLRKTAHPVEYEAEMRKRMKDA		519		

Figura 30 - Alinhamentos realizados na plataforma BLAST das seqüências proteicas dos parálogos de *grauzone* CPIJ005623 e CPIJ015950,

com identidade entre estas de 96 %. Query: CPIJ015950 e Sbjct: CPIJ005623.

A amostra DNA14 não apresentou sequências para indicar se este fragmento diagnóstico acontece nessa população, porém na amostra PIN nós transcrevemos a sequência para que o *intron* fosse eliminado na tradução, porém não sabemos se este fragmento determinado como *intron* se ocorre na forma de *exon*, indicando que esta sequência gerada na amostra PIN deve ser estudada com maior minuciosidade. Se este fragmento diagnóstico entre os parálogos interfere na formação da proteína, estes parálogos podem apresentar funções distintas na formação do gene *grauzone*, o que torna ainda mais complexa a compreensão de seu papel na possível geração de incompatibilidade citoplasmática.

5 DISCUSSÃO GERAL

Pelo fato do mosquito *Cx. quinquefasciatus* ocorrer em muitas regiões do planeta e ter a capacidade de reprodução com geração de híbridos com outras espécies do Complexo *Culex pipiens*^{113, 143-167}, já indica que este mosquito pode apresentar populações distintas umas das outras, devido as diferenças de cada localidade. Mas observamos que esta diferença entre populações afeta também genes de reprodução, vitais para a manutenção da espécie.

O gene *grauzone* esta envolvido no processo de meiose do mosquito e pelas dificuldades de amplificação que apresentamos do gene *grauzone* em *Cx. quinquefasciatus*, constatamos que este gene é variável dentro de populações destes mosquitos.

Por este gene ser um fator de transcrição que foi indicado como ativador de do gene *córtex* recuperador da meiose de moscas *Drosophila melanogaster*¹⁶⁹⁻¹⁷¹, a variação genética observada é bem surpreendente, uma vez que fatores de transcrição seriam presumivelmente mais conservados evolutivamente, pois sua função é fundamental.

Porém em *Cx. quinquefasciatus* só ocorreu o estudo do gene *grauzone*, fator de transcrição⁸⁷, não no gene *córtex* em que este atua¹⁶⁹⁻¹⁷¹, portanto ainda há necessidade de estudos que indicariam se este gene seria de fato o principal fator para IC observada com a presença da *Wolbachia*.

Além do mais, como *grauzone* ocorre em 2 parálogos sequencialmente semelhantes, porém suas proteínas na porção C-terminal são diferentes, possivelmente estes parálogos apresentam funções distintas no mosquito, o que demanda adaptações e cuidados no desenvolvimento de estudos que envolvem amplificação e silenciamento deste gene.

Observamos semi-quantitativamente que ocorre superexpressão dos parálogos do gene *grauzone* em fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* infectadas por *Wolbachia*, no 4º dia após emergência é maior quando comparada com os níveis de expressão em fêmeas não-infectadas por *Wolbachia*, corroborado por outro estudo⁸⁷. Um conhecimento mais aprofundado da função destes parálogos de *grauzone* do mosquito *Cx. quinquefasciatus* se faz necessário para melhor entendimento de como este gene estaria envolvido na alteração reprodutiva de incompatibilidade citoplasmática que é observado na presença de *Wolbachia* nestes mosquitos.

No sequenciamento completo do gene *grauzone* percebemos as dificuldades de trabalho com o gene *grauzone* em diferentes populações de *Cx. quinquefasciatus*. Variabilidade genética impediu a amplificação completa do gene na colônia IBEX, mesmo tendo sido executada por especialistas nestes serviços (BPI Biotecnologia). Estas dificuldades podem ser encontradas no momento da amplificação, que poderia gerar amplificações falso-negativas ou falso-positivas, ou até mesmo no momento de leitura da amplificação no momento do sequenciamento, o que geraria leituras errôneas, por isso recomendamos o sequenciamento completo do *grauzone* antes de experimentos de silenciamento do mesmo, para verificação da sequência do gene na população que está sendo estudada.

A manutenção de colônias de *Cx. quinquefasciatus* não é tarefa complicada, porém quando uma colônia é tratada para a eliminação de *Wolbachia*, esta manutenção necessita de maior atenção, pois a contaminação de *Cx. quinquefasciatus* com *Wolbachia* é rápida e eficiente, uma vez que a presença desta bactéria no mosquito é natural e acreditamos provavelmente esteja presente em todos *Cx. quinquefasciatus*, pela facilidade de encontro desta bactéria, em mosquitos da natureza^{154, 155, 176}, ou em mosquitos que já foram colonizados anteriormente.

Uma vez que *Cx. quinquefasciatus* são de grande importância médica e veterinária, o conhecimento de como a *Wolbachia* interfere na reprodução desse

mosquito pode ser de grande valia para auxiliar no controle deste mosquitos que ocorre em grande parte do planeta, diminuindo consequentemente as doenças que são transmitidas por este mosquito.

6 CONCLUSÕES

Concluimos que:

- a) Os 2 parálogos descritos para *grauzone* em *Cx. quinquefasciatus* são semelhantes na formas de DNA genômico, porém as proteínas presumidas geradas destes parálogos não são iguais, e possivelmente têm funções distintas no mosquitos. Diante de tal variabilidade, antes de tentativas de silenciamento deste gene, estudos direcionados a confirmar e compreender esta variabilidade deverão ser feitos.
- b) Estimamos semi-quantitativamente que a expressão dos parálogos do gene *grauzone* em fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* infectadas por *Wolbachia*, no 4º dia após emergência é maior quando comparada com os níveis de expressão em fêmeas não infectadas por *Wolbachia*;
- c) O silenciamento do gene *grauzone* é viável de ser executado, sendo considerada e contornada a variabilidade genética apresentava por este gene.

7 REFERÊNCIAS

1. Hertig M, Wolbach SB. Studies on Rickettsia-like micro-organisms in insects. J Med Res. 1924; 44(3): 329-374.7.
2. Hertig M. The Rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp.n.) and Associated Inclusions of the Mosquito, *Culex pipiens*. Parasitology. 1936; 28(4): 453-86.
3. Zhou W, Rousset F, O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proc Biol Sci. 1998; 265(1395): 509-515.
4. Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C. How many *Wolbachia* supergroups exist? Mol Biol Evol. 2002; 19(3): 341-6.
5. Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neill SL, Werren JH, Bordenstein SR, et al. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57(Pt 3): 654-7.
6. Glowska E, Dragun-Damian A, Dabert M, Gerth M. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). Infect Genet Evol. 2015; 30: 140-6.
7. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. How many species are infected with *Wolbachia*? – A statistical analysis of current data. FEMS Microbiol Lett. 2008; 281(2): 215–220.
8. Zug R, Hammerstein P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. PLoS One. 2012; 7(6).
9. Stevens L, Giordano R, Fialho RF. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. Ann Rev Ecol Syst. 2001; 32: 519–45. 8.
10. Werren JH. Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomol. 1997; 42: 587-609.
11. Bandi C, Trees AJ, Brattig NW. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. Vet Parasitol. 2001; 98(1-3): 215-38.

12. Hurst GD1, Jiggins FM, Robinson SJ. What causes inefficient transmission of male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*? *Heredity* (Edinb). 2001; 87(Pt 2): 220-6.
13. Stevens L, Wicklow DT. Multispecies interactions affect cytoplasmic incompatibility in *Tribolium* flour beetles. *Am Nat*. 1992; 140(4): 642-53.
14. Yang XH, Zhu DH, Liu Z, Zhao L, Su CY. High levels of multiple infections, recombination and horizontal transmission of *Wolbachia* in the *Andricus mukaigawae* (Hymenoptera; Cynipidae) communities. *PLoS One*. 2013; 8(11).
15. Raychoudhury R, Baldo L, Oliveira DC, Werren JH. Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. *Evolution*. 2009; 63(1): 165-83.
16. Heath BD, Butcher RD, Whitfield WG, Hubbard SF. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Curr Biol*. 1999; 9(6): 313-6.
17. Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Boulétreau M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol*. 1999; 16(12): 1711-23.
18. Kremer N, Huigens ME. Vertical and horizontal transmission drive bacterial invasion. *Mol Ecol*. 2011; 20(17): 3496-8.
19. Dedeine F, Ahrens M, Calcaterra L, Shoemaker DD. Social parasitism in fire ants (*Solenopsis* spp.): a potential mechanism for interspecies transfer of *Wolbachia*. *Mol Ecol*. 2005; 1 (5): 1543-8.
20. Hurst TP, Pittman G, O'Neill SL, Ryan PA, Nguyen HL, Kay BH. Impacts of *Wolbachia* infection on predator-prey relationships: evaluating survival and horizontal transfer between wMelPop infected *Aedes aegypti* and its predators. *J Med Entomol*. 2012; 49(3): 624-30.
21. Cordaux R, Michel-Salzat A, Bouchon D. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J Evol Biol*. 2001; 14(2): 237-43.
22. Rowley SM, Raven RJ, McGraw EA. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr Microbiol*. 2004; 49(3): 208-14.

23. Godfray HCJ. Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology. Chichester: Princeton University Press; 1994.
24. Johanowicz DL, Hoy MA. *Wolbachia* in a predator-prey system: 16S ribosomal DNA analysis of two phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and their prey (Acari: Tetranychidae). *Ann Entomol Soc Am.* 1996; 89(3): 435-41.
25. Rigaud T, Juchault P. Success and failure of horizontal transfers of feminizing *Wolbachia* endosymbionts in woodlice. *J evol Biol.* 1994; 8(7).
26. Toomey ME, Panaram K, Fast EM, Beatty C, Frydman HM. Evolutionarily conserved *Wolbachia*-encoded factors control pattern of stem-cell niche tropism in *Drosophila* ovaries and favor infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(26): 10788-93.
27. Stahlhut JK, Desjardins CA, Clark ME, Baldo L, Russell JA, Werren JH, et al. The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. *Mol Ecol.* 2010; 19(9): 1940-52.
28. Baldo L, Ayoub NA, Hayashi CY, Russell JA, Stahlhut JK, Werren JH. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Mol Ecol.* 2008; 17(2): 557-69.
29. Panaram K, Marshall JL. F supergroup *Wolbachia* in bush crickets: what do patterns of sequence variation reveal about this supergroup and horizontal transfer between nematodes and arthropods? *Genetica.* 2007; 130(1): 53-60.
30. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Rev Microbio.* 2008; 6(10): 741-51.
31. Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc Biol Sci.* 1998; 265(1413): 2407–2413.
32. Taylor MJ, Hoerauf A. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitol Today.* 1999; 15(11): 437-42.
33. Casiraghi M, Favia G, Cancrini G, Bartoloni A, Bandi C. Molecular identification of *Wolbachia* from the filarial nematode *Mansonella ozzardi*. *Parasitol Res.* 2008; 87(5): 417-20.

34. Langworthy NG, Renz A, Mackenstedt U, Henkle-Dührsen K, de Bronsvort MB, Tanya VN, et al. Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship. *Proc Biol Sci*. 2000; 267(1448): 1063-9.
35. McCall JW, Jun JJ, Bandi C. *Wolbachia* and the antifilarial properties of tetracycline. An untold story. *Ital J Zool*. 1999; 66(1): 7-10.
36. Taylor MJ, Makunde WH, McGarry HF, Turner JD, Mand S, Hoerauf A. Macrofilaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005; 365(9477): 2116-21.
37. McNulty SN, Foster JM, Mitreva M, Dunning Hotopp JC, Martin J, Fischer K, et al. Endosymbiont DNA in endobacteria-free filarial nematodes indicates ancient horizontal genetic transfer. *PLoS One*. 2010; 5(6).
38. Genchi C, Sacchi L, Bandi C, Venco L. Preliminary results on the effect of tetracycline on the embryogenesis and symbiotic bacteria (*Wolbachia*) of *Dirofilaria immitis*. An update and discussion. *Parassitologia*. 1998; 40(3): 247-9.
39. Hoerauf A, Nissen-Pähle K, Schmetz C, Henkle-Dührsen K, Blaxter ML, Büttner DW, et al. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest*. 1999; 103(1): 11–18.
40. Hoerauf A, Volkmann L, Nissen-Paehle K, Schmetz C, Autenrieth I, Büttner DW, et al. Targeting of *Wolbachia* endobacteria in *Litomosoides sigmodontis*: comparison of tetracyclines with chloramphenicol, macrolides and ciprofloxacin. *Trop Med Int Health*. 2000; 5(4): 275-9.
41. Starr DJ, Cline TW. A host parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects. *Nature*. 2002; 418(6893): 76-9.
42. Casiraghi M, McCall JW, Simoncini L, Kramer LH, Sacchi L, Genchi C, et al. Tetracycline treatment and sex-ratio distortion: a role for *Wolbachia* in the moulting of filarial nematodes? *Int J Parasitol*. 2002; 32(12): 1457-68.
43. Pannebakker BA, Loppin B, Elemans CP, Humblot L, Vavre F. Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(1): 213-5.

44. Bandi C, Trees AJ, Brattig NW. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Vet Parasitol.* 2001; 98(1-3): 215-38.
45. Hurst GD, Jiggins FM. Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6(4): 329–336.
46. Stouthamer R, Breeuwer JA, Hurst GD. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol.* 1999; 53:71-102.
47. Dobson SL, Rattanadechakul W, Marsland EJ. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity (Edinb).* 2004; 93(2): 135-42.
48. Almeida Fd, Moura AS, Cardoso AF, Winter CE, Bijovsky AT, Suesdek L. Effects of *Wolbachia* on fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae). *Infect Genet Evol.* 2011; 11(8): 2138-43.
49. Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M. *Wolbachia* Endosymbionts Responsible for Various Alterations of Sexuality in Arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1992; 250(1328): 91-8.
50. Azzouna A, Greve P, Martin G. Sexual differentiation traits in functional males with female genital apertures (male symbol fga) in the woodlice *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda, Crustacea). *Gen Comp Endocrinol.* 2004; 138(1): 42-9.
51. Charlat S, Hurst GD, Merçot H. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends Genet.* 2003; 19(4): 217-23.
52. Cordaux R, Bouchon D, Grève P. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends Genet.* 2011; 27(8): 332-41.
53. Negri I, Pellecchia M, Grève P, Daffonchio D, Bandi C, Alma A. Sex and stripping: The key to the intimate relationship between *Wolbachia* and host? *Commun Integr Biol.* 2010; 3(2): 110-5.
54. Zeh DW, Zeh JA, Bonilla MM. *Wolbachia*, sex ratio bias and apparent male killing in the harlequin beetle riding pseudoscorpion. *Heredity.* 2005; 95(1): 41-9.
55. Werren JH, Hurst GD, Zhang W, Breeuwer JA, Stouthamer R, Majerus ME. Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *J Bacteriol.* 1994; 176(2): 388-94.

56. Hurst GDD, Majerus ME. Why do maternally inherited microorganisms kill males? *Heredity*. 1993; 71: 81–95.
57. Duron O, Weill M. *Wolbachia* infection influences the development of *Culex pipiens* embryo in incompatible crosses. *Heredity*. 2006; 96(6): 493-500.
58. Kriesner P, Hoffmann AA, Lee SF, Turelli M, Weeks AR. Rapid Sequential Spread of Two *Wolbachia* Variants in *Drosophila simulans*. *Plos Pathogens*. 2013; 9(9).
59. Laven H. Speciation by Cytoplasmic Isolation in the *Culex pipiens*-Complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1959; 24: 166-173.
60. Yen JH, Barr AR. New Hypothesis of the Cause of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*. 1971; 232(5313): 657-8.
61. Breeuwer JA, Werren JH. Cytoplasmic Incompatibility and Bacterial Density in *Nasonia vitripennis* Genetics. 1993; 135(2): 565–574.
62. Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in single-and superinfected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2001; 38(3): 382-7.
63. Laven H. A possible model for speciation by cytoplasmic isolation in *Culex pipiens* complex. *Bull World Health Organ*. 1967; 37(2): 263–266.
64. Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M, Stauffer C, Savakis C, Bourtzis K. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(42): 15042-5.
65. Wilke ABB, Marrelli MT. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasit Vectors*. 2015; 8:342.
66. Xi Z, Khoo CC, Dobson SL. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science*. 2005; 310(5746): 326-8.
67. Xi ZY, Khoo CCH, Dobson SL. Interspecific transfer of *Wolbachia* into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. *Proc Biol Sci*. 2006; 273(1592): 1317–1322.

68. Mains JW, Brelsfoard CL, Rose RI, Dobson SL. Female Adult *Aedes albopictus* Suppression by *Wolbachia*-Infected Male Mosquitoes. *Sci Rep*. 2016; 6 (33846).
69. Turley AP, Moreira LA, O'Neill SL, McGraw EA. *Wolbachia* Infection Reduces Blood-Feeding Success in the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(9).
70. McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF et al. Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science*. 2009; 323(5910): 141-144.
71. Thomas P, Kenny N, Eyles D, Moreira LA, O'Neill SL, Asgari S. Infection with the wMel and wMelPop strains of *Wolbachia* leads to higher levels of melanization in the hemolymph of *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans* and *Aedes aegypti*. *Dev Comp Immunol*. 2011; 35(3): 360-5.
72. Ye YXH, Woolfit M, Rances E, O'Neill SL, McGraw EA. *Wolbachia*-Associated Bacterial Protection in the Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(8).
73. Rancès E, Johnson TK, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Zakir T, Warr CG, et al. The Toll and Imd Pathways Are Not Required for *Wolbachia*- Mediated Dengue Virus Interference. *J Virol*. 2013; 87(21): 11945-9.
74. Ye YH, Carrasco AM, Frentiu FD, Chenoweth SF, Beebe NW, van den Hurk AF, et al. *Wolbachia* Reduces the Transmission Potential of Dengue-Infected *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(6).
75. Frentiu FD, Zakir T, Walker T, Popovici J, Pyke AT, van den Hurk A, et al. Limited Dengue Virus Replication in Field-Collected *Aedes aegypti* Mosquitoes Infected with *Wolbachia*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(2).
76. Aliota MT, Walker EC, Yepes AU, Velez ID, Christensen BM, Osorio JE. The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(4).
77. Hussain M, Lu G, Torres S, Edmonds JH, Kay BH, Khromykh AA, et al. Effect of *Wolbachia* on Replication of West Nile Virus in a Mosquito Cell Line and Adult Mosquitoes. *J Virol*. 2013; 87(2).
78. Aliota MT, Walker EC, Uribe Yepes A, Velez ID, Christensen BM, Osorio JE. The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(4).

79. Dutra HL, Rocha MN, Dias FB, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016; 19(6).
80. Hussain M, Frentiu FD, Moreira LA, O'Neill SL, Asgari S. *Wolbachia* uses host microRNAs to manipulate host gene expression and facilitate colonization of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(22).
81. Chevalier F, Herbinière-Gaboreau J, Charif D, Mitta G, Gavory F, Wincker P, et al. Feminizing *Wolbachia*: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *BMC Microbiol*. 2012; 12(Suppl 1): S1.
82. Kremer N, Charif D, Henri H, Gavory F, Wincker P, Mavingui P, et al. Influence of *Wolbachia* on host gene expression in an obligatory symbiosis. *BMC Microbiology*. 2012; 12(Suppl 1), S7.
83. Hughes GL, Koga R, Xue P, Fukatsu T, Rasgon JL. *Wolbachia* Infections Are Virulent and Inhibit the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathogens*. 2011; 7(5).
84. Zhang GM, Hussain M, O'Neill SL, Asgari S. *Wolbachia* uses a host microRNA to regulate transcripts of a methyltransferase, contributing to dengue virus inhibition in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(25): 10276–10281.
85. Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell*. 2011; 43(6): 880-91.
86. Woolfit M, Algama M, Keith JM, McGraw EA, Popovici J. Discovery of Putative Small Non-Coding RNAs from the Obligate Intracellular Bacterium *Wolbachia pipientis*. *PLoS One*. 2015; 10(3).
87. Pinto SB, Stainton K, Harris S, Kambris Z, Sutton ER, Bonsall MB, et al. Transcriptional regulation of *Culex pipiens* mosquitoes by *Wolbachia* influences cytoplasmic incompatibility. *PLoS Pathog*. 2013; 9(10).
88. Andreadis TG. The contribution of *Culex pipiens* complex mosquitoes to transmission and persistence of West Nile virus in North America. *J Am Mosq Control Assoc*. 2012; 28(4s): 137-151.
89. Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol*. 2008; 53: 61-81.

90. Forattini OP, Kakitani I, dos Santos RL, Kobayashi KM, Ueno HM, Fernandez Z. The synanthropic potential of *Kerteszia* and *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil. Rev De Saude Publica. 2000; 34(6): 565-9.
91. Forattini OP. Culicidologia Médica, vol 2. São Paulo: EDUSP; 2002.
92. Taípe-Lagos CB, Natal D. Culicidae mosquito abundance in a preserved metropolitan area and its epidemiological implications. Rev Saude Publica. 2003; 37(3): 275-9.
93. Natal D, Paganelli CH, Santos JLF. Composição da População Adulta de *Culex* (*Culex*) *Quinquefasciatus* Say, 1823 em Ecotopos Proximos A Represa Edgard de Souza, No Município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo, Brasil. Rev Bras Entomol. 1991; 35: 539-43.
94. Natal D, Barata EAMF, Urbinatti PR. Contribuição ao conhecimento da fauna de imaturos de mosquitos (Diptera, Culicidae) em área de implantação de hidrelétrica na bacia do Rio Paraná, Brasil. Rev Bras Entomol. 1995; 39:897-9.
95. Forttini OP, Gomes AC, Natal D, Kakitani I, Marucci D. Preferências Alimentares De Mosquitos Culicidae No Vale Do Ribeira, São Paulo, Brasil. Rev Saude Publ. 1987; 21(3): 171-87.
96. Consoli RAGB, Oliveira RL. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Ed Fiocruz; 1994.
97. Silva EFD, Lacerda MVG, Fontes G, Mourão MPG, Martins M. *Wuchereria bancrofti* infection in Haitian immigrants and the risk of re-emergence of lymphatic filariasis in the Brazilian Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2017; 50(2): 256-259.
98. Bram RA. Contribution to the mosquito fauna of South East Asia II. The genus *Culex* in Thailand (Diptera: Culicidae). Cotrib Amer Ent Inst. 1967; 2 (1).
99. Bhattacharya S., Basu P. The Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. J Entomol Zool Stud. 2016; 4(2): 73-81.
100. Holder PW, Brown G, Bullians M. The mosquitoes of New Zealand and their animal disease significance Surveillance. Surveillance. 1999; 26(4): 12-15.
101. Carvalho GA, Alves LC, Maia RT, Andrade CFS, Ramos RAN, Faustino MAG. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 exposed to different

densities of microfilariae of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). Rev Bras entomol. 2008; 52(4).

102. Lai C, Tung K, Ooi H, Wang J. Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial density. Vet. Parasitol. 2000; 90(3): 231-7.

103. Lee DJ, Hicks MM, Griffiths M, Russell RC, Marks EN. The Culicidae of the Australasian Region. Volume I. New South Wales: AGPS. 1980.

104. Atkinson C, Woods K, Dusek R. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected liwi (*Vestiaria coccinea*). Parasitology. 1995; 111 Suppl: S59-69.

105. Pruck-Ngern M, Pattaradilokrat S, Chumpolbanchorn K, Pimnon S, Narkpinit S, Harnyuttanakorn P, et al. Effects of artesunate treatment on *Plasmodium gallinaceum* transmission in the vectors *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Vet Parasitol. 2015; 207(1-2): 161-5.

106. Ward RA. Mosquito fauna of Guam: case history of an introduced fauna. Nova lorque: Praeger Publishers. 1984.

107. Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW. Vector competence of California mosquitoes for West Nile Virus. Emerg Infect Dis. 2002; 8(12): 1385-91.

108. Ciota AT. West Nile virus and its vectors. Curr Opin Insect Sci. 2017; 22: 28-36.

109. Crockett RK, Burkhalter K, Mead D, Kelly R, Brown J, Varnado W, et al. *Culex flavivirus* and West Nile virus in *Culex quinquefasciatus* populations in the southeastern United States. J Med Entomol. 2012; 49(1): 165-74.

110. Vythilingam I, Oda K, Mahadevan S, Abdullah G, Thim CS, Hong CC, et al. Abundance, parity, and Japanese encephalitis virus infection of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Sepang District, Malaysia. J. Med. Entomol. 1997; 34(3): 257-62.

111. Mackenzie J, Barrett ADT, Deubel V. Japanese Encephalitis and West Nile Viruses. Heidelberg: Curr Top Microbiol Immunol. 2002.

112. Turell MJ. Members of the *Culex pipiens* complex as vectors of viruses. J Am Mosq Control Assoc. 2012; 28(4 Suppl): 123-6.

113. Diaz-Badillo A, Bolling BG, Perez-Ramirez G, Moore CG, Martinez-Munoz JP, Padilla-Viveros AA, et al. The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasit Vectors*. 2011; 9(4): 70.
114. Turell M, Kay BH. Susceptibility of selected strains of Australian mosquitoes (Diptera Culicidae) to Rift Valley Fever virus. *J Med Entomol*. 1998; 35(2): 132-5.
115. Turell MJ, Lee JS, Richardson JH, Sang RC, Kioko EN, Agawo MO, et al. Vector competence of Kenyan *Culex zombaensis* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Rift Valley fever virus. *J Am Mosq Control Assoc*. 2007; 23(4): 378-82.
116. Knight RL, Schultz KLW, Kent RJ, Venkatesan M, Griffin DE. Role of N-linked glycosylation for sindbis virus infection and replication in vertebrate and invertebrate systems. *J Virol*. 2009; 83(11): 5640-5647.
117. Parker PG, Buckles EL, Farrington H, Petren K, Whiteman NK, Ricklefs RE, et al. 110 Years of Avipoxvirus in the Galapagos Islands. *Plos One*. 2011; 6(1).
118. Wang Z, Zhang X, Li C, Zhang Y, Xing D, Wu Y, et al. Vector competence of five common mosquito species in the People's Republic of China for Western equine encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012; 12(7): 605-8.
119. Kay BH, Fanning ID, Carley JG. Vector Competence of *Culex Pipiens Quinquefasciatus* for Murray Valley Encephalitis, Kunjin, and Ross River Viruses from Australia. *Am J Trop Med Hyg*. 1982; 31(4): 844-8.
120. Boyd A, Kay BH. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Culex sitiens*, *Culex annulirostris*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) for Barmah Forest virus. *J Med Entomol*. 2000 Sep;37(5): 660-3.
121. Huang G, Vergne E, Gubler DJ. Failure of Dengue Viruses to Replicate in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1992; 29(6): 911-4.
122. Kramer LD, Chin P, Cane RP, Kauffman EB, Mackereth G. Vector Competence of New Zealand Mosquitoes for Selected Arboviruses. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(1): 182-9.
123. Vazeille-Falcoz M, Rosen L, Mousson L, Rodhain F. Replication of dengue type 2 virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60(2): 319-21.

124. Bessaud M, Peyrefitte CN, Pastorino BAM, Tock F, Merle O, Colpart JJ, et al. Grandadam MI. Chikungunya virus strains, Reunion Island outbreak. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(10): 1604–1605.
125. van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT, Smith GA, Mackenzie JS. Vector Competence of Australian Mosquitoes for Chikungunya Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(5): 489-95.
126. Vazeille M, Jeannin C, Martin E, Schaffnerbl F, Failloux AB. Chikungunya: A risk for Mediterranean countries? *Acta Tropica.* 2008; 105(2): 200-2.
127. Kenney JL, Burkhalter KL, Scott ML, McAllister J, Lang FE, Webster S, et al. Entomological Investigations During Early Stages of A Chikungunya Outbreak In the United States Virgin Islands, 2014. *J Am Mosq Control Assoc.* 2017; 33(1): 8-15.
128. Jupp P, McIntosh B, dos Santos I, DeMoor P. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg;* 1981; 75(1): 15-9.
129. Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoSOne.* 2014; 13;9(10).
130. Edwards FW. New African Culicidae in the British Museum, with notes on the Genitalia of some African *Culex*. *Bull Entomol Res.* 1914; 5(1).
131. Dodson BL, Rasgon JL. Vector competence of *Anopheles* and *Culex* mosquitoes for Zika virus. *PeerJ.* 2017; 5.
132. Hart CE, Roundy CM, Azar SR, Huang JH, Yun R, Reynolds E, et al. Zika Virus Vector Competency of Mosquitoes, Gulf Coast, United States. *Emerg Infect Dis.* 2017; 23(3): 559–560.
133. Kenney JL, Romo H, Duggal NK, Tzeng WP, Burkhalter KL, Brault AC, et al. Transmission Incompetence of *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens pipiens* from North America for Zika Virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 3; 96(5): 1235–1240.
134. Lucarelli JW, Ruckert C, Chotiwan N, Nguyen C, Luna SMG, Fauver JR, et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(10).

135. Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rua A, Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, Failloux AB. *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Euro Surveill.* 2016; 21(35): 2-5.
136. Huang YJ, Ayers VB, Lyons AC, Unlu I, Alto BW, Cohnstaedt LW, et al. *Culex* Species Mosquitoes and Zika Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16(10): 673-6.
137. Hall-Mendelin S, Pyke AT, Moore PR, Mackay IM, McMahon JL, Ritchie SA, et al. Assessment of Local Mosquito Species Incriminates *Aedes aegypti* as the Potential Vector of Zika Virus in Australia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(9).
138. Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau VM. Acquittal of *Culex quinquefasciatus* in transmitting Zika virus during the French Polynesian outbreak. *Acta Trop.* 2017; 173: 200-201.
139. Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM, Barbosa da Silva KA, Castro MG, et al. *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(9).
140. Fernandes RS, Campos SS, Ribeiro PS, Raphael LM, Bonaldo MC, Lourenço-de-Oliveira R. *Culex quinquefasciatus* from areas with the highest incidence of microcephaly associated with Zika virus infections in the Northeast Region of Brazil are refractory to the virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017; 112(8): 577-579.
141. Guedes DR, Paiva MH, Donato MM, Barbosa PP, Krokovsky L, Rocha SWDS, et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect.* 2017; 6(8).
142. Guo XX, Li CX, Deng YQ, Xing D, Liu QM, Wu Q, et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerg Microbes Infect.* 2016; 5(9).
143. Linné CV, Lars S. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* Holmiae: Impensis Direct. Laurentii Salvii; 1758.
144. Barr AR. The distribution of *Culex p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* in North America. *Am J Trop Med Hyg.* 1957; 6(1): 153-65.
145. Jakob WL, Daggers SA, Francy DB, Mullenix J, Moseley K. The *Culex pipiens* complex in Memphis, Tennessee. *Mosq Syst.* 1979; 11(3): 179–86.

146. Jakob WL, Francy DB, Mullenix J, Taylor SA. Further studies on the *Culex pipiens* complex in Memphis, Tennessee. Mosq Syst. 1980; 12(3): 371–6.
147. Tabachnik WJ, Powell JR. Genetic analysis of *Culex pipiens* populations in the Central Valley of California. Ann Entomol Soc Am. 1983; 76(4): 715–20.
148. Pryor SC, Daly J. Temporal variation in morphological and genetic characteristics within a hybrid population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1991; 28(4): 481-6.
149. Harbach RE. *Culex Pipiens*: Species versus species complex - taxonomic history and perspective. J Am Mosq Control Assoc. 2012; 28(4 Suppl): 10-23.
150. Urbanelli S, Silvestrini F, Reisen W, De Vito E, Bullini L. Californian hybrid zone between *Culex pipiens pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* revisited (Diptera:Culicidae). J Med Entomol. 1997; 34(2): 116-27.
151. Kothera L, Zimmerman E, Richards C, Savage HM. Microsatellite characterization of subspecies and their hybrids in *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) mosquitoes along a north–south transect in central United States. J Med Entomol. 2009; 46(2): 236-48.
152. Huang S, Molaei G, Andreadis TG. Reexamination of *Culex pipiens* hybridization zone in the Eastern United States by ribosomal DNA-based single nucleotide polymorphism markers. Am J Trop Med Hyg. 2011; 85(3): 434-41.
153. McAbee RD, Green EN, Holeman J, Christiansen J, Frye N, Dealey K, et al. Identification of *Culex pipiens* complex mosquitoes in a hybrid zone of West Nile virus transmission in Fresno, California. Am J Trop Med Hyg. 2008; 78(2): 303-10.
154. Morais SA, Moratore C, Suesdek L, Marrelli MT. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(5): 672-6.
155. Morais SA, de Almeida F, Suesdek L, Marrelli MT. Low genetic diversity in *Wolbachia*-infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2012; 54(6): 325-9.
156. Humeres S, Almirón W, Sabattini M, Gardenal C. Estimation of genetic divergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93(1): 57-62.

157. Micieli MV, Matacchiero AMYC, Muttis E, Fonseca DM, Aliota MT, Kramer LD. Vector competence of Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus). *J Med Entomol.* 2013; 50(4): 853–862.
158. Gomes B, Alves J, Sousa CA, Santa-Ana M, Vieira I, Silva TL, Almeida AP, et al. Hybridization and population structure of the *Culex pipiens* complex in the islands of Macaronesia. *Ecol Evol.* 2012;2(8): 1889-902.
159. Cornell A, Mcabee R, Rasgon J, Stanich M, Scott T, Goetzee M. Difference in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* in California and South Africa. *J Med Entomol.* 2003; 40(1): 36-51.
160. Sanogo YO, Kim CH, Lampman R, Halvorsen JG, Gad AM, Novak RJ. Identification of male specimens of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in the hybrid zone using morphology and molecular techniques. *J Med Entomol.* 2008; 45(2): 203-9.
161. Shaikevich EV, Zakharov IA. Coevolution of symbiotic bacteria *Wolbachia* and host mtDNA in Russian populations of the *Culex pipiens* mosquito complex. *Genetika.* 2014; 50(11): 1390-3.
162. Ciota AT, Chin PA, Kramer LD. The effect of hybridization of *Culex pipiens* complex mosquitoes on transmission of West Nile virus. *Parasit Vectors.* 2013; 6(1): 305.
163. Brown HE, Childs JE, Diuk-Wasser MA, Fish D. Ecological factors associated with West Nile virus transmission, northeastern United States. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(10): 1539-45.
164. Kilpatrick AM. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science.* 2011; 334(6054): 323-7.
165. Kent RJ, Harrington LC, Norris DE. Genetic differences between *Culex pipiens* f. *molestus* and *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New York. *J Med Entomol.* 2007; 44(1): 50-9.
166. Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, et al. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science.* 2004; 303(5663): 1535–8.

167. Fonseca D, Keyghobadi N, Malcolm C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer R, et al. Reply to outbreak of West Nile virus in North America. *Science*. 2004; 306: 1473–5.
168. Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, Antelo B, et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science*. 2010; 330(6000): 86-8
169. Page AW, Orr-Weaver TL. The *Drosophila* genes *grauzone* and *cortex* are necessary for proper female meiosis. *J Cell Sci*. 1996; 109 (Pt 7): 1707-15.
170. Harms E, Chu TY, Henrion G, Strickland S. The only function of *grauzone* required for *Drosophila* oocyte meiosis is transcriptional activation of the *cortex* gene. *Genetics*. 2000; 155(4): 1831-9.
171. Chen B, Harms E, Chu TY, Henrion G, Strickland S. Completion of meiosis in *Drosophila* oocytes requires transcriptional control by *Grauzone*, a new zinc finger protein. *Development*. 2000; 127(6): 1243-51.
172. Almeida, F. Análise comparativa de *Culex quinquefasciatus* infectados e não-infectados por *Wolbachia pipientis*. Dissertação (Mestrado) 2008.
173. Almeida, F. Alterações reprodutivas causadas pela infecção por *Wolbachia pipientis* em *Culex quinquefasciatus*. Tese (Doutorado) 2012.
174. Baldo L, Hotopp JCD, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, et al. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol*. 2006. 72(11): 7098-110.
175. Dobson SL, Rattanadechakul W. A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol*. 2001. Nov; 38(6): 844-9.
176. Wilke ABB, Vidal PO, Suesdek L, Marrelli ML. Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. 2014. 7: 468.

ANEXO A - Relatório da empresa BPI Biotecnologia para infecção de *Wolbachia*.

Av. Deputado Dante Delmanto, 1649
CEP 18608-393 BOTUCATU - SP

T +55 14 38135094
contato@bpi-biotecnologia.com.br

Botucatu, 10 de março de 2017

À: Butantan

A/C: Dr^a Stella Noguera

Ref.: Amplificação do DNA – PCRs

PQ042R/17

Amplificação do DNA

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 1.0µM de oligonucleotídeo forward e 1.0µM de oligonucleotídeo reverse, 0.8uL MgCl₂ (a 50nM da Invitrogen), 1.0uL de DMSO, 40ng de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20uL. Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados e encaminhados pela cliente.

Para a amplificação da região *ftsZ* (524pb) foram utilizados os primers *ftsZ_F1* (ATYATGGARCATATAAARGATAG) e *ftsZ_R1* (TCRAGYAATGGATTR GATAT) conforme descrito por Baldo et al.,2006. O programa de amplificação para região *ftsZ* consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 54°C por 45seg; extensão a 72° por 1 min e 30 seg. e uma extensão final a 72°C por 7 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Para a amplificação da região *wsp* (603pb) foram utilizados os primers *wsp_F1* (GTCCAATARSTGATGARGAAAC) e *wsp_R1* (YGCACCAAYAGYRCTRTA AA) conforme descrito por Baldo et al.,2006. O programa de amplificação para região *wsp* consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 59°C por 45seg; extensão a 72°

por 1 min e 30 seg. e uma extensão final a 72°C por 7 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Após reação de amplificação de cada amostra para as duas regiões, comprovamos a amplificação, através de eletroforese em gel de agarose.

Abaixo imagens das amplificações realizadas

Figura 1: Análise da amplificação da região *ftzZ*.

Da esquerda para direita: amostras (PIN, Selv, Ibex, 9, 14, 15, 21, 30, 32, 35, 36); **(+) positivo:** (Controle positivo da reação, amostra PIN); **Bco:** branco (Controle negativo da reação). Peso molecular 100bp DNA Ladder (LudwigBiotec, Brazil); Gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v).

Figura 2: Análise da amplificação da região *wsp*.

Da esquerda para direita: amostras (PIN, Selv, Ibex, 9, 14, 15, 21, 30, 32, 35, 36); **(+) positivo:** (Controle positivo da reação, amostra PIN); **Bco:** branco (Controle negativo da reação). Peso molecular 100bp DNA Ladder (LudwigBiotec, Brazil); Gel de agarose 2% corado com UniSafe Dye 0,03% (v/v).

Como podemos observar nas figuras 1 e 2 as amostras 9, 15, 21, 30, 32, 35 e 36 apresentaram uma amplificação fraca, isto provavelmente ocorreu devido à baixa concentração e degradação do DNA. No entanto, todas as amostras foram positivas para a amplificação.

ANEXO B - Relatório da empresa BPI Biotecnologia para tentativa de sequenciamento completo do gene *grauzone* de *Culex quinquefasciatus*.

Av. Deputado Dante Delmanto, 1649
CEP 18608-393 BOTUCATU - SP

T +55 14 38135094
contato@bpi-biotecnologia.com.br

Botucatu, 2017

À: Butantan

A/C: Dr^a Stella Nogueira

Ref.: Sequenciamento *grauzone*

Relatório de Ensaios Realizados para Gene *Grauzone*

Amplificação e sequenciamento do gene *Grauzone* de *Culex pipiens quinquefasciatus*

Objetivo

Amplificação do gene *Grauzone* de *Culex pipiens quinquefasciatus* via PCR para sequenciamento pelo método de Sanger.

Desenvolvimento do serviço

Ao chegar ao laboratório BPI as amostras enviadas pelo cliente identificadas como DNA de *Culex pipiens quinquefasciatus* seguiram para o laboratório e foram estocadas em freezer -20° C.

1) Desenho dos primers:

Foram desenhados pela BPI três pares de primers (oligonucleotídeos iniciadores) utilizando o programa Primer 3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), tomando por base a sequência genômica mandada pelo cliente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6037611>), cujo número de acesso no

Genbank é ref|NW_001886807.1|:376148-380925 referente ao supercontigue 3.107 onde o gene *Grauzone* está inserido na posição 377755 a 379375.

Um par de primer foi desenhado na região flanqueadora do gene (posição dos primers: Forward: 377641 a 377658 e Reverse: 379550 a 3795670) para amplificar um segmento de 1930 pares de bases, dentro do qual se encontram os 1320 pares de bases do gene total. Outros dois pares de primers foram desenhados para amplificar dois segmentos internos menores, assim garantido a cobertura total do gene (Fig 1 e Fig.2).

TTTGAGAAACACCTTGCAAGCTTGCCTAATTTCAATTTAAACCATTTCTAGCTGAATGCAAATTGTTGTGTGAGCCTCTACTGTTGATGTGAACTGTTGACGTTT
 GTTAAACTTCAACAGCTGTCACTTCATTCTGTGAAAGACAACAACAAAACTAAAAATTTTCATTTCTCAACTTTTTTTCGTAATTTCCGGCACGTATTCGCTACAA
 TTCAACGGTTTTCGGGTGCGCGGACACTTTCCCTTGTGTGCCCTTCAAATTGCAOCAAACAGGTGAGAAATCCTTCTAATCTGCATTATTTTGCACTTCAAGGT
 TGCATAACGGAACCTTTGTTTACAGAATGGAATTCGAGCAAGAGCAGCCGGAGCCAGTTCCGGCGGAGGCGGATCCACCACCGGCCACGTCCGCACCTGCAAT
 TAAAGCCTGCGGGCTGTGCTGTGCAAGAACTCGTCCATCACGCCGGTGGTCCGGAGGACGACGCGATGCGCCAGAAGGTGGACAAGATCTTCTACTTCCAA
 ATTGTGCGAGGGGCGCGGAGCGGAGGGTTGATTGCGAGACGTGTCTGTAACCGTTGATGGTTCTACGAGTACGCGGAGCAGGTGCTGCGGAACAGCA
 GTTTCTGCGCTCGACGATGTCGCTCGGGTTCGGGGTTGAGTACGGACGAGGCGCGACGATCAAGCAGGAGTTTATTAAAGCACGAACCGGACGAGACGGA
 GTGGGTGCGGGTGGACACTATTGTGAGACGCGGATTGAGGGCGATCAGGACTGGGTGCTGGATGATGGGGAGGAGGTAGAGGATGGGGAGGGTGACGTT
 ACGGATTCAATGAGTGATGGTGAGGGCGAAGAGGGGACGGAGTTTGTGCGAGACGTTAAACCGAAGCGGAAGTATACGAAGAGGAAGAACCGGTTGATGGC
 TAAGAAACCAAAATATCAAGAAGGAACAGGATTGGATAATCCGCCGATTGACAAGCTGTTCTGCGAGCTACAAGCTGCTGCGATGTTTTCGCGGAA
 CCGCTGGAAGATTTTCAACGAGCTGCGGAAGCACTACAAGTACGTACACAACGAGCCGGGCTATCTTAAGTGTGCAACAAGAAGATCTACAAAAAGTCTCGGA
 TGATTGAGCATTCACTGCATTGAATCCGGACGCGTTCATTGTGCGCTCTGCAACAAAGCTACAGCTCGAGCAAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAG
 GTCCACGCGCCGGAAGAGAACCACCCTTCAAGTGCAGAACATGCTTCAAACCGTTGCTGTCCAACGCCCATCTCAACGCCACATCATGGTTCGCGCACCGGTT
 CGTCCCGTGTCTCAATGTCCCAAAGTCTCGCTTCGCAAGGTTCCCTCAAGAAGCACTCGTGCGGATGCGCGGGAAGGCGAAGCAGCAGTTTTCGACGCT
 GCGCGCGCTCTCCGCTCCAAGCAGTGTTCGAAACCCACGTCCAGGGCCACCTCGGGACGCGCTCTGCAACAAAGCTACAGCTCGAGCAAAAGTTCTTAAAGAACACACCAAGAG
 CTCAACGACAAGTACTGCTCAACAAACATGCGCCGCGATGCAAGTCAAGAAATAGCGCTGTCTGCGAGCTGTGCGGCAAGCAGGTCCGCAACCAAGGACG
 CCCTCAACTGCCACGTGCGCCGGGCGCACACCGAAAGCCGCTACGAGTGCAGATGTGCAAGAAGAAGTTCAAGCGGCCGACCATGAGAGTTAGTCGAA
 GCTCCAAACCCGGTTTCAATTTAAAACTATTGTTTCAATTTACGAGGAACACATTGCGATCCACCACCGGCGAGGACATTTACAGCTGCAACCACTGCAC
 GGAGCGTTTCAACACGAAAAACAAGCAGTACCTGCAACGGAAGACGCCCCACCCGGTTCGAGTACGAGGCCGAGATGCGCAAGCGGATGATGAAGGATGCGT
 GAGGGGGTGAAATGGTTGGTATTGTGTCAAAGAATTGGCAGGAATCTTTATCCGAAAGTATTTGTGTCGGGAAAAAAGTATTTCTACTGAGTTCAATGA
 GTTTTTTTGTGCAAGTGTGAGAAAGTTTCGAGCTATTCTGAGAAATAGAGTCTTCAAGTGGCTTTCAACTTGGGCTTGGCATCTCTGTGAAGATTCTACGT
 CTGAAGGATCTCGGCCGGGATTGCAACTGACGATTGTGGGTCCAACGCGCACTCAAGGTTGTGGCTTTCGAAATGGCCATTTTCATGTCCATTAGGCCGATG
 CAAATATTTAAAAAGTTTTTGTCCCTCGGCCCTGGCCGAGGTCAAGGGGGGGGCAAAAAAATAAAAAATATAAAAAATTAATAACAAGCCATAGTCTTCAC

Figura 1 - Segmento do super contig 3.107 genomic scaffold, whole genome shotgun equence onde o gene *Grauzone* está inserido na posição 377755 a 379375. Sublinhado: segmento amplificado pelos primers F e R. Em **vermelho**: região genômica do gene *Grauzone*. Destacados os locais de anelamento dos primers para amplificação da sequência genômica total: Grau forward: Grau-Cq_F (5'-CGCGGACACTTTCCCTTGT-3') e Grau reverse: Grau-Cq_R (5'-ACAAGAGAA TGCCAAGCCCA-3'). Amplificação dos segmentos internos: Grau-Cq_SeqF1 (5'-ATTAAGCACGAACCGGACGA-3') Grau-Cq_SeqF2: (5'-CCTCGACAACAAG GTCCA GT-3') Grau-Cq_SeqR1: (5'- GAAGCGAGGACTTTGGGACA -3') e Grau-Cq_SeqR2 (5'-TTGCACATGTCGCACTCGTA-3')

Figura 2 - Representação gráfica da porção selecionada do genoma de *Culex pipens quinquefasciatus* para amplificação do gene *grauzone* gerado pelo programa Geneious. Primers utilizados para amplificação da sequência total: *foward* (verde-escuro) e *reverse* (verde-claro). Primers utilizados para sequenciamento de porções internas: *foward* (cinza) e *reverse* (amarelo).

2) Padronização da reação e condições de PCR

2.1) Primeiros Ensaios:

As reações de PCR foram compostas de variadas concentrações de DNA molde, 10uL de GoTaq DNA Master Mix, 1ul de cada primer [10uM] e água ultrapura estéril em quantidade suficiente para totalizar 20ul de reação.

Stage	Temperatura	Tempo
Stage 1	95°C	5 min
Stage 2	95°C	30 seg
Stage 3	50 à 66°C (gradiente)	35 seg
Stage 4	72°C	2 min
	Repetir o stage 2 a 4 por 35x	
Stage 6	72°C	7 min
Stage 5	8°C	forever

Várias tentativas com gradiente de temperatura entre 50 e 66°C foram realizados para a determinação da temperatura de anelamento ideal. Os amplicons esperados eram de:

Grau-Cq_F com Grau-Cq_R: 1930 pares de bases (o gene inteiro)

Primes internos
(para sequenciamento) {

- Grau-Cq_SeqF1 com Grau-Cq_SeqR1= 677 pb
- Grau-Cq_SeqF2 com Grau-CqR = 649 pb
- Grau-CqF com Grau-Cq_SeqR1= 1149 pb
- Grau-Cq_SeqF2 com Grau-Cq_SeqR2= 204 pb.

Decidimos amplificar e sequenciar a região 18S utilizando primers universais para eucariotos para verificar a qualidade da amostra. A figura 3 mostra o alinhamento da sequência obtida com as sequências da base de dados. Pode se observar que a amostra possui similaridade de 100% com várias espécies de *Culex* (Fig. 3).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Wuchereria bancrofti genome assembly W. bancrofti_Jakarta_scaffold WBA_contig0005492	1162	1162	100%	0.0	100%	LM006754.1
☐ Culex theileri haplotype Cx. theileri-18SA 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1162	1162	100%	0.0	100%	JN051383.1
☐ Culex renatei partial 18S rRNA gene	1162	1162	100%	0.0	100%	HE600020.1
☐ Culex chidesteri partial 18S rRNA gene	1162	1162	100%	0.0	100%	HE600016.1
☐ Culex pipiens genomic DNA containing 18S rRNA gene, isolate M1	1162	1162	100%	0.0	100%	HG001282.1
☐ Culex apicinus genomic DNA containing 18S rRNA gene, isolate M2	1162	1162	100%	0.0	100%	HG001281.1
☐ Culex modestus isolate 1867 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1162	1162	100%	0.0	100%	JF837538.1
☐ Culex salinarius small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1162	1162	100%	0.0	100%	AY988449.1
☐ Culex restuans small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1162	1162	100%	0.0	100%	AY988448.1
☐ Culex pipiens quinquefasciatus small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1162	1162	100%	0.0	100%	AY988447.1
☐ Culex pipiens small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1162	1162	100%	0.0	100%	AY988446.1
☐ Culex tritaeniorhynchus 18S ribosomal RNA, partial sequence	1162	1162	100%	0.0	100%	U48395.1
☐ Culex quinquefasciatus hypothetical protein, mRNA	985	985	84%	0.0	100%	XM_001866330.1

Figura 3 - Resultado do alinhamento da sequência da região 18S das amostras do cliente com as sequências depositadas na base de dados.

2.2) Ensaios com novo primer:

Gradiente de temperatura entre 50 e 66°C foram realizados para todos os pares de primers para a determinação da temperatura de anelamento ideal (Fig.4 à .6)

Figura 4 – Gel de agarose para visualização das bandas obtidas na reação de PCR com gradiente temperatura entre 55°C à 66°C com primers internos.

Na figura 4 podemos observar que houve amplificação do DNA para a combinação de primers Grau Seq F2 e Grau Seq R2 em que era esperado um fragmento de 204 pb. Porém o fragmento gerado foi em torno de 1000 pb.

Figura 5 – Gel de agarose para visualização das bandas obtidas na reação de PCR com gradiente temperatura entre 52°C à 57°C com primers internos.

Novamente o tamanho de bandas obtidas foi diferente do esperado, que era de aproximadamente 204 pb. O fragmento obtido foi de aproximadamente 1000pb, mesmo diminuindo o range do gradiente de temperatura (Fig. 5).

Figura 6 – Gel de agarose para visualização das bandas obtidas na reação de PCR em três temperaturas (50°C, 55°C e 60°C) utilizando DNA polimerase de alta performance (Long PCR) e GoTaq Master Mix.

Na figura 6 pode-se observar várias bandas inespecíficas possivelmente devido a temperatura de anelamento muito baixa (50°C). A banda que apresentou tamanho próximo do esperado para a combinação Grau_F com Grau_R (Fig. 6) foi recortada do gel, purificada e utilizada como DNA molde para re-PCR (Fig.7).

Figura 7 – Gel de agarose para visualização das bandas obtidas na reação de PCR utilizando DNA Polimerase Long PCR e 50°C de temperatura de anelamento. 1) DNA (dl 4x): PCR utilizando como DNA molde amostra (PQ 674- DNA não infect) diluído

4x; 2) Re-PCR (674): utilizando como DNA molde banda de 1800pb extraída do gel (Fig.5).

Na figura 7 observamos que a reação que utilizou como DNA molde a banda de 1800 pb extraída do gel (Fig.5) gerou vários fragmentos inespecíficos e uma banda mais forte de tamanho diferente daquele esperado. A reação que usou como DNA molde a amostra (PQ 674- DNA não infect) gerou um fragmento de aproximadamente 1800 pb próximo ao tamanho esperado (Fig. 7), a qual foi sequenciado pelo Método de Sanger, porém, esse o sequenciamento não funcionou.

ANEXO C - Relatório da empresa BPI Biotecnologia para sequenciamento completo do gene *grauzone* de *Culex quinquefasciatus*.

Av Deputado Dante Delmanto, 1649
CEP 18608-393 BOTUCATU - SP

T +55 14 38135094
contato@bpi-biotecnologia.com.br

Botucatu, 2017

À: Butantan

A/C: Dr^a Stella Noguera

Ref.: Sequenciamento *grauzone*

PQ042R/17

Amplificação e sequenciamento do gene *grauzone* de *Culex pipens quinquefasciatus*

Objetivo

Amplificação do gene *Grauzone* de *Culex pipens quinquefasciatus* via PCR para sequenciamento pelo método de Sanger.

Desenvolvimento do serviço

Ao chegar ao laboratório BPI as amostras enviadas pelo cliente identificadas como DNA de *Culex pipens quinquefasciatus* (IBEX1, IBEX2, INFEC e N-INFEC) seguiram para o laboratório e foram estocadas em freezer -20°C.

1) Desenho dos *primers*:

A BPI desenhou 2 pares de primers (oligonucleotídeos iniciadores) usando o programa Primer 3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), tomando por base a sequência genômica mandada pela cliente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6037611>) cujo número de acesso no Genbank é ref|NW_001886807.1|:376148-380925- referente ao supercontigue 3.107 onde o gene *Grauzone* está inserido na posição 377755 a 379375.

Um primer *forward* foi desenhado para sequência genômica a partir do ATG inicial do gene e o *reverse* para a porção final (stop códon): Grau-cDNA-F: 5'-ATGGAATTCGAGCAAGAGCAG-3' e Grau-cDNA-R: 5'-TCACGCATCCTTCATCA T C C G C-3' para amplificar os 1620 pares de bases do gene total.

Um par de *primers* degenerado foi desenhado tomando por base o alinhamento de sequências de *C. quinquefaciatus* depositadas nas bases de dados e também é esperado que amplifique os 1620 pares de bases da sequência genômica: Grau-deg-F (5'-ATGGARTTYGARCARGARCAR-3') e Grau-deg-R (5'-NGCRTCYTTCATCATNCKYTT-3'). Esses *primers* degenerados receberam uma cauda M13 (M13F-CACGACGTTGTAAAACGAC) e M13R (CAGGAAACAGCTATGACC) na porção 5' para que pudessem ser sequenciados.

Além disso um par de *primers* desenhado pela cliente: FO (5'-GGCGCGACGATCAAGC-3') e RE (5'-GGCGCGTGGACCTCTT-3') renomeados respectivamente GRAU-Int F e GRAU-Int R, utilizados para amplificar um fragmento interno de 571 pares.

2) Padronização da reação e condições de PCR

2.1) Primeira tentativa:

A amostra utilizada neste primeiro teste foi a IBEX 1

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega, USL), 1 ul de oligonucleotideo *forward* [10µM] e 1 ul de oligonucleotideo *reverse* [10 uM], 20ng de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20uL.

Para a amplificação da região interna do gene *Grauzone* (571 pb) foram utilizados os primers GRAU Int F e R e para amplificação da região genômica total (1627pb) foram utilizados os primers GRAU cDNA F e R e GRAU Deg F e R. O programa de amplificação para todas as combinações consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 4 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg., anelamento com gradiente de 55°C à 66°C por 45seg; extensão a 72°C por 2 min. e

uma extensão final a 72°C por 7 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador BioRad MyCycler Thermal Cycler (BioRad).

Figura 1: Gel de agarose para visualização do produto de PCR com gradiente de temperatura. Amostra: IBEX 1 cujas temperaturas testadas estão descritas na Tabela 1 (abaixo). Gel de agarose 2% corado com 0,1% de Uni Safe Dye (Uniscience).

Tabela 1 – Temperaturas usadas para o PCR Gradiente com amostra IBEX 1.

	A 66°C	B 65,1°C	C 63,8°C	D 61,7°C	E 59°C	F 57,1°C	G 55,8°C	H 55°C
Amplificação				X	X	X	X	X

Houve amplificação somente para o fragmento de 571 pares de bases dada pelos primers internos. A amplificação se deu nas temperaturas de 59,0°C e 61,7 °C (Fig. 1 e Tab. 1). Os demais *primers* não funcionaram.

2.2) Segunda tentativa:

O restante das amostras IBEX2, Infec e N-Infec foram testadas com os primers internos na temperatura de 61,7°C, melhor condição observada na amplificação anterior com amostra IBEX 1 (Fig. 1).

Para a amplificação das amostras manteve-se as mesmas condições de reação e ciclagem do item 2.1.

Não houve amplificação para nenhuma amostra.

2.3) Terceira tentativa:

As amostras IBEX 1, IBEX 2, Infec e N-Infec foram submetidas a um novo gradiente de temperatura (entre 57°C e 63°C descritas Tabela 2) utilizando os *primers* internos Grau-Int F + Grau-Int R (Fig. 2A e 2B). Para a amplificação das amostras manteve-se as mesmas condições de reação e ciclagem do item 2.1.

Tabela 2 – Temperaturas usadas para o PCR Gradiente com as amostras IBEX-1, IBEX-2, INFEC e N-INFEC e respectivas amplificações.

	A 63°C	B 62,5°C	C 61,8°C	D 60,6°C	E 59,2°C	F 58,1°C	G 57,4°C	H 57°C
IBEX 1			X	X	X		X	X
IBEX 2					X	X		X
INFEC								
N-INFEC		X	X		X		X	X

Figura 2A: Gel de agarose para visualização dos produtos de PCR do Gradiente de temperatura. Amostras: IBEX1, IBEX 2 e Infec. Gel de agarose 2% corado com 0,1% de Uni Safe Dye (Uniscience).

Figura 2B: Gel de agarose para visualização dos produtos de PCR Gradiente de temperatura. Amostra: N-Infec. Gel de agarose 2% corado com 0,1% de Uni Safe Dye (Uniscience).

A melhor banda de amplificação das amostras IBEX 1, IBEX 2 e N-Infec foram purificadas com AmPure e seguiram para sequenciamento

2.4) Quarta tentativa:

Na tentativa de conseguir a amplificação do gene *Grauzone* total (1620 pb), as amostras IBEX 1, IBEX2, Infec e N-Infec foram submetidas a um novo gradiente com temperaturas mais baixas: entre 47°C e 60°C utilizando os *primers* Grau-cDNA F + Grau-cDNA R e o Grau-deg F + Grau-deg R que amplificam o gene todo a partir do ATG inicial.

Para a amplificação das amostras manteve-se as mesmas condições de reação e ciclagem do item 2.1. Não houve amplificação para nenhuma amostra.

2.5) Quinta tentativa:

Na tentativa de conseguir a amplificação do gene *Grauzone* total (1620 pb), foi resolvido combinar os *primers* Grau-deg F + Grau- int R e Grau-DNA deg R + Grau- int F. e Grau-cDNA F+ Grau-int R e Grau- cDNA R+ Grau- int F (Fig. 3) utilizando as amostras IBEX 1, IBEX2, Infec e N-Infec. Uma vez que o *primer* Interno já havia sido amplificado dentro da faixa de temperatura de 57°C e 61°C foi montado um gradiente

entre 56°C e 61°C. A reação de PCR foi feita como no item 2.1 mudando a quantidade de DNA para 2 µL.

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega, USL), 1 ul de oligonucleotideo *foward* [10µM] e 1 ul de oligonucleotideo *reverse* [10 µM], 40ng de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20uL.

Figura 3: Esquema representativo do gene *grauzone* e dos seguimentos amplificados pelos *primers* utilizados no projeto.

Não houve amplificação para nenhuma amostra.

2.6) Sexta tentativa:

Nova tentativa de conseguir a amplificação do gene *Grauzone* total (1620 pb) as amostras IBEX1, IBEX2, Infec e N-Infec foram submetidas a um PCR *touchdown* onde a temperatura de anelamento inicia em 45°C com um incremento de 1°C por ciclo chegando até 60°C (15 ciclos), seguido de 35 ciclos de amplificação numa temperatura de anelamento de 52°C.

Foram utilizadas as seguintes combinações de primers:

Grau-cDNA F+ R

Grau-DNA deg F+ R

Grau-deg F + Grau- int R

Grau-deg R + Grau- int F

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega, USL), 1,5 ul de oligonucleotideo *foward* [10µM] e 1,5 ul de oligonucleotideo reverse [10 uM], 0,8uL MgCl₂ (a 50nM da Invitrogen), 1,0uL de DMSO, 40 ng de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20uL.

O programa de amplificação para todas as combinações consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 4 min, seguida por 15 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 seg., anelamento com *Touch* de 45°C à 60°C por 30seg. (com incremento de 1°C a cada ciclo); extensão a 72°C por 1 min. e 15 seg. seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 seg., anelamento a 52°C por 30seg., extensão a 72°C por 1 min. e 30 seg. e uma extensão final a 72°C por 7 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador BioRad MyCycler Thermal Cycler (BioRad).

Não houve amplificação para nenhuma amostra como demonstra a figura 4

Figura 4: Gel de agarose para visualização dos produtos de PCR Touchdown. Amostras: **A**= IBEX1, **B**= IBEX 2, **C**= Infec, **D**= N-Infec e **Bco**= Branco. Combinação de *primers* utilizados: Grau-cDNA F+ R; Grau- deg F+ R; Grau- int F + Grau-deg R e Grau- int R + Grau-deg F. Gel de agarose 2% corado com 0,1% de Uni Safe Dye (Uniscience).

2.7) Sétima tentativa:

Nesta tentativa usamos o DNA de um *Culex spp*, de uma amostra identificada como PIN 1 e PIN 2 enviada pela cliente e a amostra IBEX 1.

As combinações de *primers* utilizadas foram:

Grau Int F+ R;

Grau-cDNA F+R

Grau-deg F + R

A ciclagem utilizada foi a descrita acima para PCR touchdown e a reação de PCR foi feita segundo a tabela abaixo:

Para a amplificação das amostras manteve-se as mesmas condições de ciclagem do item 2.6 e e reação descrita no item 2.1. Houve amplificação do fragmento interno GRAU Int, para a amostra *Culex* e para amostra PIN houve amplificação do fragmento interno e do gene total (Fig. 5).

Figura 5: Gel de agarose para visualização dos produtos de PCR *Touch*. Amostras: **A=** PIN 1 **B=** IBEX 1, **C=** PIN 2, **Bc=** Branco. Combinação de primers utilizados: Grau-int F+ Grau- int R; Grau-cDNA F+ Grau-cDNA R; Grau- deg F+ Grau- deg R. Gel de agarose 2% corado com 0,1% de Uni Safe Dye (Uniscience).

As amostras PIN 1 e 2 foram purificadas com AmPure e seguiram para sequenciamento.

Entramos em contato com o cliente e este nos deu autorização em substituir as amostras IBEX (pool) pela amostra DNA14, que também é da mesma colônia e é a amostra de apenas um indivíduo.

2.8) Oitava tentativa:

Nesta tentativa usamos o DNA uma amostra identificada como PIN e DNA 14 cedida pela cliente e a amostra IBEX 1.

A combinação de *primers* utilizada foi: Grau-cDNA F+R

A ciclagem utilizada foi a descrita acima para PCR touchdown e a reação de PCR foi feita segundo a tabela abaixo:

Para a amplificação das amostras manteve-se as mesmas condições de ciclagem do item 2.6 e a reação descrita no item 2.1. Houve amplificação da porção codificante total do gene para as amostras IBEX 1, PIN e DNA14 (Fig. 6).

Figura 6: Gel de agarose para visualização dos produtos de PCR *Touch*. Amostras: 1: Peso molecular 100 pb, 2= IBEX 1, 3= PIN, 4= Branco, 5=DNA 14. Combinação de primers utilizados: Grau-cDNA F+ Grau-cDNA R. Gel de agarose 2% corado com 0,1% de Uni Safe Dye (Uniscience).

As amostras foram purificadas com AmPure e seguiram para sequenciamento.

3) Sequenciamento Sanger

As amostras IBEX 1, IBEX 2, N-Infec, amplificadas pelo *primers* Grau-int F + Grau-int-R e as amostras PIN e DNA14 amplificadas pelos *primers* Grau-cDNA-F e Grau-cDNA-R foram purificadas com AmPure e foram sequenciadas.

3.1) Sequenciamento da amostra IBEX 1 amplificada pelos primers internos (571 pb)

O resultado do sequenciamento do fragmento interno de 571 pares de bases do gene *Grauzone* para a amostra IBEX 1 foi usado para fazer um alinhamento com sequências semelhantes depositadas no banco de dados NCBI utilizando a ferramenta BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> cujo resultado foi uma identidade de 97% com o gene *Grauzone* de *Culex quinquefasciatus* (XM001847451.1) (Fig 7). A sequência fasta deste número de acesso foi usada para fazer um alinhamento com a sequência obtida do sequenciamento na plataforma *online* Multialin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Fig.8).

Figura 7: Representação gráfica do alinhamento do resultado do sequenciamento da amostra IBEX1 amplificada pelos *primers* Grau-int-F e Grau-int-R feito pela ferramenta BLAST disponível no site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Figura 8: Resultado do alinhamento da amostra IBEX1 amplificada pelos primers Grau-int-F e Grau-int-R com o número de acesso XM001847451.1 pela plataforma Multalin disponível no site <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

3.2) Sequenciamento da amostra IBEX 2 amplificada pelos primers internos (571 pb)

O resultado do sequenciamento do fragmento interno de 571 pares de bases do gene *Grauzone* para a amostra IBEX 2 foi usado para fazer um alinhamento com sequências semelhantes depositadas no banco de dados NCBI utilizando a ferramenta BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> cujo resultado foi uma identidade de 97% com o gene *Grauzone* de *Culex quinquefasciatus* (XM001866304.1 (Fig 9). A sequência fasta deste número de acesso foi usada para fazer um alinhamento com a sequência obtida do sequenciamento na plataforma *on line* Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Fig. 10).

Figura 9: Representação gráfica do alinhamento do resultado do sequenciamento da amostra IBEX2 amplificada pelos primers Grau-int-F e Grau-int-R feito pela ferramenta BLAST disponível no site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Figura 10: Resultado do alinhamento da amostra IBEX2 amplificada pelos primers Grau-int-F e Grau-int-R com o número de acesso XM001866304.1 pela plataforma Multalin disponível no site <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

3.3) Sequenciamento da amostra N-infec amplificada pelos primers internos (571 pb)

O resultado do sequenciamento do fragmento interno de 571 pares de bases do gene *Grauzone* para a amostra N-Infec foi usado para fazer um alinhamento com sequências semelhantes depositadas no banco de dados NCBI utilizando a ferramenta BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> cujo resultado foi uma identidade de 97% com o gene *Grauzone* de *Culex quinquefasciatus* (XM001847451.1) (Fig 11). A sequência fasta deste número de acesso foi usada para fazer um alinhamento com a sequência obtida do sequenciamento na plataforma *on line* Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Fig.12).

Figura 11: Representação gráfica do alinhamento do resultado do sequenciamento da amostra IBEX2 amplificada pelos primers Grau-int-F e Grau-int-R feito pela ferramenta BLAST disponível no site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Figura 12: Resultado do alinhamento da amostra N-Infec amplificada pelos primers Grau-int-F e Grau-int-R com o número de acesso XM001847451.1 pela plataforma Multialin disponível no site <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

3.4) Sequenciamento da amostra PIN amplificada pelos Grau-cDNA-F e Grau-cDNA-R (1620 pb)

O produto de PCR obtido pela amplificação dos *primers* Grau-cDNA-F e Grau-cDNA-R (1620 pb) foi usado para sequenciamento.

Os novos fragmentos obtidos e os fragmentos sequenciados anteriormente (item 3.5) foram usados para construir uma sequência consenso da amostra PIN no programa Geneious 4.8.3.

Assim foi obtida uma sequência de 1530 pb a qual foi utilizada para alinhamento com as sequências semelhantes depositadas no banco de dados no NCBI utilizando a ferramenta BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> cujo resultado foi uma identidade de 98% com o gene *Grauzone* de *Culex quinquefasciatus* (XM001847451.1) (Fig 13). Não foi possível o sequenciamento de aproximadamente 50 pares de bases da porção inicial e de 40 pb da porção final do gene, pois os primers Grau-cDNA que deveriam cobrir estas porções sequenciadas não foram eficientes. A sequência fasta do número de acesso XM001847451.1 foi usada para fazer um alinhamento com a sequência consenso obtida do sequenciamento na plataforma *on line* Multialin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Fig.14).

Figura 13: Representação gráfica do alinhamento da sequência consenso da amostra PIN feito pela ferramenta BLAST disponível no site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Figura 14: Resultado do alinhamento da sequência consenso da amostra PIN com o número de acesso XM.001847451.1 pela plataforma Multalin disponível no site <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

3.5) Sequenciamento da amostra DNA 14 amplificada pelos Grau-cDNA-F e Grau-cDNA-R (1620 pb)

O produto de PCR obtido pela amplificação dos *primers* Grau-cDNA-F e Grau-cDNA-R (1620 pb) na amostra DNA 14 foi usado para sequenciamento utilizando os *primers* internos: Grau-int-F, Grau-int-R.

Os vários fragmentos obtidos no sequenciamento da amostra DNA 14 foram usados para fazer um alinhamento com a sequência referência (XM-001866304.1) depositada no NCBI por meio do programa Geneious 4.8.3. Assim foi obtida uma sequência consenso de 1075 pares de bases que submetida ao banco de dados NCBI por meio da ferramenta BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> resultou em uma identidade de 96% com o gene *Grauzone* de *Culex quinquefasciatus* (XM001847451.1) (Fig. 15). A sequência fasta deste número de acesso foi usada para fazer um alinhamento com a sequência consenso obtida do sequenciamento na plataforma *on line* Multialin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Fig.16).

Figura 15: Representação gráfica do alinhamento da sequência da amostra DNA 14 pela ferramenta BLAST disponível no site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Figura 16: Resultado do alinhamento da sequência consenso da amostra DNA 14 com o número de acesso XM.001847451.1 pela plataforma Multialin disponível no site <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

As sequências consenso das amostras PIN e DNA 14 foram utilizadas para fazer um alinhamento entre si na plataforma *on line* Multialin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Fig.17).

Figura 17: Resultado do alinhamento das sequências consenso das amostras PIN e DNA 14 pela plataforma Multalin disponível no site <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>