

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Doutorado em Saúde Pública

Alessandra Lima de Albuquerque

---

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Wolbachia*  
*pipientis* EM POPULAÇÕES DE  
CULICÍDEOS VETORES E NO PARASITO  
*Wuchereria bancrofti***

---

RECIFE

2011



ALESSANDRA LIMA DE ALBUQUERQUE

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Wolbachia pipientis* EM POPULAÇÕES DE  
CULICÍDEOS VETORES E NO PARASITO *Wuchereria bancrofti***

Tese apresentada ao curso de Doutorado em  
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres**

**Co-orientadores: Dr. Abraham Rocha**

**Dra. Tereza Magalhães**

**RECIFE  
2011**



## Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

---

A345d Albuquerque, Alessandra Lima.

Diversidade genética de *Wolbachia pipientis* em populações de culicídeos vetores e no parasito *Wuchereria bancrofti*. / Alessandra Lima Albuquerque. — Recife: A. L. Albuquerque, 2011.

90 p.: il, tab, graf.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres.

Co-orientadores: Abraham Rocha e Tereza Magalhães

1. *Wolbachia* – genética. 2. Controle vetorial. 3. Filariose - patologia - terapia I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Rocha, Abraham. IV. Magalhães, Tereza. V. Título.

CDU 616.995.132

---



**ALESSANDRA LIMA DE ALBUQUERQUE**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Wolbachia pipientis* EM POPULAÇÕES DE  
CULICÍDEOS VETORES E NO PARASITO *Wuchereria bancrofti***

Tese apresentada ao curso de Doutorado em  
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu  
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 02 de agosto de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Nilma Cintra Leal

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (membro interno)

---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (membro interno)

---

Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (membro externo)

---

Dra. Marise Sobreira Bezerra da Silva

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (membro externo)

---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (Orientadora)

---

Dr. Abraham César de Brito Rocha

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (Co-orientador)

---

Dra. Tereza Magalhães

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ (Co-orientadora)



**Dedico este trabalho às Marias da minha vida:**

Terezinha Maria, minha mãe,

Maria de Lourdes, avó materna (*In memorian*),

Maria Enoe, avó paterna.



## Agradecimentos

Aos orientadores, Constância Ayres, Abraham Rocha e Tereza Magalhães pela disponibilidade para a execução deste trabalho, em especial a Tans pelos ensinamentos, enorme paciência e por manter sempre acesa a luz da esperança.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) pelo auxílio financeiro e estrutura fornecidos.

Às pesquisadoras da Entomologia, Dra. Lêda, Dra. Maria Helena, Dra. Cláudia, Dra. Alice e Dra. Rosângela pelos generosos ensinamentos compartilhados.

A todos os amigos do departamento de Entomologia e do CPqAM pela colaboração nas minhas atividades e pela prazerosa convivência.

Ao amigo e estatístico George Tadeu pelo trabalho com os dados aqui produzidos.

A Liliane pela agradável parceria nas atividades com *Culex quinquefasciatus*.

Ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT), especialmente a Cássia e Viviane pelo trabalho indispensável e pela simpatia sempre disponíveis.

A turma de Doutorado em Saúde Pública 2007–2011, do CPqAM pelo imensurável e inesquecível prazer de tê-los como colegas de sala de aula.

Aos amigos pelos momentos de lazer e descontração que me ajudaram a passar por muitas tempestades, em especial aos meus *friends* dos sábados à tarde.

Às amigas Gerlane e Catarina pelo apoio fundamental, principalmente nos momentos finais da tese.

Às minhas professoras e amigas, Fernanda Bérnago e Rita Rafael, as quais aumentaram meu prazer pela leitura e escrita, contribuindo para a execução desse trabalho.

A Deus por mais uma batalha vencida e a minha família que constituem a essência da minha vida.



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

*Clarice Lispector (A hora da estrela, 1977)*



ALBUQUERQUE, Alessandra Lima. Diversidade genética de *Wolbachia pipientis* em populações de culicídeos vetores e no parasito *Wuchereria bancrofti*. 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

### Resumo

A bactéria endossimbionte *Wolbachia* tem sido sugerida como mecanismo de controle de insetos vetores e alvo para o tratamento das filarioses. Nesse contexto, estudos sobre a prevalência de *Wolbachia* em populações de vetores de campo, a análise da sua densidade em insetos sob diferentes condições fisiológicas e a investigação da diversidade genética da bactéria dentro e entre diferentes populações de vetores e em pacientes filarêmicos são relevantes. O presente estudo teve como objetivos: determinar o percentual de infecção em *Culex quinquefasciatus* e *Aedes albopictus* coletados em diferentes áreas da RMR - PE – BR; descrever a diversidade dos genes *ftsZ* e *wsp* nas linhagens de *Wolbachia* encontradas tanto nos vetores citados quanto nos vermes filariais coletados de pacientes microfilarêmicos da região; como também comparar a densidade da bactéria em duas populações de *C. quinquefasciatus* do estado de PE, uma susceptível e outra resistente a temefós. Nossos resultados mostraram que o simbiote *Wolbachia* está presente em 100% dos vetores analisados quando diagnosticados pelo método de PCR *seminested*, o qual se mostrou mais eficiente que a PCR convencional. Quanto à densidade do endossimbionte, as fêmeas de *C. quinquefasciatus* resistentes a organofosforados de Santa Cruz do Capibaribe, Sertão – PE, apresentaram a densidade média, cerca de sete vezes maior que às fêmeas susceptíveis de Peixinhos, RMR – PE, confirmando dados encontrados na literatura. Isto sugere que mosquitos resistentes apresentam maior dificuldade para controlar a densidade do endossimbionte provavelmente pelo custo biológico associado à resistência. Em relação à diversidade genética, os dois genes estudados não mostraram nenhuma variação nas populações observadas. A análise de outros marcadores pode ajudar a esclarecer a relação entre hospedeiros e endossimbionte dando maior suporte ao uso de *Wolbachia* no desenvolvimento de novas estratégias de controle e tratamento de doenças transmitidas por vetores.

Palavras-chave: 1. *Wolbachia* – genética. 2. Controle vetorial. 3. Filariose – patologia – terapia.



ALBUQUERQUE, Alessandra Lima. Diversidade genética de *Wolbachia pipientis* em populações de culicídeos vetores e no parasito *Wuchereria bancrofti*. 2011. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

### **Abstract**

The endosymbiont bacterium *Wolbachia* has been suggested as a tool to control insect vectors and as a target for filariasis treatment. In this context, studies on the prevalence of this bacterium in wild populations of vectors, analysis of the density of *Wolbachia* in insects under different physiological conditions and the investigation of genetic diversity within and between different populations of vectors and filaremic patients are relevant. Here, we aimed: determining the percentage of infection in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* collected in different areas of the metropolitan area of Recife – PE - BR; describing the diversity of *wsp* and *ftsZ* genes in *Wolbachia* strains found in both vectors as cited and in filarial worms collected from microfilaremic patients in the region; and quantifying the density of bacteria in *C. quinquefasciatus* populations from PE, susceptible and resistant to organophosphates as well. Our results showed that the symbiont *Wolbachia* is present in 100% of the vectors diagnosed when analyzed by *Seminested* PCR method, which proved to be more efficient than conventional PCR. Regarding the density of the endosymbiont, the females of *C. quinquefasciatus* resistant to organophosphates from Santa Cruz do Capibaribe, countryside of the state – PE, showed the average density about seven times higher than that of Peixinhos, metropolitan area of Recife – PE, females insecticide-susceptible, confirming the data found in literature. This suggests that resistant mosquitoes are more difficult to control the density of the endosymbiont probably due to the biological cost associated with resistance. Concerning genetic diversity, the two genes studied showed no variation in the populations. Analysis of other *Wolbachia* markers may help to clarify the relationship between hosts and endosymbiont giving greater support to the use of *Wolbachia* in the development of new strategies for filariasis treatment and control of vector-borne diseases.

Key words: 1. *Wolbachia* –genetics. 2. Vector Control. 3. Filariasis – pathology – therapy.



## Lista de ilustrações

Figura 1. Diagrama esquemático da filogenia de <i>W. pipientis</i> baseada em vários estudos filogenéticos. ....	19
Figura 2. Fenótipos induzidos por <i>Wolbachia</i> .....	20
Figura 3. A infecção por <i>Wolbachia</i> pode induzir diversos padrões de incompatibilidade citoplasmática.....	21
Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células de mosquito infectadas com a bactéria <i>Wolbachia</i> linhagem <i>wMelPop</i> . ....	22
Figura 5. Imunohistoquímica em nematódeos filariais com <i>Wolbachia</i> marcada com anticorpo para a proteína de superfície de <i>Wolbachia</i> (WSP).....	23
Figura 6. Diagrama esquemático das áreas de coleta de <i>A. albopictus</i> . ....	39
Quadro 1. Sequências de <i>primers</i> utilizados no diagnóstico de infecção de mosquitos por <i>Wolbachia</i> e na detecção da diversidade genética. ....	41
Figura 7. Diagrama esquemático da PCR <i>Seminested</i> em <i>A. albopictus</i> . ....	42
Figura 8. Diagrama esquemático das áreas de coleta de <i>A. albopictus</i> . ....	44
Figura 9. Diagrama esquemático da PCR <i>Seminested</i> em tubo único em <i>C. quinquefasciatus</i> . ....	46
Quadro 2. Sequências de <i>primers</i> utilizados no qPCR para detecção da densidade relativa de <i>Wolbachia</i> por <i>C. quinquefasciatus</i> . ....	47
Quadro 3. Sequências de <i>primers</i> utilizados (em preto) na detecção da diversidade genética de <i>Wolbachia</i> em <i>Wuchereria bancrofti</i> . ....	51
Figura 10. Géis de agarose 1% com produtos da PCR convencional para diagnóstico de infecção de <i>A. albopictus</i> por <i>Wolbachia</i> . ....	53
Tabela 1. Prevalência de <i>Wolbachia pipientis</i> em <i>Aedes albopictus</i> coletados em Recife-PE, Brasil. ....	54
Figura 11. Géis de agarose 1% com produtos da PCR <i>seminested</i> para diagnóstico de infecção de <i>A. albopictus</i> por <i>Wolbachia</i> . ....	54
Tabela 2. Comparação entre os métodos de PCR padrão e PCR <i>seminested</i> usados para avaliar a prevalência de <i>Wolbachia</i> em <i>Aedes albopictus</i> de Recife (EM, DI e MC) .....	55
Figura 12. Alinhamento utilizando o programa BioEdit/Clustal W das sequências de nucleotídeos entre os supergrupos A e B dos genes <i>wsp</i> (A) e <i>ftsZ</i> (B) de <i>Wolbachia</i> de <i>A. albopictus</i> . ....	57



Figura 13. Géis de agarose 1% com produtos da PCR para diagnóstico de infecção de <i>C. quinquefasciatus</i> por <i>Wolbachia</i> . .....	58
Tabela 3. Comparação entre os métodos de PCR padrão e PCR <i>seminested</i> usados para avaliar a prevalência de <i>Wolbachia</i> em <i>Culex quinquefasciatus</i> em populações da RMR do Recife. ....	59
Figura 14. Alinhamento utilizando o programa BioEdit/Clustal W das sequências de nucleotídeos entre os supergrupos A, B e D (marcadas em vermelho) do gene <i>wsp</i> (A) e <i>ftsZ</i> (B) de <i>Wolbachia</i> de <i>W. bancrofti</i> , <i>A. albopictus</i> e <i>C. quinquefasciatus</i> obtidas no estudo e das respectivas sequências referências publicadas. ....	61
Figura 15. Alinhamento utilizando o programa BioEdit/Clustal W das sequências de nucleotídeos entre os supergrupos A, B e D do gene <i>ftsZ</i> (B) de <i>Wolbachia</i> de <i>W. bancrofti</i> , <i>A. albopictus</i> e <i>C. quinquefasciatus</i> . ....	62



## Lista de abreviaturas e siglas

<b>16S rDNA</b>	Gene da subunidade 16S do RNA ribossomal
<b>AC</b>	Bairro de Alto da Conquista
<b>ace-2</b>	Gene da acetil-colinesterase 2
<b>AF</b>	Bairro de Água Fria
<b>BLAST</b>	<i>Basic local alignment search tool</i> (ferramenta básica de busca de alinhamento local)
<b>BR-OVT</b>	Armadilha de oviposição (ovitrampa)
<b>DI</b>	Bairro de Dois Irmãos
<b>dnaA</b>	Gene da proteína envolvida na replicação cromossomal de <i>Wolbachia</i>
<b>EM</b>	Bairro de Engenho do Meio
<b>F</b>	<i>Forward</i> (senso)
<b>ftsZ</b>	Gene da proteína FTSZ de divisão celular
<b>glta</b>	Gene da proteína citrato sintase
<b>groEL</b>	Gene da proteína de choque térmico 60
<b>HVR</b>	<i>Hiper variable region</i> (região hiper variável)
<b>IC</b>	Incompatibilidade citoplasmática
<b>IIT</b>	<i>Incompatible insect technique</i> (técnica do inseto incompatível)
<b>IP</b>	Município de Ipojuca
<b>IVM</b>	Ivermectina
<b>JB</b>	Município de Jaboatão dos Guararapes
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>MC</b>	Bairro de Morro da Conceição
<b>nt</b>	Nucleotídeos
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
<b>PX</b>	Bairro de Peixinhos
<b>R</b>	<i>Reverse</i> (antissenso)



<b>qPCR</b>	<i>Quantitative PCR</i> (PCR quantitativa)
<b>RMR</b>	Região metropolitana do Recife
<b>rpl8</b>	Gene da proteína ribossomal L8
<b>SIT</b>	<i>Sterile insect technique</i> (técnica do inseto estéril)
<b>SRNF</b>	Serviço de Referência Nacional em Filariose
<b>UA</b>	Unidade de antígeno
<b>wAlbA</b>	Linhagem de <i>Wolbachia</i> do supergrupo A com o hospedeiro <i>Aedes albopictus</i> como referência
<b>wAlbB</b>	Linhagem de <i>Wolbachia</i> do supergrupo B com o hospedeiro <i>Aedes albopictus</i> como referência
<b>wBm</b>	Linhagem de <i>Wolbachia</i> com o hospedeiro <i>Brugia malayi</i> como referência
<b>wMel</b>	Linhagem de <i>Wolbachia</i> com o hospedeiro <i>Drosophila melanogaster</i> como referência
<b>wMelPop</b>	Linhagem <i>popcorn</i> de <i>Wolbachia</i> com o hospedeiro <i>Drosophila melanogaster</i> como referência
<b>wPip</b>	Linhagem de <i>Wolbachia</i> com o hospedeiro <i>Culex pipiens</i> como referência
<b>WSP</b>	<i>Wolbachia surface protein</i> (proteína de superfície de <i>Wolbachia</i> )



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Tipos de interação entre o endossimbionte <i>Wolbachia</i> e os hospedeiros</b>	<b>19</b>
2.2.1 <i>Wolbachia</i> e artrópodos	19
2.2.2 <i>Wolbachia</i> e nematódeos filariais	22
<b>2.3. Aplicações práticas de <i>Wolbachia</i></b>	<b>23</b>
2.3.1. Alvo para tratamento antifilarial	23
2.3.2. Papel na resposta inflamatória do hospedeiro humano ao verme filarial	25
2.3.3. Uso de <i>Wolbachia</i> no combate aos vetores	25
<b>2.4. Diversidade genética em <i>Wolbachia</i></b>	<b>27</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>31</b>
<b>4. PERGUNTA CONDUTORA</b>	<b>33</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>5.2. Geral</b>	<b>36</b>
<b>5.3. Específicos</b>	<b>36</b>
<b>6. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b>	<b>37</b>
<b>6.1. Divisão do estudo</b>	<b>38</b>
<b>6.2. Detecção da prevalência e diversidade de <i>Wolbachia</i> para os genes <i>ftsZ</i> e <i>wsp</i> em <i>Aedes albopictus</i></b>	<b>38</b>
6.2.1. Amostras de mosquitos	38
6.2.2. Diagnóstico de infecção por <i>W. pipientis</i> em <i>A. albopictus</i>	40
6.2.2.1. PCR	40
6.2.2.2. PCR <i>Seminested</i>	41
6.2.3. Análise estatística	42
6.2.4. Identificação da diversidade de <i>W. pipientis</i> em <i>A. albopictus</i>	42
<b>6.3. Detecção da prevalência e diversidade de <i>Wolbachia</i> para os genes <i>ftsZ</i> e <i>wsp</i> em <i>Culex quinquefasciatus</i>, e identificação da densidade de <i>Wolbachia</i> em populações resistente versus susceptível</b>	<b>43</b>
6.3.1. Amostras de mosquito	43
6.3.2. Diagnóstico de infecção por <i>W. pipientis</i> em <i>C. quinquefasciatus</i>	45
6.3.2.1. PCR	45
6.3.2.2. PCR <i>Seminested</i> em tubo único	45
6.3.3. Análise estatística	46
6.3.4. Identificação da diversidade de <i>W. pipientis</i> em <i>C. quinquefasciatus</i>	46
6.3.5. Quantificação de <i>Wolbachia</i> por PCR quantitativo (qPCR) em tempo real em populações de mosquito susceptível versus resistentes	47
<b>6.4. Detecção da diversidade de <i>Wolbachia</i> para os genes <i>ftsZ</i> e <i>wsp</i> em <i>Wuchereria bancrofti</i></b>	<b>49</b>
6.4.1. Amostra de Filarídeos	49
6.4.2. Identificação da diversidade de <i>W. pipientis</i> em <i>Wuchereria bancrofti</i>	50
<b>6.5. Considerações éticas</b>	<b>51</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>8. DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>9. CONCLUSÕES</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICE A- ARTIGO NA FORMA DE COMUNICAÇÃO BREVE</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	<b>89</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

*Wolbachia* são bactérias intracelulares que infectam uma ampla variedade de artrópodos e ocorrem como linhagens distintas em nematódeos filariais (RUANG-AREERATE *et al.*, 2003). Nas últimas décadas, o endossimbionte *Wolbachia* tem despertado o interesse da comunidade científica, principalmente por causa da sua vasta abundância, dos efeitos diversos nos hospedeiros, que vão da manipulação reprodutiva ao mutualismo, e das potenciais aplicações no controle de pragas e doenças transmitidas por vetores (BOURTZIS, 2008).

As doenças transmitidas por vetores ocorrem em mais de 100 países e afetam metade da população mundial, ultrapassando 500 milhões de casos clínicos por ano. Essa situação demonstra o impacto inadequado das medidas de controle e com o intuito de promover medidas mais efetivas, esforços têm sido feitos para integrar iniciativas já existentes e apoiar a pesquisa de novas ferramentas. Nesse universo, vacinas, novas drogas e vetores modificados geneticamente fazem parte do rol das linhas de pesquisas que vêm sendo investigadas (ORGANIZAÇÃO\_MUNDIAL\_DE\_SAÚDE, 2008).

No Brasil, os vetores *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* são os mosquitos de maior ocorrência urbana, transmissores da dengue e da filariose, respectivamente (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), enquanto o *A. albopictus*, potencial vetor da dengue, cujas larvas já foram encontradas naturalmente infectadas com o vírus dengue, apresenta-se em acelerada expansão no país (SERUFO *et al.*, 1993). *Culex quinquefasciatus* por sua vez é considerado o principal vetor em todo mundo e exclusivo nas Américas de *Wuchereria bancrofti* (REGIS *et al.*, 1996), nematódeo responsável por 90% dos casos de filariose no mundo (ORGANIZAÇÃO\_MUNDIAL\_DE\_SAÚDE, 2006). Hospedeiros da bactéria *Wolbachia*, os vetores *C. quinquefasciatus* e *A. albopictus* e o nematódeo *W. bancrofti* são alvo de estudo para a construção de novas metodologias de controle das doenças que transmitem ou causam. Nesse âmbito, entre outras abordagens, tem sido proposto o uso de *Wolbachia* como um mecanismo potencial para dispersar genes que bloqueiam a transmissão de patógenos em populações naturais de insetos vetores

(SINKINS; GODFRAY, 2004). Por outro lado em relação à filariose, a bactéria *Wolbachia* além de parecer ter um importante papel na patogenicidade desta enfermidade, esse microorganismo também tem sido estudado como alvo para drogas em novas estratégias no combate da doença (HOERAUF; PFARR, 2007).

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL**

---

---

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

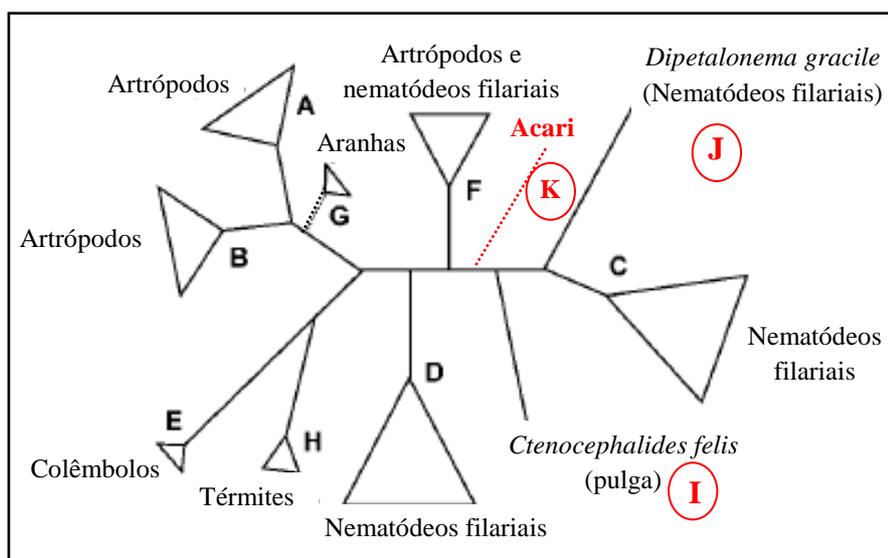
### 2.1 Classificação de *Wolbachia pipientis* Hertig, 1936

A alfa-proteobactéria *Wolbachia pipientis*, membro da ordem *Rickettsiales*, foi descrita por Hertig em 1936, vinte anos depois da descoberta da primeira *Rickettsia* pelo cientista brasileiro Henrique da Rocha Lima (KOSEK; RAO, 2007; REBOUÇAS *et al.*, 2009). Essa classe de proteobactérias constitui o maior grupo taxonômico de bactérias e contém as espécies mais relevantes para a saúde de humanos, animais e plantas. Representa ainda o conjunto com maior diversidade metabólica e ecológica (FUNKE; TORTORA; CASE, 2005). Característica essa, que o endossimbionte *Wolbachia*, abrigado por artrópodos e nematódeos filariais, demonstra com uma ampla gama de interações com seus hospedeiros que vão do mutualismo ao parasitismo (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

Na ordem *Rickettsiales*, os modernos métodos moleculares de classificação e o reconhecimento de características morfológicas e biológicas compartilhadas permitiram a reclassificação de alguns gêneros e espécies da família *Rickettsiaceae* para *Anaplasmataceae*, entre eles a bactéria *Wolbachia*. Ainda assim, diferente dos outros membros dessa família o simbiote *Wolbachia* infecta apenas artrópodos e nematódeos filariais e não os mamíferos (DUMLER *et al.*, 2001; SCOLA; BANDI; RAOULT, 2005).

A única espécie do gênero é *Wolbachia pipientis* a qual foi originalmente observada em ovários do mosquito *Culex pipiens* (HERTIG; WOLBACH, 1924). Baseado na análise das sequências da subunidade ribossomal menor 16S e principalmente nos genes *ftsZ*, *groEL*, *gltA* e *dnaA*, a espécie *Wolbachia* foi dividida em oito diferentes supergrupos (A-H) (LO *et al.*, 2007), ver figura 1. No entanto, Ros *et al.* (2009) sugerem ainda a criação dos supergrupos I, J e K (figura 1), os quais contemplariam respectivamente *Ctenocephalides felis* (pulga), *Dipetalonema gracile* (nematódeo) e *Bryobia sp.* (ácaro). Portanto, os supergrupos A, B, E, G, H, I e K ocorrem apenas em artrópodos, com exceção do F que está presente tanto no filo *Arthropoda* quanto em *Nematoda*. Em relação aos supergrupos C, D e J, eles são encontrados exclusivamente em nematódeos filariais (ROS *et al.*, 2009). No debate

sobre a classificação, é discutido se todas as bactérias do grupo *Wolbachia* seriam designadas de *W. pipientis* ou se uma nomenclatura distinta para diferentes espécies seria aplicada. Por convenção, refere-se à bactéria com designações de linhagem baseada na identificação do hospedeiro e do supergrupo (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).



**Figura 1.** Diagrama esquemático da filogenia de *W. pipientis* baseada em vários estudos filogenéticos.

**Fonte:** Lo *et al.* (2007) e Ros *et al.* (2009).

**Nota:** As letras na ponta dos ramos representam os supergrupos que foram classificados com base nos genes *ftsZ*, *groEL*, *gltA* e *dnaA*. A posição do supergrupo G, no entanto é uma possibilidade, pois foi estimada usando os genes *wsp* e *16S rDNA*. As espécies hospedeiras estão indicadas em cada clado ou linhagem. Ao diagrama original foi inserido o supergrupo K baseado em estudos com o gene *16S rDNA* e outros dois ramos também foram nomeados, os supergrupos I e J (em vermelho).

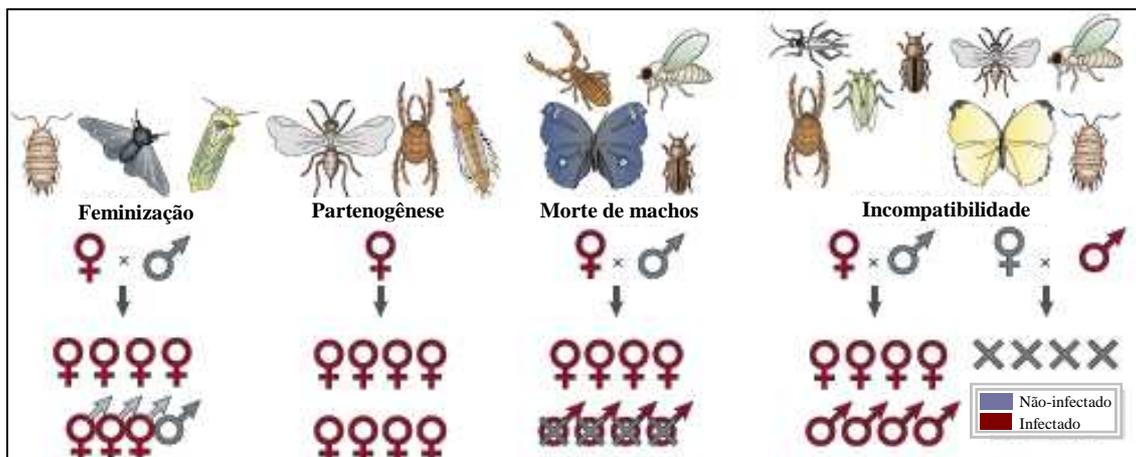
## 2.2. Tipos de interação entre o endossimbionte *Wolbachia* e os hospedeiros

### 2.2.1 *Wolbachia* e artrópodos

A bactéria *Wolbachia* é altamente adaptada para viver em células de invertebrados, ela conta com o aparelho de divisão celular do hospedeiro para ser transmitida de forma eficiente durante a divisão celular (FERREE *et al.*, 2005; SERBUS; SULLIVAN, 2007). Em recente estudo meta-analítico foi estimado que mais de 65% das espécies de inseto carregam esse endossimbionte, colocando-o entre as mais abundantes bactérias intracelulares já descobertas (HILGENBOECKER *et al.*, 2008). Esses endossimbiontes são transmitidos verticalmente (como organelas). Mas

incongruências encontradas entre as filogenias do hospedeiro e da bactéria sugerem que possam também dispersar-se horizontalmente contribuindo para a manutenção da sua distribuição generalizada (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

A habilidade para garantir a própria sobrevivência deve-se, em parte, ao fato de manipular geneticamente seus hospedeiros artrópodos, produzindo fenótipos (figura 2) como: **incompatibilidade citoplasmática (IC)**, entre espermatozoides e ovos, é o efeito mais frequentemente encontrado, evita que machos infectados tenham sucesso no cruzamento com fêmeas que não são infectadas ou que não possuam o mesmo padrão de infecção por *Wolbachia*; **partenogênese**, a qual elimina a participação dos machos na reprodução; **feminização**, resultado da transformação da prole de machos genéticos em fêmeas e **morte de machos**, onde em uma prole, os indivíduos competem pela vida, os machos infectados são eliminados e as fêmeas favorecidas (CLARK, 2007; WERREN; BALDO; CLARK, 2008). Coletivamente esses fenótipos são referidos como parasitismo reprodutivo e todos contribuem para o aumento de fêmeas infectadas e permanência do endossimbionte na natureza.



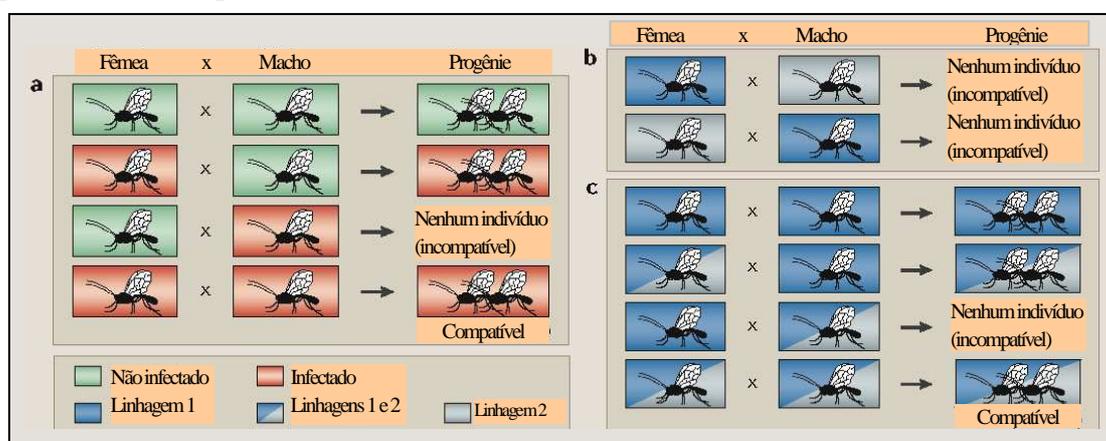
**Figura 2. Fenótipos induzidos por *Wolbachia*.**

**Fonte:** Werren *et al.* (2008).

**Nota:** Quatro distintos fenótipos reprodutivos são observados em uma gama de ordens de artrópodos. Feminização (Hemiptera, Isopoda e Lepidoptera). Partenogênese (Acari, Hymenoptera e Thysanoptera). Morte de machos (Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Pseudoscorpione). Incompatibilidade citoplasmática (Acari, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isopoda, Lepidoptera e Orthoptera).

Dos fenótipos citados, a **IC** tem sido objeto de estudo de muitos grupos. Nesta interação, o espermatozoide do hospedeiro macho infectado com o endossimbionte é incompatível (figura 3) com ovos de fêmeas não infectadas ou que não abrigam o mesmo ou os mesmos tipos da bactéria (WERREN, 1997). Embora os mecanismos

moleculares da IC ainda não estejam claros, as manifestações citológicas são descritas em muitos grupos de hospedeiros. O cruzamento incompatível acontece devido à falta de sincronismo na primeira divisão mitótica do embrião causado por um atraso na quebra do envelope nuclear e na condensação das cromátides do pró-núcleo do macho (TRAM *et al.*, 2006). Além disso, diferentes linhagens de *Wolbachia* causam diversos mecanismos de modificação no material nuclear, dessa forma, cruzamentos entre insetos infectados com linhagens distintas podem resultar em incompatibilidade bidirecional. Em populações onde há apenas um tipo de bactéria circulando a IC produzida é do tipo unidirecional (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

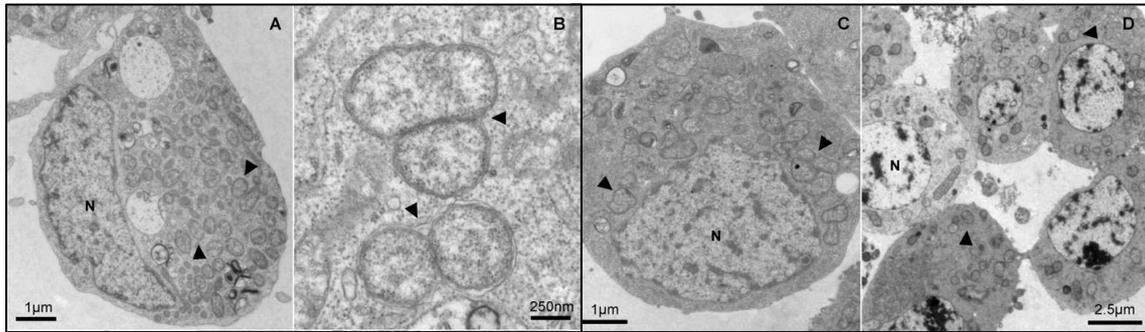


**Figura 3.** A infecção por *Wolbachia* pode induzir diversos padrões de incompatibilidade citoplasmática. **Fonte:** Sinkins e Gould (2006).

**Nota:** (A) A IC unidirecional é tipicamente vista entre populações infectadas e não infectadas; (B) A IC bidirecional ocorre entre populações que estão infectadas com diferentes linhagens de *Wolbachia* e (C) Se linhagens de *Wolbachia* bidirecionalmente incompatíveis forem combinadas para formar uma superinfecção, machos superinfectados serão incompatíveis com fêmeas que estiverem infectadas apenas por uma linhagem. Cruzamentos entre indivíduos superinfectados são completamente compatíveis. Dessa forma, a superinfecção propaga-se facilmente em populações que abrigam apenas uma das linhagens.

Algumas relações entre a bactéria e o hospedeiro precisam ser esclarecidas, como por exemplo, a proteção fornecida ao inseto ou artrópodo contra ataque de outros parasitas (vírus e protozoários). Essa defesa implica em um custo biológico para o hospedeiro, ou seja, embora diminua a infecção por outros parasitas a manutenção do simbionte *Wolbachia* envolve um gasto energético para o artrópodo (MOREIRA *et al.*, 2009). Para conhecer melhor essas associações são realizados, entre outros estudos, transfecções de linhagens de *Wolbachia* para hospedeiros pouco relacionados, com o intuito de analisar a adaptação do endossimbionte ao novo hospedeiro (figura 4). Em alguns casos, há perda do fenótipo induzido pela bactéria, esse fato pode estar relacionado à sua adaptação ao novo hospedeiro. É sugerido então o uso de linhagens de *Wolbachia* pré-adaptadas a novos hospedeiros como uma possível estratégia para

aperfeiçoar o sucesso de novas transfecções em espécies novas de inseto alvo (MCMENIMAN *et al.*, 2008).



**Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células de mosquito infectadas com a bactéria *Wolbachia* linhagem *wMelPop*.**

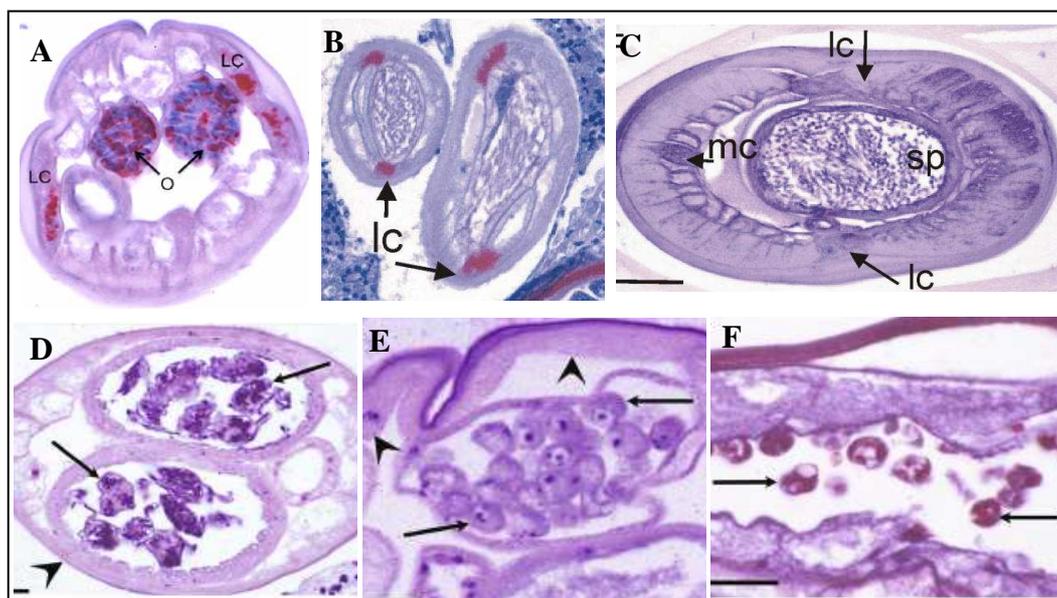
**Fonte:** McMeniman *et al.*, (2008).

**Nota:** (A) e (B) Células RML-12 de *Aedes aegypti* (N, núcleo), na primeira, micrografia com pequena resolução mostrando um grande número do endossimbionte *Wolbachia* disperso pelo citoplasma da célula (exemplos estão mostrados com a ponta da seta). Em B, aumento para visualização de quatro células de *Wolbachia* que presumivelmente estão sob o processo de divisão celular (pontas das setas). (C) Micrografia em baixa resolução mostrando a presença de muitas bactérias *Wolbachia* no citoplasma de uma célula Aa23 do mosquito *Aedes albopictus*. (D) Grupo de células MOS-55 de *Anopheles gambiae*, cada uma infectada com múltiplos endossimbiontes *Wolbachia*.

### 2.2.2 *Wolbachia* e nematódeos filariais

Nos hospedeiros filariais, esse microrganismo evoluiu de forma distinta. A sua sobrevivência é garantida através da **simbiose mutualística obrigatória** (WERREN; BALDO; CLARK, 2008). A bactéria *Wolbachia* está presente nas filárias encontradas em humanos, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia* spp., *Onchocerca volvulus* e *Mansonella* sp., mas não em *Loa loa*, ver figura 5 (PFARR; HOERAUF, 2005; ROS *et al.*, 2009). Esses endossimbiontes parecem estar presentes em 100% dos parasitos da população das espécies que os abrigam, sugerindo que são necessários para a sobrevivência e fertilização do verme. De fato, com o primeiro genoma sequenciado e completamente anotado da linhagem encontrada em *Brugia malayi*, *wBm*, novos dados reforçaram a hipótese de dependência recíproca, onde genes para a biossíntese de metabólitos essenciais ao verme foram encontrados na bactéria e vice-versa (FOSTER *et al.*, 2005).

Concordando com a natureza pandêmica da bactéria *Wolbachia*, recentemente, ela foi encontrada no nematódeo filarial *Radopholus similis*, diferente dos demais nematódeos citados, este parasita plantas e não animais. Embora o tipo de associação ainda seja desconhecido, sugere-se que devido à alta taxa de infecção observada (100%) *R. similis* não poderia sobreviver sem o endossimbionte, que é o caso dos outros nematódeos filariais (HAEGEMAN *et al.*, 2009).



**Figura 5. Imunohistoquímica em nematódeos filariais com *Wolbachia* marcada com anticorpo para a proteína de superfície de *Wolbachia* (WSP).**

**Fonte:** (A) Slatko *et al.* (2010); (B e C) Butner *et al.* (2003); (D, E e F) Mand *et al.* (2008).

**Nota:** (A) Corte transversal de fêmea adulta de *Brugia malayi*. O endossimbionte *Wolbachia* (vermelho) está presente nas cordas laterais (lc) e ovários (o). (B) Corte transversal de *Onchocerca* e *L. loa*. A bactéria encontra-se nas cordas laterais (setas) de um macho de *O. dukei*. (C) Nenhuma bactéria é vista nas cordas laterais (lc) e mediana (mc) de um macho de *L. loa*, esperma (sp). (D, E e F) Corte transversal de fêmea de *W. bancrofti* excisada de paciente por hidrocelectomia guiada por ultrassom seis semanas após o tratamento com doxiciclina mostra embriões degenerados (seta em D) e sem *Wolbachia* na hipoderme (ponta da seta), embriões e oócitos (setas em E). F, Fêmea não tratada de *W. bancrofti* com muitas bactérias em oócitos (setas).

### 2.3. Aplicações práticas de *Wolbachia*

#### 2.3.1. Alvo para tratamento antifilarial

Esforços para o controle da filariose baseados em quimioterapia antifilarial em massa têm mostrado um sucesso inicial, mas a manutenção desses programas é incerta (PFARR; HOERAUF, 2005). Em relação à eliminação do parasito nematódeo baseada na administração de drogas, são requeridos tratamentos de longa duração. As fêmeas

do verme adulto, que produzem milhares de larvas diariamente, sobrevivem muitos anos; as drogas atuais possuem atividade macrofilaricida muito baixa; estudos mostram alguns casos nos quais tratamentos com DEC ou IVM por mais de 2 anos apresentaram efeitos macrofilaricida (HOERAUF; PFARR, 2007). É essencial, portanto encontrar drogas que matem ou esterilizem o verme adulto. Com o intuito de promover estratégias mais eficazes, estudos para conhecer melhor o verme têm sido realizados.

Há quase 30 anos, em nematódeos filariais foram observadas pela primeira vez bactérias intracelulares estabelecendo com eles uma relação de mutualismo e, recentemente, este endossimbionte foi identificado como pertencente ao gênero *Wolbachia* (PFARR; HOERAUF, 2005). Com base nessa associação, estudos começaram a ser realizados explorando uma possível interdependência entre microorganismo e verme. Tratamentos com tetraciclina e outras drogas anti-riquétsias inibiram a reprodução e o desenvolvimento em filarídeos infectados por *Wolbachia*, suportando a premissa de que a bactéria é necessária para a sobrevivência do nematódeo e parece exibir um importante papel na viabilidade e fertilidade dos filarídeos (HOERAUF; PFARR, 2007; TAYLOR, 2000).

Mand *et al.* (2008) mostram um estudo com um paciente que apresenta hidrocele por 5 anos, 2.040 microfilárias/mL e 65.894 unidades de antígeno (UA). Após tratamento com o antibiótico doxiciclina por seis meses e cirurgia para retirada dos vermes (com embriões degenerados), há uma queda nas UA para 5092 ao 12º mês e 968 ao 24º mês, e o paciente mantém-se amicrofilarêmico sem nenhuma recaída de hidrocele e quando reexaminado por ultrassom nenhum ninho de verme foi encontrado. Devido aos resultados promissores conseguidos com doxiciclina, essa droga tem sido fortemente sugerida no tratamento das filaríoses. Embora não haja ainda clareza na definição do tempo de tratamento para administração em massa, o uso de antibióticos visando à eliminação de *Wolbachia* presente nos vermes tem sido útil no tratamento de pacientes com oncocercose, nos casos em que as microfilárias apresentam resistência à ivermectina (IVM) (HOERAUF; PFARR, 2007). Pesquisas com outros antibióticos como tetraciclina e rifampicina ou com o uso combinado deles contra diferentes vermes filariais como *Onchocerca*, *Wuchereria*, *Brugia*, *Dirofilaria* e *Litomosoides* tem sido realizadas com o intuito de encontrar um tratamento mais

eficiente e com menos efeitos colaterais (HOERAUF *et al.*, 2008; MAND; BUTTNER; HOERAUF, 2008; SLATKO *et al.*, 1999; VOLKMANN *et al.*, 2003).

### 2.3.2. Papel na resposta inflamatória do hospedeiro humano ao verme filarial

Nos últimos anos, a bactéria *Wolbachia* passou a ser incriminada na patogênese das enfermidades filariais. Um grupo de pesquisadores dos Estados Unidos, Alemanha e Inglaterra encontrou evidências de que o principal responsável pela reação inflamatória desenvolvida no olho de indivíduos portadores da oncocercose não é a microfilária em si, mas a bactéria que as filárias carregam (HOERAUF *et al.*, 2003). Essa bactéria possui antígenos (Lipopolissacarídeos - LPS) específicos em sua superfície que produzem uma resposta imune no hospedeiro. Também foi observada a diminuição de reações adversas após o tratamento com drogas anti-filiais em pacientes que foram tratados com doxiciclina semanas antes da administração de IVM/albendazol (HOERAUF; PFARR, 2007). Portanto, o entendimento dos detalhes da interação bactéria-verme pode ajudar a identificar novas estratégias para controle de doenças causadas por nematódeos filariais (FOSTER *et al.*, 2005).

### 2.3.3. Uso de *Wolbachia* no combate aos vetores

A utilização da poderosa capacidade de dispersão de *Wolbachia* tem sido proposta como um mecanismo potencial para induzir e dispersar genes que bloqueiam a transmissão de patógenos em populações naturais de insetos vetores (SINKINS, 2004). Conhecida como paratransgênese, essa técnica introduz no artrópodo vetor a bactéria modificada geneticamente. Para tal abordagem de controle, diversos estudos

têm sido desenvolvidos, entre eles está o manejo da transfecção, manutenção da infecção com o simbionte e capacidade de dispersão dentro da população selvagem.

Apesar de *A. aegypti* não ser naturalmente infectado por *Wolbachia*, pesquisadores produziram infecções artificiais nesta espécie, e obtiveram sucesso com a transfecção da linhagem *wAlb* de *Wolbachia* que infecta naturalmente *A. albopictus*. Os mosquitos *A. aegypti* apresentaram em estudos laboratoriais altas taxas de IC e fixação da infecção apenas na sétima geração (completa IC). Foi possível observar que o número de ovos eclodidos resultante de um cruzamento incompatível (*Intensidade da IC*) foi igual a zero e o número de progênie não infectada produzida por uma fêmea infectada (*Taxa de herança materna*) também foi igual a zero. Porém outros fatores precisam ser melhor estudados, como a interferência das condições ambientais na manutenção da infecção (XI; KHOO; DOBSON, 2005).

Outro mecanismo sugerido é a utilização de linhagens de *W. pipientis* que encurtam o ciclo de vida do inseto (*wMelPop*) ou ainda que competem com outros parasitas como vírus e protozoários contribuindo para diminuir a infestação nos vetores e conseqüentemente bloqueando a transmissão de doenças, porém é preciso ainda estudar se esse último fenômeno é transitório ou permanente (HEDGES *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2009; MOUSSON *et al.*, 2010; XI; KHOO; DOBSON, 2005). A modificação da idade populacional de mosquitos, por exemplo, reduz a transmissão de patógenos sem erradicar a população destes vetores. A bactéria, *wMelPop*, responsável por essa alteração é encontrada naturalmente em *Drosophila melanogaster*. Os mosquitos *A. aegypti* transfectados com *wMelPop* tiveram seu ciclo de vida reduzido pela metade em condições de laboratório (MCMENIMAN *et al.*, 2009). Testes de campo para a liberação de *A. aegypti* infectados com a linhagem *wMelPop* estão programados para este ano (2011) na Austrália, onde a comunidade tem sido consultada sobre o assunto (POPOVICI *et al.*, 2010).

Uma estratégia diferente, mas que já foi usada com sucesso para supressão de insetos utilizando esse endossimbionte é a técnica do inseto incompatível (IIT – sigla em inglês), análoga à técnica do inseto estéril (SIT - sigla em inglês) (CALVITTI *et al.*, 2009). Mesmo antes de descoberto o agente da IC, em 1973 por Yen e Barr (1973), a IC foi usada por Laven em 1967 através de cruzamentos entre diferentes populações de *C. pipiens fatigans* (transmissor da filariose) para erradicação desses vetores em

Okpo, Burma, Mianmar, sudeste asiático (LAVEN, 1967). Baseada na liberação em massa de machos incompatíveis, com uma linhagem de *Wolbachia* não encontrada na população natural, esta técnica tem demonstrado o seu potencial como alternativa à SIT ( CALVITTI *et al.*, 2009; ZABALOU *et al.*, 2004). Embora maiores estudos ainda sejam necessários, os resultados encontrados com transfecção em *A. aegypti*, *A. albopictus* e uma mosca da fruta do mediterrâneo sugerem a utilização de *Wolbachia* na supressão de populações naturais de insetos de importância econômica e em saúde pública (XI *et al.*, 2005; XI; KHOO; DOBSON, 2006; ZABALOU *et al.*, 2004).

A IC tem sido extensivamente investigada em *A. albopictus* e no grupo *Culex pipiens* com o objetivo de fornecer um sistema modelo para dinâmica de *Wolbachia* em mosquitos (SINKINS, 2004). Estudos realizados com o objetivo de analisar a frequência de infecção em populações de mosquitos, como *A. albopictus*, em regiões endêmicas da transmissão da dengue, mostraram que a bactéria *Wolbachia* é o melhor candidato para uso em experimentos de controle genético de mosquitos (KITAYAPONG; BAIMAI; O'NEILL, 2002).

#### **2.4. Diversidade genética em *Wolbachia***

A bactéria *Wolbachia* apresenta um genoma pequeno (1,08 – 1,5 Mb) de acordo com a tendência reductiva de modo de vida intracelular. Mas apesar de estar de acordo com essa propensão da ordem *Rickettsiales* de adaptação ao hospedeiro, faltam-lhe elementos de um genoma mínimo típico, ou seja, elementos comuns que conferem estabilidade e são encontrados em outros endossimbiontes obrigatórios. Diferente da maioria das *Rickettsiales*, o genoma de *Wolbachia* contém grande número de elementos móveis e repetitivos (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

As linhagens de *Wolbachia* que infectam artrópodos e nematódeos, e que produzem diferentes fenótipos nos seus hospedeiros, também apresentam peculiaridades quando comparadas geneticamente. Confrontando dois dos quatro genomas completos de *Wolbachia* que estão disponíveis, linhagens wMel, encontrada

em *Drosophila melanogaster* e *wBm*, na filária *Brugia malayi*, foi observado que a primeira contém um número alto de elementos genéticos móveis e repetitivos, e apresentam partículas tipo vírus. Ao passo que, no genoma de *Wolbachia* de nematódeos, os elementos repetitivos são encontrados em menor número e não há sequências de fagos (WERREN; BALDO; CLARK, 2008).

A análise da diversidade de *Wolbachia* tem enfrentado barreiras no que se refere à confusa classificação deste organismo, que é encontrado em um vasto número de insetos que por sua vez podem estar infectados com mais de uma linhagem. Além disso, existe extensiva recombinação em *Wolbachia*, que afeta várias regiões do genoma, incluindo proteínas de superfície, genes de prófagos e regiões intergênicas (BALDO; LO; WERREN, 2005). Até os genes constitutivos (*housekeeping*) são alvos de eventos de recombinação (BALDO; DUNNING HOTOPP *et al.*, 2006). Toda essa variação tem desafiado os métodos filogenéticos tradicionais para caracterização de linhagens. Como alternativa às técnicas filogenéticas usuais, sistemas que propõem a análise de vários *loci* gênicos têm sido propostos.

Estudos experimentais e teóricos têm mostrado que a recombinação é a maior força que pode acelerar a diversidade genética e funcional e possibilitar a adaptação bacteriana (WERREN; BALDO; CLARK, 2008). Toda essa riqueza e dinâmica de informação fazem de *Wolbachia* um organismo fascinante para ser estudado. A recombinação em *W. pipientis*, apesar de provocar confusões nas análises filogenéticas, possibilita a utilização da bactéria como ferramenta para manipulação genética de populações de insetos, permitindo a introdução de genes de características desejáveis dentro de *W. pipientis* (JIGGINS *et al.*, 2001; WERREN; BARTOS, 2001).

A maioria dos insetos abriga um dos dois clados (ou supergrupos) de *W. pipientis*, A ou B, que ocorrem exclusivamente em artrópodos (LO *et al.*, 2002; BALDO; BORDENSTEIN *et al.*, 2006; PANARAM; MARSHALL, 2007; WERREN; BALDO; CLARK, 2008). Porém múltiplas infecções têm sido comumente encontradas em algumas espécies, como *Aedes albopictus* (SINKINS, 2004). Chamada de superinfecção, a infecção por duas ou mais linhagens propicia ainda um ambiente para que trocas genéticas ocorram entre os supergrupos aumentando a sua diversidade (JIGGINS *et al.*, 2001; WERREN; ZHANG; GUO, 1995). Embora estudos anteriores indiquem que os eventos de recombinação são características comuns para a evolução de *Wolbachia*, nada é conhecido sobre qual a taxa de co-infecção necessária para que

haja recombinação e nem quais os mecanismos envolvidos (BALDO; LO; WERREN, 2005; JIGGINS *et al.*, 2001; JIGGINS, 2002; WERREN; WINDSOR; GUO, 1995; WERREN; BARTOS, 2001).

Entre as proteínas microbianas que evoluem mais rápido estão as proteínas externas de membrana, que são altamente variáveis. Apesar da grande diversidade de composição e função dessas moléculas, elas compartilham características genéticas e estruturais que permitem sua classificação como proteínas de superfície. Em *Wolbachia*, a WSP, sigla em inglês para proteína de superfície de *Wolbachia*, possui função desconhecida apesar de várias linhas de estudo sugerirem que estas proteínas podem ser um importante mediador na interação parasito-vetor. Além disso, a WSP possui homologia com proteínas de bactérias patogênicas e recentemente mostrou produzir resposta imunológica em hospedeiros vertebrados infectados com nematódeos filariais que abrigam *Wolbachia* (WERREN; BALDO; CLARK, 2008). A WSP mostra rápido *turnover* da sequência de aminoácidos tanto por altas taxas de recombinação como por seleção positiva típica de antígenos sob forte pressão de seleção diversificadora (BALDO *et al.*, 2010). O gene *wsp*, cópia única, codifica para a maior proteína de superfície de *Wolbachia* (BRAIG *et al.*, 1998) e é considerado um gene que evolui rápido (ZHOU; ROUSSET; O'NEIL, 1998). Com cerca de 40% de diversidade nucleotídica, esse gene possui quatro regiões hipervariáveis separadas por regiões conservadas (BALDO; LO; WERREN, 2005). Por meio de estudos utilizando os programas Clustal-X (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), PHILIP (FELSENSTEIN, 1995) e PAUP3.1 (SWOFFORD, 1993), a análise de sequências de *wsp* revelou que a divergência máxima entre linhagens de *Wolbachia*, que infectam diferentes *taxa* de insetos, é de 16% nas bactérias do supergrupo A, 23% no B e 23% entre A e B (VAN MEER; WITTEVELDT; STOUTHAMER, 1999; ZHOU; ROUSSET; O'NEIL, 1998).

Com menor extensão que o gene *wsp*, em *Wolbachia* a recombinação também tem sido documentada para a proteína de divisão celular FTSZ (codificada por um gene cópia única, *ftsZ*), exceção entre os genes *housekeeping*. Porém ainda não está claro com que frequência e dimensão isso ocorre (BALDO; DUNNING HOTOPP *et al.*, 2006). Nos estudos de Werren *et al.* (1995) a divergência de nucleotídeos encontrada entre os supergrupos A e B foi de 3%, 6% e 15% para a linhagem A, B, e entre A e B, respectivamente. Evidências de recombinação nos genes *ftsZ* e *wsp*

mostram altos níveis de fluxo gênico entre linhagens de *Wolbachia* (BALDO; BORDENSTEIN *et al.*, 2006).

Com relação aos vermes filariais e seus simbiossiontes, o trabalho de Bazzocchi *et al.* (2000) mostrou que o nível de diversidade genética apresentado pelos genes *wsp* é baixo quando comparado com a diversidade de *Wolbachia* encontrada em artrópodos. Nesse estudo foram observadas oito diferentes espécies de nematódeos filariais, e de fato, enquanto que, em *Wolbachia* de artrópodos as sequências de *wsp* são mais variáveis que as de *ftsZ*, em nematódeos filariais é observado maior variação em *ftsZ* do que em *wsp*.

Apesar da diversidade dos genes *ftsZ* e *wsp* ser descrita em diferentes estudos, poucos contemplam análises populacionais. No presente trabalho, a diversidade de *W. pipientis* foi estudada através da análise desses genes nos mosquitos *C. quinquefasciatus* e *A. albopictus* e no verme filarial *W. bancrofti*. Além disso, a prevalência do endossimbionte nas populações de mosquito e a densidade da bactéria em vetores sob condições adversas também foi observada.

### **3. JUSTIFICATIVA**

---

---

### 3 JUSTIFICATIVA

Devido às dificuldades encontradas nos programas de controle de vetores, faz-se necessário a busca por medidas mais eficazes. Com isso, tem sido proposto como alternativa, a utilização de *Wolbachia* como potencial mecanismo para modificar populações de insetos vetores, tornando-os incapazes de transmitir doenças. Sendo assim, tanto o *status* infeccioso quanto a diversidade de linhagens encontradas em populações naturais de insetos são informações importantes para futuras intervenções. Considerando que os dados sobre prevalência de infecção e diversidade de *W. pipientis* em populações de mosquitos vetores no Brasil e na América do Sul são escassos, neste trabalho analisamos a diversidade de dois genes (*ftsZ* e *wsp*) desse endossimbionte em populações de campo de *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus*.

Baseado na relação de mutualismo obrigatório entre o endossimbionte *Wolbachia* e os nematódeos filariais, sugere-se que esta bactéria seja importante tanto como alvo para novas estratégias quimioterápicas, como na causa da doença, sendo assim, faz-se necessário conhecer as diferentes linhagens da bactéria encontrada no verme para a elaboração de um tratamento mais eficaz.

## **4. PERGUNTA CONDUTORA**

---

---

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Quais linhagens de *Wolbachia* estão presentes nos culicídeos e filarídeos coletados na região metropolitana do Recife?

## **5. OBJETIVOS**

---

---

## 5 OBJETIVOS

### 5.2. Geral

Descrever as diferentes linhagens de *Wolbachia* presentes nos culicídeos e filarídeos coletados na região metropolitana do Recife.

### 5.3. Específicos

- a. Determinar a diversidade genética das diferentes linhagens de *Wolbachia* presentes em mosquitos e filárias;
- b. Determinar o percentual de infecção dos culicídeos *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* coletados em diferentes áreas da região metropolitana do Recife;
- c. Quantificar a densidade de *Wolbachia* presentes em diferentes populações de *Culex quinquefasciatus*;
- d. Avaliar entre os genes *ftsZ* e *wsp*, de *Wolbachia* os mais importantes para estudos populacionais;

## **6. PROCEDIMIENTOS METODOLÓGICOS**

---

---

## 6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 6.1. Divisão do estudo

- a. **Primeira parte:** *Aedes albopictus* – detecção da prevalência e diversidade de *Wolbachia* para os genes *ftsZ* e *wsp*.
- b. **Segunda parte:** *Culex quinquefasciatus* - detecção da prevalência, diversidade de *Wolbachia* para os genes *ftsZ* e *wsp* e densidade de *Wolbachia* em mosquitos susceptíveis *versus* resistentes a inseticidas.
- c. **Terceira parte:** *Wuchereria bancrofti* - detecção da diversidade de *Wolbachia* para os genes *ftsZ* e *wsp*.

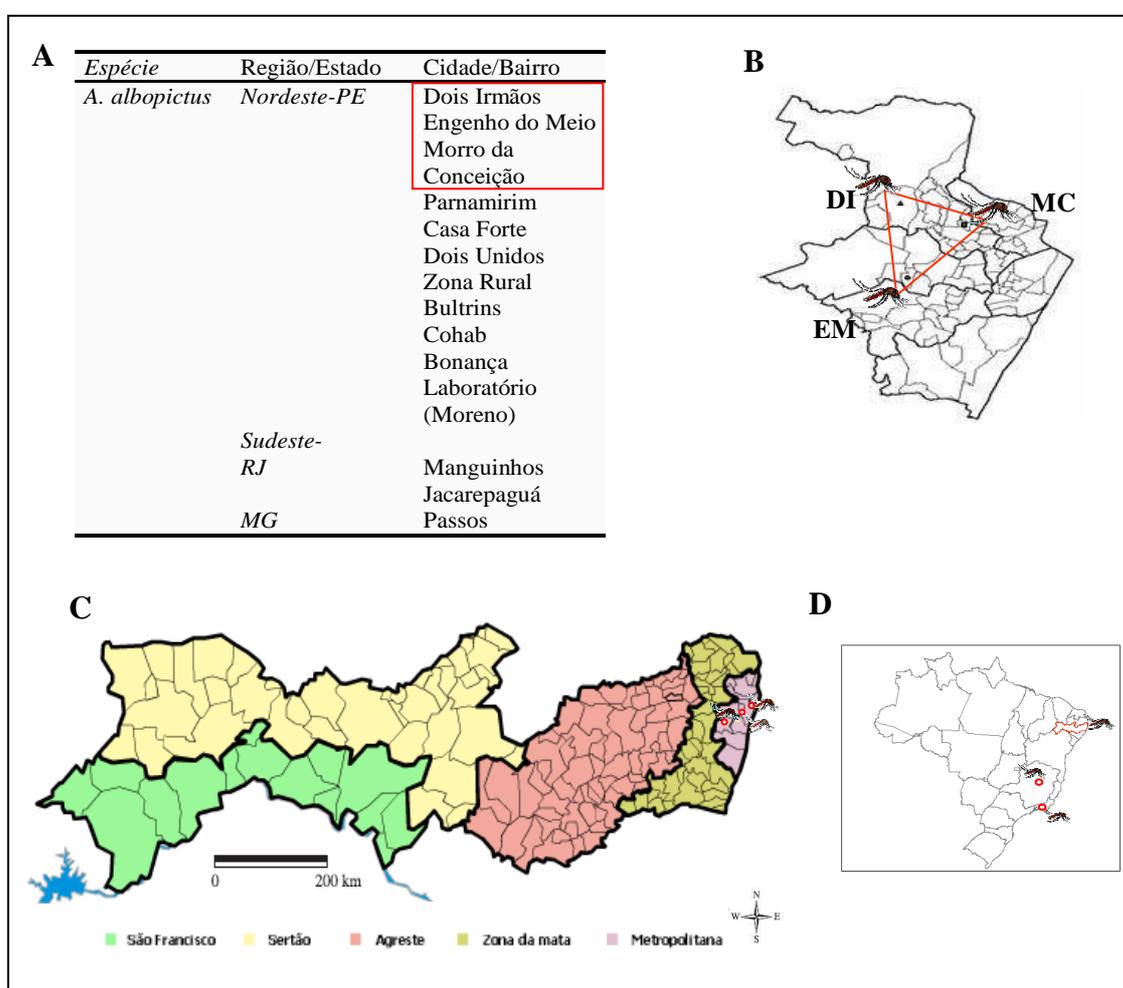
### 6.2. Detecção da prevalência e diversidade de *Wolbachia* para os genes *ftsZ* e *wsp* em *Aedes albopictus*

#### 6.2.1. Amostras de mosquitos

Para analisar a prevalência de *W. pipiens* em *A. albopictus*, 150 mosquitos oriundos de três bairros (Dois Irmãos-DI, Engenho do Meio - EM e Morro da Conceição-MC) do Recife-PE, Brasil, foram analisados (figura 6). Esses mosquitos foram obtidos de ovos coletados através de ovitrampas como descrito em Regis *et al.* (2008). As larvas eclodiram e foram mantidas até a fase adulta no insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) sob condições padrão (temperatura 26°C ± 2°C; umidade relativa 60%-80%; 12/12h Claro/Escuro). Os adultos foram divididos por sexo e o DNA total foi extraído de cada indivíduo separadamente seguindo o protocolo de precipitação de DNA com álcool isopropílico descrito por Ayres *et al.* (2002).

Para a investigação sobre diversidade, 20 indivíduos de cada um dos bairros já citados foram analisados. Amostras do banco de DNA total extraído de mosquitos do

Departamento de Entomologia foram também usadas: quatro indivíduos de outros bairros do Recife (Parnamirim - PN, Casa Forte - CF e Dois Unidos - DU) e oito de municípios do estado de PE (Zona Rural-ZR e Bultrins – BT do município de Olinda; e Cohab - CO e Bonança – BO do município de Moreno), além de uma linhagem de laboratório representativa do município de Moreno - LAB. Com o intuito de identificar se diferentes populações de *A. albopictus* albergam linhagens distintas de *Wolbachia*, indivíduos de outras localidades do Brasil (também do banco de DNA de mosquitos) foram incluídos nas análises: dois indivíduos do estado do Rio de Janeiro, do bairro de Manguinhos - RJM e Jacarepaguá - RJJ e um de Minas Gerais, Passos - MGP.



**Figura 6. Diagrama esquemático das áreas de coleta de *A. albopictus*.**

**Fonte:** Dados próprios e mapas adaptados de Recife (2005) e Pernambuco (2011).

**Nota:** (A) Locais de coleta, o quadro vermelho destaca as amostras usadas na detecção da prevalência de *Wolbachia*, as demais foram utilizadas no estudo de diversidade genética. (B) Cidade do Recife – destaque para os pontos DI, EM e MC. (C) Estado de Pernambuco – os pontos mostram as cidades de Olinda, Recife e Moreno. (D) Por último, no mapa do Brasil é possível observar o estado de Pernambuco em vermelho e os estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais também sinalizados como pontos de coleta para o estudo de diversidade genética.

## 6.2.2. Diagnóstico de infecção por *W. pipientis* em *A. albopictus*

### 6.2.2.1. PCR

Para detecção de *W. pipientis*, as 150 amostras de *A. albopictus* provenientes do Recife foram submetidas a PCR com *primers* que amplificam um fragmento de 432 pb do gene *ftsZ* (*W. pipientis* supergrupo-específico), descritos por Baldo *et al.* (2006), ver quadro 1.

Na PCR convencional, a reação foi realizada em um volume final de 40 µl contendo 22,6 µl de água livre de DNA, 4 µl de 10x PCR buffer (Promega), 2,4 µl de 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0,8 µl de 10 mM de dNTP mix (Invitrogen), 4 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/ µl), 0,2 µl de Taq DNA polymerase (5 U/ µl) (Promega) e 2 µl da amostra de DNA. As condições de amplificação incluíram um período inicial de desnaturação (94°C/2 min.), seguido por 37 ciclos de desnaturação (94°C/30 s), anelamento (55°C para o *ftsZA* e 59°C para o *ftsZB* por 45 s) e extensão (72°C/1 min. e 30 s), e uma síntese terminal (72°C/10 min.). Como controle positivo, DNA de mosquito previamente diagnosticado com os dois supergrupos A e B de *W. pipientis*, foi utilizado. No controle negativo não foi adicionado DNA à reação.

Amostras diagnosticadas como negativas para *W. pipientis*, foram submetidas a uma segunda PCR com *primers* que amplificam uma região de 122 pb do gene ribossomal *rpL8* (LAN; FALLON, 1992), ver tabela 1, servindo como controle endógeno da qualidade do DNA extraído. A reação foi realizada em um volume final de 12,5 µl contendo 6,5 µl de PCR Mix (Promega), 4,0 µl água livre de DNA e 0,5 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/ µl) e 1 µl da amostra de DNA. As condições de amplificação incluíram um período inicial de desnaturação (94°C/2 min.), seguido por 35 ciclos de desnaturação (94°C/ 1 min.), anelamento (55°C/1 min.) e extensão (72°C/1 min), e uma síntese terminal (72°C/5 min.). Nesse caso as amostras que permaneceram negativas foram excluídas da análise.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
<i>ftsZ A</i> <sup>1</sup>	<i>ftsZ</i> _AspecF1	AAA GAT AGT CAT ATG CTT TTC
	<i>ftsZ</i> _AspecR1	CAT CGC TTT GCC CAT CTC G
<i>ftsZ B</i> <sup>1</sup>	<i>ftsZ</i> _BspecF1	AAA GAT AGC CAT ATG CTC TTT
	<i>ftsZ</i> _BspecR1	CAT TGC TTT ACC CAT CTC A
<i>rpl8</i> <sup>2</sup>	RPL8f	CCTT ACA AGT TCA ACG TCC GC
	RPL8r	CAG CAA CAA TTC CGA CCA TGG
<i>wsp A</i> <sup>3</sup>	136F	TGA AAT TTT ACC TCT TTT C
	691R <sup>4</sup>	AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA
<i>wsp B</i> <sup>3</sup>	81F <sup>4</sup>	TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC
	522R	ACC AGC TTT TGC TTG ATA

**Quadro 1.** Sequências de *primers* utilizados no diagnóstico de infecção de mosquitos por *Wolbachia* e na detecção da diversidade genética.

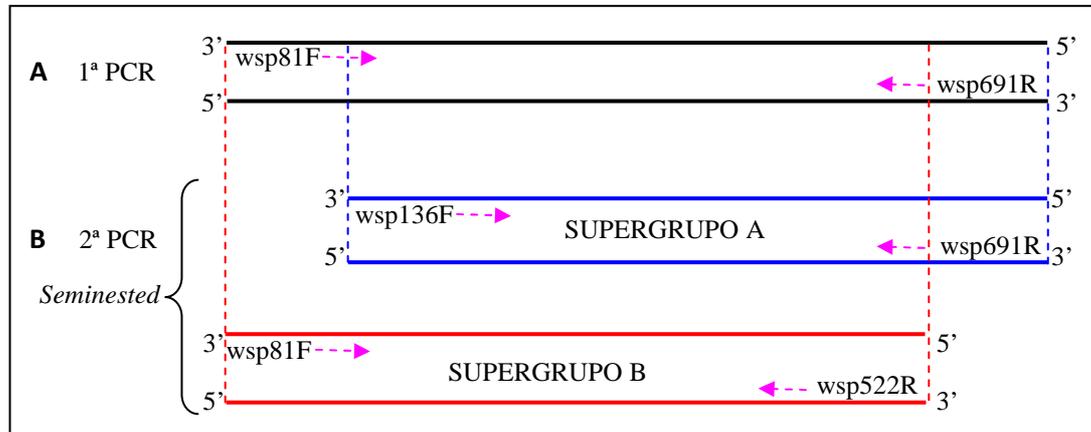
**Fonte:** Baldo *et al.* (2006); (LAN; FALLON, 1992) e Zhou *et al.* (1998).

**Nota:** 1. Baldo *et al.* (2006); 2. (LAN; FALLON, 1992); 3. Zhou *et al.* (1998); 4. O conjunto de *primers* 81F+691R é usado para amplificar tanto o gene *wsp* do supergrupo A, quanto o B.

#### 6.2.2.2. PCR *Seminested*

Com o objetivo de confirmar a ausência de *Wolbachia* nas amostras negativas, os indivíduos negativos (exceto os *rpl8* negativos) e os infectados por apenas uma linhagem de *Wolbachia* foram investigados através de uma segunda PCR com maior sensibilidade, a PCR *seminested* (figura 7). Os *primers Wolbachia*-específico *wsp81F* e *wsp691R* (618-632 pb) foram utilizados na primeira PCR, cujo volume final foi 12,5 µl contendo 6,5 µl de PCR Mix (Promega), 4,5 µl água livre de DNA e 0,25 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/ µl) e 1 µl da amostra de DNA. Dessa reação, 0,5µl foi usado na segunda PCR (*seminested*) com as mesmas condições da primeira exceto pelos primers, 1,0 µl (10 pmol/ µl) de cada oligonucleotídeo, *wsp136F* e *wsp691R* (577 pb) para detecção do supergrupo A, e *wsp81F* e *wsp522R* (449 pb) para o supergrupo B. Esses *primers* foram propostos por Zhou *et al.* (1998) para discriminar os supergrupos A e B. As condições de amplificação incluíram um período inicial de desnaturação (94°C/2 min.), seguido por 35 ciclos de desnaturação (94°C/1 min.), anelamento (50°C para o *wspA* e 55°C para o *wspB* por 1 min.) e extensão (72°C/1 min.), e uma síntese terminal (72°C/5 min.).

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se fragmentos  $\lambda$  DNA/*Hind* III (Invitrogen) como padrão de peso molecular. Após a eletroforese em gel de agarose, as bandas resultantes foram observadas sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio (10 mg/ml).



**Figura 7. Diagrama esquemático da PCR *Seminested* em *A. albopictus*.**

**Fonte:** Elaboração própria a partir dos dados sobre os *primers* fornecidos por Zhou *et al.* (1998).

**Nota:** (A) Primeira PCR com primers que amplificam o gene *wsp* de ambos os supergrupos, A e B. (B) Segunda PCR, a *seminested*, duas reações são feitas separadamente uma para o supergrupo A e outra para o B.

### 6.2.3. Análise estatística

Para a análise comparativa da infecção por *Wolbachia* entre as populações de mosquito foi aplicado o teste qui-quadrado de proporções e quando necessário o teste exato de Fisher. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2000 e o R v2.10.0. (ZAR, 1996).

### 6.2.4. Identificação da diversidade de *W. pipientis* em *A. albopictus*

Os mosquitos usados na análise da diversidade genética de *W. pipientis* foram previamente diagnosticados infectados com ambas as linhagens de *W. pipientis* (A e

B). A diversidade genética nesses organismos foi avaliada pelo sequenciamento dos fragmentos dos genes *ftsZ* e *wsp* obtidos a partir das PCRs descritas acima. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento na plataforma tecnológica do CPqAM, NPT. Em seguida, a análise computacional das sequências produzidas foi feita utilizando os programas: CodonCode Aligner version 3.6.1 (para a formação dos *contigs* e eliminação das sequências com baixa qualidade) e o programa BioEdit/Clustal W para o alinhamento múltiplo e ajuste manual. A identidade das sequências foi confirmada através do BLAST.

### **6.3. Detecção da prevalência e diversidade de *Wolbachia* para os genes *ftsZ* e *wsp* em *Culex quinquefasciatus*, e identificação da densidade de *Wolbachia* em populações resistente versus susceptível**

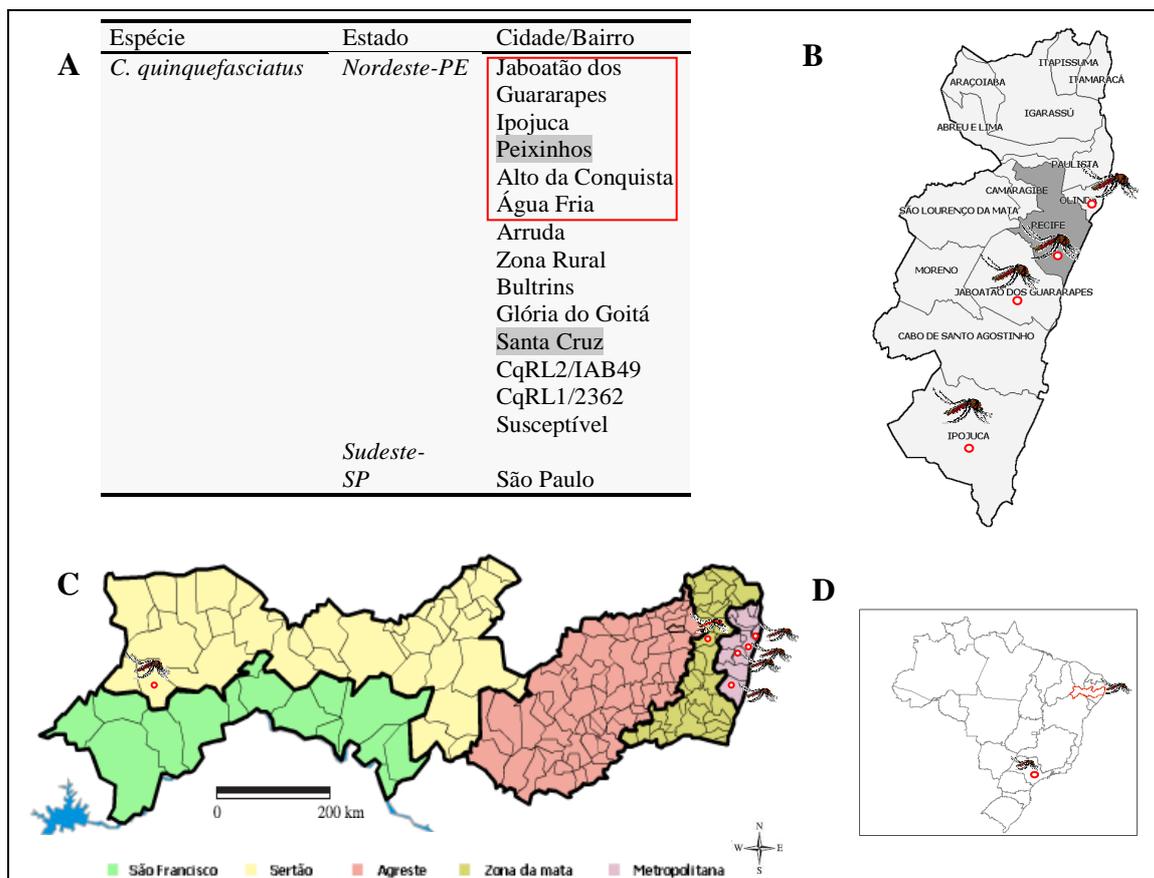
#### **6.3.1. Amostras de mosquito**

Para o estudo de prevalência em *C. quinquefasciatus* foram analisados 250 indivíduos provenientes de quatro municípios da Região Metropolitana do Recife, Jaboatão dos Guararapes - JB, Recife (Alto da Conquista - AC e Água Fria - AF), Olinda (Peixinhos - PX) e Ipojuca – IP (figura 8). Ovos de *C. quinquefasciatus* foram coletados em criadouros naturais ou no intradomicílio através das armadilhas de oviposição (ovitrampas) BR-OVT (BARBOSA *et al.*, 2007). A partir dos ovos (em jangadas) de mosquitos eclodiram as larvas que foram mantidas até a fase adulta em colônias de laboratório no insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) até processamento. Adultos com cinco dias de emergido foram separados por sexo e o DNA total foi extraído individualmente seguindo o protocolo mencionado e descrito por Ayres *et al.* (2002).

Ao passo que, para o estudo sobre diversidade foram investigados 50 indivíduos no total, oriundos de cada um dos pontos citados acima, sendo 10 de cada população (5 machos e 5 fêmeas). Além disso, foram incluídas nessa análise 20

amostras do banco de DNA de mosquitos do Departamento de Entomologia de diferentes bairros da região metropolitana do Recife (Recife, três do Arruda – AR e três de Água Fria – AF; Olinda, quatro da Zona Rural – ZR e cinco de Bultrins - BT), da zona da mata (um de Glória do Goitá - GG), do sertão do estado de Pernambuco (um de Santa Cruz do Capibaribe - SC) e também na região sudeste do Brasil (um de São Paulo - SP). Por último, mais duas linhagens de *C. quinquefasciatus* de laboratório resistentes a *Bacillus sphaericus*, CqRL1/2362 e CqRL2/IAB49.

Em relação à quantificação de *Wolbachia* em mosquitos susceptíveis *versus* resistentes a inseticidas organofosforados foram utilizadas duas populações: Peixinhos, como referência de susceptibilidade, já mencionada no estudo de prevalência e outra resistente, da cidade de Santa Cruz, ambas diagnosticadas por bioensaio químico e ensaio bioquímico (dados não mostrados). Foram analisados 36 indivíduos de cada população, sendo 18 machos e 18 fêmeas. O processamento das amostras de Santa Cruz seguiu as etapas de coleta e extração de DNA citadas acima.



**Figura 8. Diagrama esquemático das áreas de coleta de *A. albopictus*.**

**Fonte:** Dados próprios e mapas adaptados de Observatório IPPUR/UFRJ-FASE (2002) e Pernambuco (2011).

**Nota:** (A) Locais de coleta, o quadro vermelho destaca as amostras usadas na detecção da prevalência de *Wolbachia*, as áreas sombreadas correspondem às amostras usadas no estudo de densidade, as demais foram utilizadas no estudo de diversidade genética. (B) Região Metropolitana do Recife – os pontos vermelhos destacam os municípios contemplados dentro da RMR no estudo de prevalência. (C) No Estado de Pernambuco – os pontos vermelhos mostram as cidades de Olinda, Recife, Jaboatão dos Guararapes, Ipojuca, Glória do Goitá e Santa Cruz do Capibaribe. (D) Por último, no mapa do Brasil é possível observar o estado de Pernambuco em vermelho e o estado de São Paulo também está marcado como ponto de coleta.

### 6.3.2. Diagnóstico de infecção por *W. pipientis* em *C. quinquefasciatus*

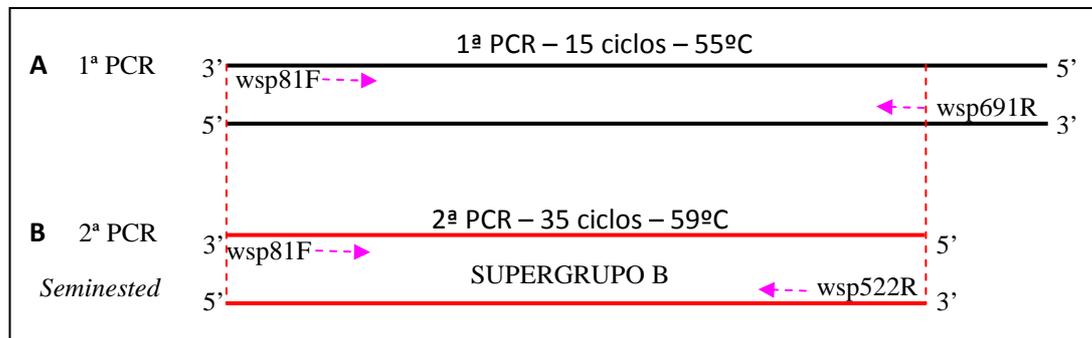
#### 6.3.2.1. PCR

A detecção do endossimbionte em *C. quinquefasciatus* seguiu os mesmos procedimentos usados no diagnóstico em *A. albopictus* descritos no item 5.2.2.1. Com exceção de que foi usado apenas o conjunto de *primers ftsZB* (tab. 1) senso e antissenso (392 pb) pois esses mosquitos são infectados apenas pelo supergrupo B como descrito na literatura (KLASSON *et al.*, 2008).

#### 6.3.2.2. PCR *Seminested* em tubo único

A investigação dos indivíduos negativos sofreu algumas adequações em relação à técnica usada em *A. albopictus* em virtude de só um supergrupo infectar essa espécie. Nesta abordagem metodológica as duas reações de PCR que compõem a *seminested* foram realizadas em um único tubo (figura 9). A primeira reação embora com as mesmas concentrações de reagentes já citados para *A. albopictus* foi submetida apenas a 15 ciclos dos 35 utilizados na PCR convencional, com a temperatura de anelamento de 55°C já citada para o conjunto de primers *wsp81F* e *wsp691R* (tabela 1). Após esse período os tubos foram abertos e a eles adicionado 1 µl de cada um dos primers *wsp81F* e *wsp522R* (452 pb). Na segunda reação da PCR-*seminested* um novo ciclo de 35 amplificações foi iniciado. Desta vez a temperatura de anelamento foi

elevada para 59°C para dificultar a ação do primeiro conjunto de oligonucleotídeos adicionado.



**Figura 9. Diagrama esquemático da PCR *Seminested* em tubo único em *C. quinquefasciatus*.**

**Fonte:** Elaboração própria a partir dos dados sobre os *primers* fornecidos por Zhou *et al.* (1998).

**Nota:** (A) Primeira PCR de 15 ciclos com primers que amplificam o gene *wsp* de ambos supergrupos, A e B. (B) Segunda PCR, a *seminested*, a reação de 35 ciclos é feita no mesmo tubo, ao qual é adicionado o segundo conjunto de oligonucleotídeos para amplificar o gene do supergrupo B.

### 6.3.3. Análise estatística

Para a análise comparativa da infecção por *Wolbachia* entre as populações de mosquito foi aplicado o teste qui-quadrado de proporções e quando necessário o teste exato de Fisher. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Excel 2000 e o R v2.10.0. (ZAR, 1996).

### 6.3.4. Identificação da diversidade de *W. pipientis* em *C. quinquefasciatus*

A diversidade genética nesses organismos foi avaliada utilizando-se fragmentos dos genes *ftsZ* e *wsp* obtidos via PCR usando-se os *primers* descritos acima para o supergrupo B, exceto que para o gene *wsp* foram usados os primers *wsp81F* e

*wsp691R*. As demais etapas seguiram os mesmos procedimentos descritos nos itens 5.3.2.1-5.3.3.

### 6.3.5. Quantificação de *Wolbachia* por PCR quantitativo (qPCR) em tempo real em populações de mosquito susceptível *versus* resistentes

A densidade de *Wolbachia* em mosquitos de duas populações de *C. quinquefasciatus*, uma susceptível e outra resistente a organofosforados foi observada através da qPCR. As reações foram realizadas num aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, California, USA) e foram usadas para estimar o número de *Wolbachia* em cada mosquito. Foram feitas duas PCRs para todos os mosquitos: uma foi específica para o locus de *Culex Ace-2*, o qual não está envolvido na resistência ao inseticida (WEILL *et al.*, 2000), e o outro foi específico para o locus *wsp* de *Wolbachia* (Braig *et al.*, 1998). Os *primers* usados para amplificar um fragmento do gene *wsp* foram descritos por Berticat *et al.* (2002) e amplificam um fragmento de 151 pb e para *ace2* foram descritos por Weill *et al.* (2000) e produzem um fragmento de 208 pb.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
<i>Ace-2</i>	Acequantidir	GCAGCACCCAGTCCAAGG
	Acequantirev	CTTCACGGCCGTTCAAGTAG
<i>wsp</i>	wolpipdir	AGAATTGACGGCATTGAATA
	wolpiprev	CGTCGTTTTTGTGTTAGTTGTG

**Quadro 2.** Sequências de *primers* utilizados no qPCR para detecção da densidade relativa de *Wolbachia* por *C. quinquefasciatus*.

**Fonte:** Berticat *et al.* (2002) e Weill *et al.* (2000).

Todos os mosquitos foram analisados em duplicata para a quantificação de *wsp* e *Ace-2*, além do controle negativo (sem DNA molde) e da curva padrão. Considerando que, os genes estão presentes em cópia única por genoma haplóide do hospedeiro e do simbionte, a razão entre as concentrações de *wsp* e *ace-2* forneceram o número relativo de genomas de *Wolbachia* por genomas de *Culex*, corrigindo dessa forma erros provenientes das diferenças entre o tamanho dos mosquitos. A

concentração do DNA total de todos os 36 indivíduos de cada população, susceptível e resistente, 18 machos e 18 fêmeas, foi normalizada para 200 pg/ µl por reação nos ensaios em placas de 96 poços.

Para produzir as curvas padrão de diluição para a quantificação dos genes *wsp* e *ace2* foram seguidas as seguintes etapas: 1- amplificação dos fragmentos dos genes por PCR com as mesmas condições usadas para o gene *rpl8* no item 5.2.2.1, exceto pela temperatura de anelamento de 65°C para *ace2* e já para *wsp* foram mantidos os 55°C; 2- purificação dos produtos de PCR com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante; 3- clonagem do fragmento amplificado por PCR no vetor pJET1.2, usando-se o kit *CloneJET™ PCR Cloning Kit* (Fermentas) de acordo com as recomendações do fabricante e células quimicamente competentes *One Shot® TOP10* (Invitrogen); 5- checagem por PCR (condições citadas) dos amplicons para confirmar a presença do inserto; 6- O DNA plasmidial (vetor + inserto) foi purificado utilizando o kit *QIAprep® Spin Miniprep* (QIAGEN), conforme o protocolo descrito no kit; 6- Por último, a concentração do amplicon foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (nanodrop) e cinco diluições seriadas de 10<sup>-15</sup> a 10<sup>-19</sup> para pJET*ace2* e de 10<sup>-16</sup> a 10<sup>-24</sup> para pJET*wsp* foram preparadas. Para a quantificação absoluta, o cálculo do número de cópias por concentração de plasmídeo + inserto foi feito utilizando a seguinte fórmula:

$$\boxed{\text{N}^\circ \text{ de cópias de DNA} = [\text{massa (g/}\mu\text{l)/n (pb) x 660}] \times 6,023\text{e}23}$$

A reação foi realizada em um volume final de 20 µl contendo 3 µl de água livre de DNA, 10 µl de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem), 1 µl (10 pmol/µl) de cada oligonucleotídeo iniciador e 5 µl da amostra de DNA. As condições de amplificação incluíram um período inicial de 94°C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos de 94°C por 15 segundos e 65°C por 1 minuto para o gene *Ace2* e 55 °C para o *wsp*. A análise e interpretação dos resultados foram feitas utilizando o software *ABI PRISM* (versão 2.0.4.).

#### 6.4. Detecção da diversidade de *Wolbachia* para os genes *ftsZ* e *wsp* em *Wuchereria bancrofti*

##### 6.4.1. Amostra de Filarídeos

Os nematódeos filariais (*Wuchereria bancrofti*) foram obtidos sob a forma de “pools” de microfilárias através da filtração do sangue de pacientes infectados. Foram coletadas amostras de sangue de pacientes do Recife, Olinda e Jaboatão com diferentes níveis de endemicidade, em colaboração com os projetos de pesquisa desenvolvidos pelo pesquisador Dr. Abraham Rocha do Serviço de Referência Nacional em Filariose (SRNF) que entre outras atividades realiza a quantificação de microfilárias nos indivíduos.

No total foram avaliados em torno de 20 amostras de pacientes de cada cidade, adultos ou menores de idade, sendo este último com idade superior a 10 anos, com o consentimento do próprio indivíduo e do representante legal.

Os indivíduos positivos para bancroftose já foram previamente cadastrados e identificados na RMR através de estudos realizados em parceria entre os municípios envolvidos no estudo e o CPqAM. Todos os indivíduos habitam em áreas que serão submetidas ao tratamento em massa com a droga dietilcarbamazina. Aos indivíduos identificados como positivos foi repassado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e estes foram convidados para participar do trabalho doando o restante do sangue, 4 ml, coletado para a quantificação, para serem usados neste projeto. Após o consentimento, através da punção venosa, utilizando seringas e agulhas descartáveis, foram obtidos 5 ml de amostra de sangue venoso de cada participante do estudo, dos quais 1 ml foi utilizado pelo SRNF para quantificação e 4 ml foram filtrados e apenas as microfilárias foram coletadas para estudo e o sangue filtrado foi descartado. O sangue foi coletado no horário noturno entre 23 horas e 1 hora, respeitando-se a periodicidade noturna da *W. bancrofti*. O sangue coletado foi filtrado em membrana de policarbonato (Nucleopore Corporation, Pleasanton, CA, USA) com poros de 3µ de diâmetro e as membranas foram armazenadas em microtubos no freezer a -70° C até serem processadas. O DNA foi extraído diretamente das membranas com os pools de microfilárias grudados seguindo o protocolo descrito por Ayres *et al.* 2002. Todos

os testes foram realizados no CPqAM nos Departamentos de Parasitologia (filtração) e Entomologia (extração de DNA).

#### 6.4.2. Identificação da diversidade de *W. pipientis* em *Wuchereria bancrofti*

A diversidade genética nesses organismos foi avaliada utilizando-se fragmentos dos genes *ftsZ* e *wsp* obtidos através da PCR com os *primers* *ftsZ\_F1'* e *ftsZ\_R1'* e *WSPintF'* e *WSPintR'*, respectivamente (tabela 2). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µl contendo 13 µl de PCR Mix (Promega), 9,0 µl água livre de DNA e 1,0 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/ µl) e 1 µl da amostra de DNA. As condições de amplificação incluíram um período inicial de desnaturação (94°C/2 min.), seguido por 35 ciclos de desnaturação (94°C/ 1 min.), anelamento (55°C/1 min.) e extensão (72°C/1 min), e uma síntese terminal (72°C/5 min.). Os produtos de PCR foram purificados com o *kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento bidirecional. Em seguida, a análise computacional das sequências produzidas foi feita utilizando os programas: CodonCode Aligner version 3.6.1 (para a formação dos *contigs* e eliminação das sequências com baixa qualidade) e o programa BioEdit/Clustal W para o alinhamento múltiplo e ajuste manual. A identidade das sequências foi confirmada através do BLAST.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
<i>ftsZ</i> <b>D</b> <sup>1</sup>	<i>ftsZ</i> _F1 <sup>1</sup>	ATYATGGARCATATAAAARGATAG
	<i>ftsZ</i> _F1'	ATTATGGAGCATATAAAAGATAG
	<i>ftsZ</i> _R1 <sup>1</sup>	TCRAGYAATGGATTRGATAT
	<i>ftsZ</i> _R1'	TCAAGCAATGGATTAGATAT
<i>wsp</i> <b>D</b> <sup>2</sup>	WSPintF <sup>2</sup>	TAG(CT)TACTACATTCGCTTGCA
	WSPintF'	TAGTTACTACATTCGCTTGCA
	WSPintR <sup>2</sup>	CCAA(CT)AGTGC(CT)ATAAAGAAC
	WSPintR'	CCAATAGTGCTATAAAGAAC

**Quadro 3.** Sequências de *primers* utilizados (em preto) na detecção da diversidade genética de *Wolbachia* em *Wuchereria bancrofti*.

**Fonte:** Baldo *et al.* (2006) e Bazzochi *et al.* (2000).

**Nota:** 1. *Primer* original descrito por Baldo *et al.* (2006); 2. *Primer* original de acordo com Bazzochi *et al.* (2000). Todos os oligonucleotídeos foram parcialmente modificados, as degenerações foram removidas.

## 6.5. Considerações éticas

O presente trabalho incluiu coleta de amostras de sangue humano e coleta de mosquitos vetores em residências. Então, foram construídos termos de consentimento livre esclarecido informando aos participantes todas as condições na participação das coletas, de acordo com a resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, número 196, de 10 de outubro de 1996. Foram respeitados os quatro pilares da ética, Autonomia (consentimento livre e esclarecido do indivíduo), Não Maleficência (garantia que danos previsíveis fossem evitados), Beneficência (ponderação entre riscos e benefícios) e Justiça (relevância social da pesquisa). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética da instituição para devidas análises cujo parecer encontra-se em anexo no final deste trabalho (apêndice).

## **7. RESULTADOS**

---

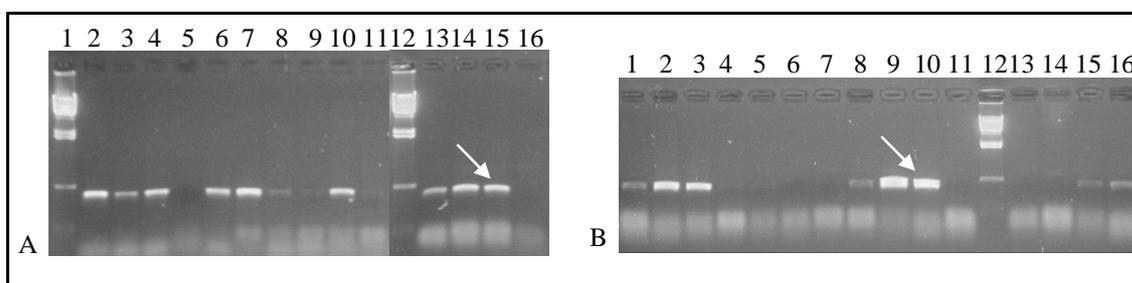
---

## 7 RESULTADOS

### 7.1 *Aedes albopictus* – detecção da prevalência e diversidade de *Wolbachia* para os genes *ftsZ* e *wsp*.

#### a. Prevalência

Até o momento, este estudo é o primeiro a investigar a prevalência de *Wolbachia* e sua diversidade genética em populações de mosquitos do Brasil. Dos 150 indivíduos analisados, sete foram excluídos da análise por terem sido negativos para o gene *rpl8*. Dos demais 143 *A. albopictus* analisados, 91,61% foram positivos por PCR para *Wolbachia* e 67,13% estava superinfectado com ambas as linhagens. Examinando o percentual de infecção por sexo encontramos diferença significativa, 82,76% dos machos e 97,65% das fêmeas estavam infectados ( $P = 0,0043$ ). O maior número de indivíduos negativos (sem *Wolbachia*) foi encontrado no bairro de Engenho do Meio (figura 10), que também foi a única área onde foram observadas fêmeas negativas. Foi possível verificar ainda que apenas 50% das fêmeas abrigavam ambas as linhagens de *Wolbachia* (tabela 1), enquanto que em DI e MC 100% das fêmeas foram positivas para os supergrupos A e B (EM vs. DI:  $P = 2,089e-05$ ; EM vs. MC:  $P = 7,621e-05$ ). Em geral, o número total de fêmeas com *Wolbachia* A (A + AB) não diferiu do padrão de infecção pelo supergrupo B (B + AB) ( $P = 0.2483$ ). Contudo, o percentual de indivíduos com supergrupo A foi significativamente mais baixo do que os indivíduos infectados com B entre os machos ( $P = 0.0003$ ).



**Figura 10.** Géis de agarose 1% com produtos da PCR convencional para diagnóstico de infecção de *A. albopictus* por *Wolbachia*.

**Fonte:** Dados próprios.

**Nota:** (A). Fragmento de 432 pb do gene *ftsZA* de *Wolbachia* em fêmeas do EM. Poços: 1 e 12- marcador de peso molecular  $\lambda$ -hind III; 2-4, 6, 7, 10, 13 e 14 amostras positivas com bandas mais fortemente coradas; 8,9 e 11- bandas claras; 5- amostra negativa; 15 e 16- controles, positivo (seta) e

negativo, respectivamente. (B). Fragmento de 432 pb do gene *ftsZB* de *Wolbachia* em fêmeas e machos (13-16) do EM. Poço: 12- marcador de peso molecular  $\lambda$ -*hind* III; 1-3, 8, 9, 15 e 16- amostras positivas com bandas mais coradas; 6, 13 e 14- amostras negativas; 4, 5 e 7- bandas claras; 10 e 11- controles, positivo (seta) e negativo, respectivamente.

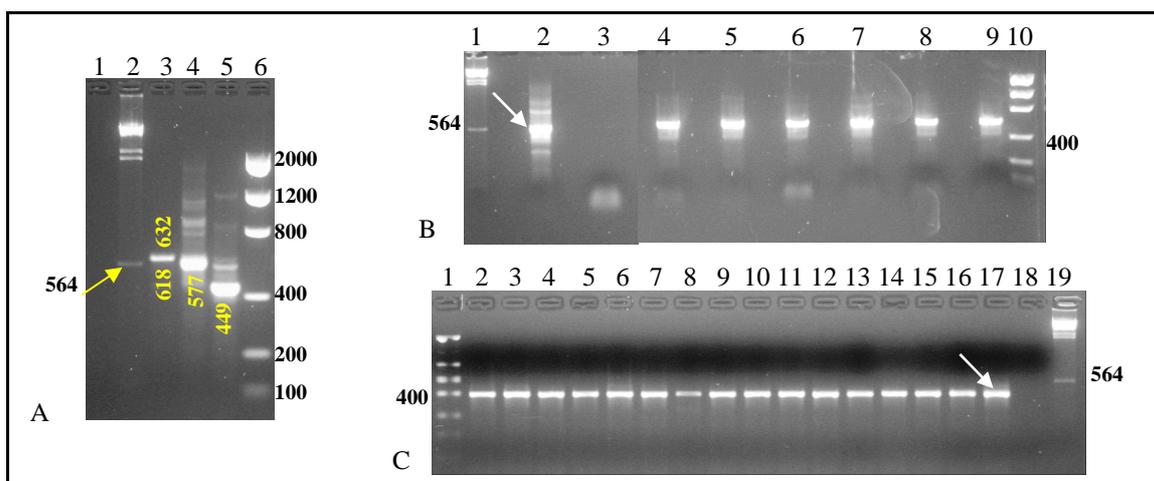
**Tabela 1. Prevalência de *Wolbachia pipientis* em *Aedes albopictus* coletados em Recife-PE, Brasil.**

Local	Número de indivíduos analisados por PCR (N), e número de machos e fêmeas positivos para cada linhagem de <i>Wolbachia</i> com percentual de indivíduos positivos entre parênteses										Total Machos+Fêmeas	
	N	Ø	Machos			Fêmeas					+	-
			A	B	AB	N	Ø	A	B	AB		
DI	15	2	1 (6,7)	6 (40,0)	6 (40,0)	34	0	0 (0)	0 (0)	34 (100)	47 (95,9)	2 (4,1)
EM	22	5	1 (4,5)	5 (22,7)	11 (50,0)	22	2	7 (31,8)	2 (9,1)	11 (50,0)	37 (84,1)	7 (11,9)
MC	21	3	1 (4,8)	12 (57,1)	5 (23,8)	29	0	0 (0)	0 (0)	29 (100)	47 (94,0)	3 (6,0)
Total	58	10	3 (5,1)	23 (39,7)	22 (37,9)	85	2	7 (8,2)	2 (2,4)	74 (87,1)	131 (91,6)	12 (8,4)

**Fonte:** Dados da autora.

**Nota:** DI: Dois Irmãos; EM: Engenho do Meio; MC: Morro da Conceição.

Por outro lado, quando reexaminados pela PCR *seminested* (figura 11), os 143 indivíduos apresentaram um percentual de superinfecção de 99.3%, diferindo significativamente do resultado obtido pelo método anterior ( $P = 1.078e-12$ ), ver tabela 2. Nesta abordagem metodológica nenhum mosquito foi considerado negativo para *Wolbachia* (tabela 2) e apenas uma fêmea de EM (1,18%) foi diagnosticada com o endossimbionte de um só supergrupo, o B. Quanto à relação entre machos e fêmeas infectados a PCR *seminested* não mostrou diferença significativa ( $P = 1$ ).



**Figura 11. Géis de agarose 1% com produtos da PCR *seminested* para diagnóstico de infecção de *A. albopictus* por *Wolbachia*.**

**Fonte:** Dados da autora.

**Nota:** (A) Etapas da PCR *seminested*. Poços: 1- Controle negativo; 2- marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Hind* III (fragmento de 564 pb em destaque); 3- Banda com fragmentos do gene *wsp* dos supergrupos A e B de *Wolbachia* amplificados na 1ª etapa da PCR *seminested* (não é possível visualizar bandas

separadas nesse sistema); 4- 2º round – fragmento *wsp* A; 5- 2º round – fragmento *wsp* B; 6- marcador de peso molecular *low mass ladder* (fragmento e);. (B) Fragmento de 577 pb do gene *wspA* de *Wolbachia* em fêmeas do EM. Poços: 1- marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Hind* III; 2 e 3- controles, positivo (seta) e negativo, respectivamente; 4-9- amostras positivas; 10- marcador de peso molecular *low mass ladder*. (C) Fragmento de 449 pb do gene *wspB* de *Wolbachia* em machos e fêmeas do EM. Poços: 1- marcador de peso molecular *low mass*; 2-16- amostras positivas; 17 e 18- controles, positivo (seta) e negativo, respectivamente; 19- marcador de peso molecular  $\lambda$ -*hind*.

**Tabela 2. Comparação entre os métodos de PCR padrão e PCR *seminested* usados para avaliar a prevalência de *Wolbachia* em *Aedes albopictus* de Recife (EM, DI e MC)<sup>1</sup>**

Status da infecção	Número de machos e fêmeas positivos para as linhagens de <i>Wolbachia</i> com o percentual de indivíduos positivos entre parênteses.			
	PCR padrão		PCR <i>seminested</i>	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
AB	22 (37,9)	74 (87,1)	58 (100,0)	84 (98,8)
A	3 (5,1)	7 (8,2)	0 (0)	0 (0)
B	23 (39,7)	2 (2,4)	0 (0)	1 (1,2) <sup>2</sup>

**Fonte:** Dados da autora.

**Nota:** 1- DI: Dois Irmãos; EM: Engenho do Meio; MC: Morro da Conceição. 2- Na PCR *seminested*, o único indivíduo infectado por um só supergrupo foi uma fêmea, EM.

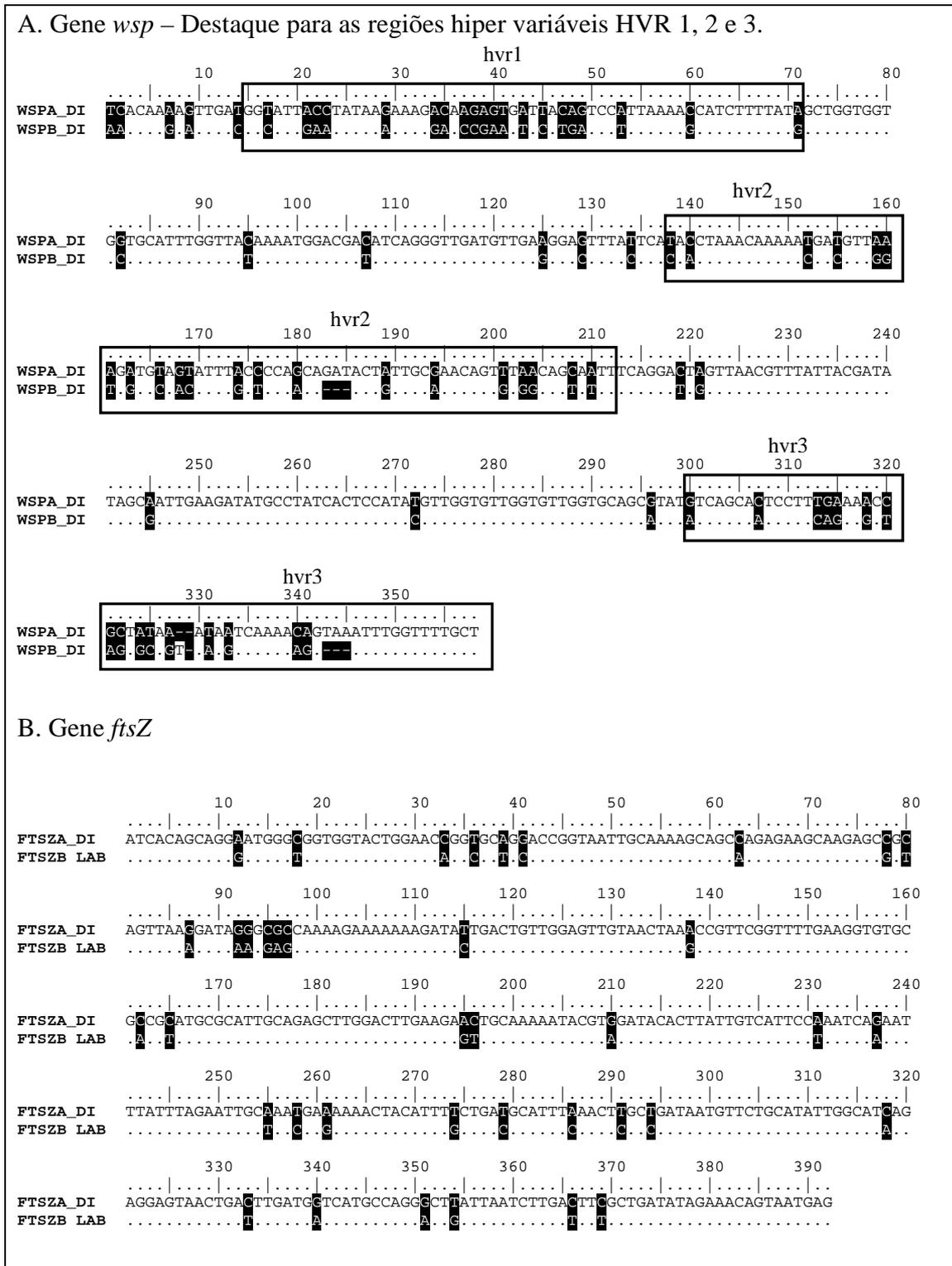
### b. Diversidade

As sequências *wsp* e *ftsZ* foram analisadas de acordo com o critério de qualidade do programa CodonCode Aligner (*quality value*  $\geq 20$ , *error probability for the base call*  $\leq 1\%$ ), foram escolhidas para análise das 14 populações de *A. albopictus* 70 sequências do gene *ftsZ* A, 65 *ftsZ* B, 40 *wsp* A, 71 *wsp* B. Não houve variação intrapopulacional nem interpopulacional na sequência de nucleotídeos dos dois genes estudados.

Para os genes *wsp* A e B, obtivemos, respectivamente, os fragmentos de 538 e 400 pb, dos quais foram retiradas as sequências dos *primers*. Correspondendo exatamente às posições 48-585 da sequência da linhagem *wAlbA* (nº de acesso no GenBank AF020058.1) e 1-400 da *wAlbB* (AF020059.1) descritas por Zhou *et al.* 1998 (figura 6A).

Do mesmo modo, do segmento de 392 nucleotídeos do gene *ftsZ* A já editado sem a região de anelamento dos oligonucleotídeos, os primeiros 374 nt alinham precisamente com a porção de 62-435 pb da sequência publicada por Baldo *et al.* (2006) (nº de acesso do GenBank DQ842305.1) (figura 6B). Com relação ao *ftsZ* B, os

392 nucleotídeos correspondem às regiões 413 a 804 das sequências publicadas por Werren *et al.* (1995) para *A. albopictus* (U28206.1). Por outro lado, a comparação entre os supergrupos A e B mostrou uma divergência de 10% para a região analisada do gene *ftsZ* e de 54,3% para o gene *wsp*.



**Figura 12.** Alinhamento utilizando o programa BioEdit/Clustal W das seqüências de nucleotídeos entre os supergrupos A e B dos genes *wsp* (A) e *ftsZ* (B) de *Wolbachia* de *A. albopictus*.

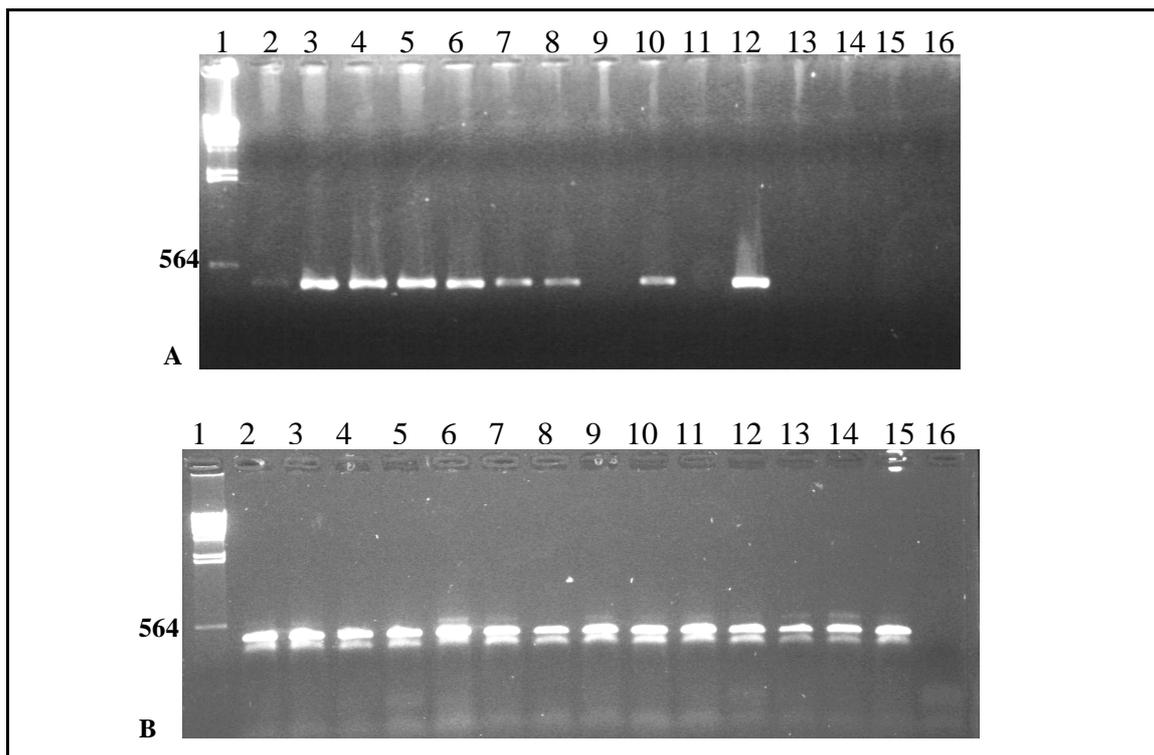
**Fonte:** Dados da autora.

**Nota:** Nas seqüências os pontos mostram a conservação e as regiões sombreadas identificam as divergências.

## 7.2 *Culex quinquefasciatus* - detecção da prevalência, diversidade de *Wolbachia* para os genes *ftsZ* e *wsp* e densidade de *Wolbachia* em populações resistentes *versus* susceptível

### a. Prevalência

Dos 250 indivíduos analisados, aproximadamente 80% (201 mosquitos) foram diagnosticados positivos na PCR convencional (figura 13A), desses 46,3% são machos e 53,7% fêmeas. Todos os indivíduos considerados negativos (49) pela PCR comum foram diagnosticados positivos pela PCR *seminested* (figura 13B), caracterizando 100% de infecção (tabela 3).



**Figura 13.** Géis de agarose 1% com produtos da PCR para diagnóstico de infecção de *C. quinquefasciatus* por *Wolbachia*.

**Fonte:** Dados da autora.

**Nota:** (A) PCR convencional - Fragmento de 432 pb do gene *ftsZ* B de *Wolbachia* em machos de JB. Poços: 1- marcador de peso molecular  $\lambda$ -hind III (fragmento de 564 pb em destaque); 2 – banda pouco corada; 3-8 e 10 amostras positivas; 9, 11, 14-16 amostras negativas; 12, e 13- controles, positivo e negativo, respectivamente. (B) PCR *seminested* em tubo único - Fragmento de 452 pb do gene *wsp* B de *Wolbachia* em machos e fêmeas de AF e machos de IP. Poços: 1 marcador de peso molecular  $\lambda$ -hind III (fragmento de 564 pb em destaque); 2-13- amostras positivas; 14 e 15- controles positivos e 16- controle negativo, respectivamente.

**Tabela 3. Comparação entre os métodos de PCR padrão e PCR *seminested* usados para avaliar a prevalência de *Wolbachia* em *Culex quinquefasciatus* em populações da RMR do Recife.**

Local de coleta	Número de machos e fêmeas positivos para <i>Wolbachia</i> com o percentual de indivíduos positivos entre parênteses.			
	PCR padrão		PCR <i>seminested</i>	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
JB	22 (88,0)	17 (68,0)	25 (100,0)	25 (100,0)
AC	15 (60,0)	18 (72,0)	25 (100,0)	25 (100,0)
AF	16 (64,0)	24 (96,0)	25 (100,0)	25 (100,0)
IP	15 (60,0)	25 (100,0)	25 (100,0)	25 (100,0)
PX	25 (100,0)	24 (96,0)	25 (100,0)	25 (100,0)

**Fonte:** Dados da autora.

**Nota:** JB: Jaboatão do Guararapes; AC: Alto da Conquista; AF: Água Fria; IP: Ipojuca; PX: Peixinhos.

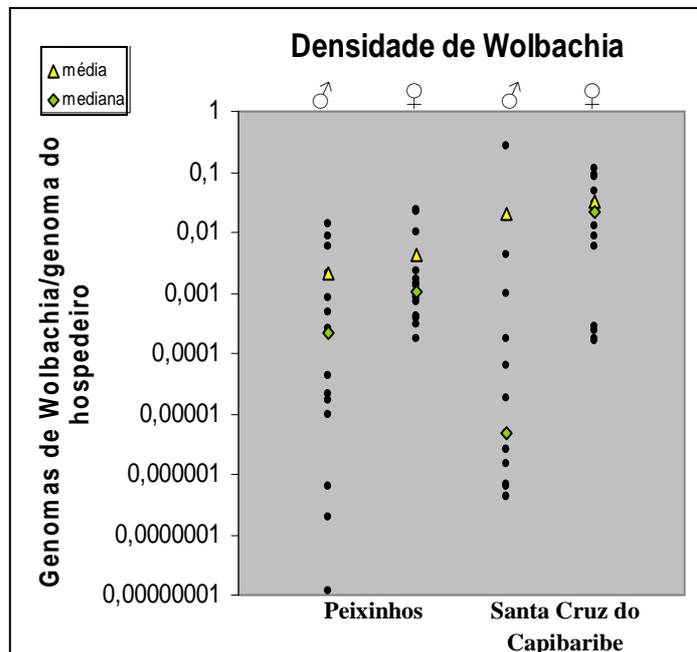
### *b. Diversidade*

Para os genes *wsp* e *ftsZ* B foram obtidos fragmentos de 555 e 392 pb, respectivamente, os quais foram idênticos nas populações analisadas e às sequências da linhagem *wPip* previamente publicadas, *wsp* (AF020060.1) (ZHOU; ROUSSET; O'NEIL, 1998) e *ftsZ* (U28209.1) (WERREN; ZHANG; GUO, 1995). Com relação ao *ftsZ* B os 392 nucleotídeos correspondem às regiões 413 à 804 das sequências publicadas de *C. quinquefasciatus*.

### *c. Quantificação*

A densidade relativa do endossimbionte, número de genomas de *Wolbachia* por genomas de *Culex*, variou de acordo com o sexo e também entre as populações analisadas. Os mosquitos de Santa Cruz do Capibaribe, população resistente a temefós, apresentaram maior densidade de *Wolbachia* quando comparados com os indivíduos coletados em Peixinhos, população susceptível (Gráfico 1), tanto para fêmeas (0,031629 *versus* 0,004379) quanto para machos (0,019504 *versus* 0,002115). Os valores encontrados nos machos não mostram uma distribuição muito regular. Enquanto que, as fêmeas de Santa Cruz do Capibaribe apresentaram os valores

individuais próximos à média, cerca de sete vezes maior do que as fêmeas de Peixinhos.



**Gráfico 1.** Variações na densidade de *Wolbachia* entre mosquitos susceptíveis e resistentes a temefós.

**Fonte:** Dados da autora.

**Nota:** Todas as medições foram realizadas em machos e fêmeas com cinco dias de vida (adulto). Cada ponto no gráfico refere-se à média das duplicatas de um indivíduo.

### 7.3 *Wuchereria bancrofti* - detecção da diversidade de *Wolbachia* para os genes *ftsZ* e *wsp*.

#### a. Diversidade

Para os genes *wsp* e *ftsZ* foram obtidos fragmentos de 511 e 481 nucleotídeos, respectivamente, os quais foram idênticos nos indivíduos analisados e às sequências previamente publicadas, *wsp* (DQ093850.1) e *ftsZ* (DQ093830.1) (PLICHART; LEGRAND, 2005). Com relação aos alinhamentos, os 511 nucleotídeos do gene *wsp* correspondem às regiões 6 à 515 enquanto que os 481 nucleotídeos estão alinhados à região 144 à 624 das sequências publicadas para a bactéria *Wolbachia* ver figuras 14 e 15.

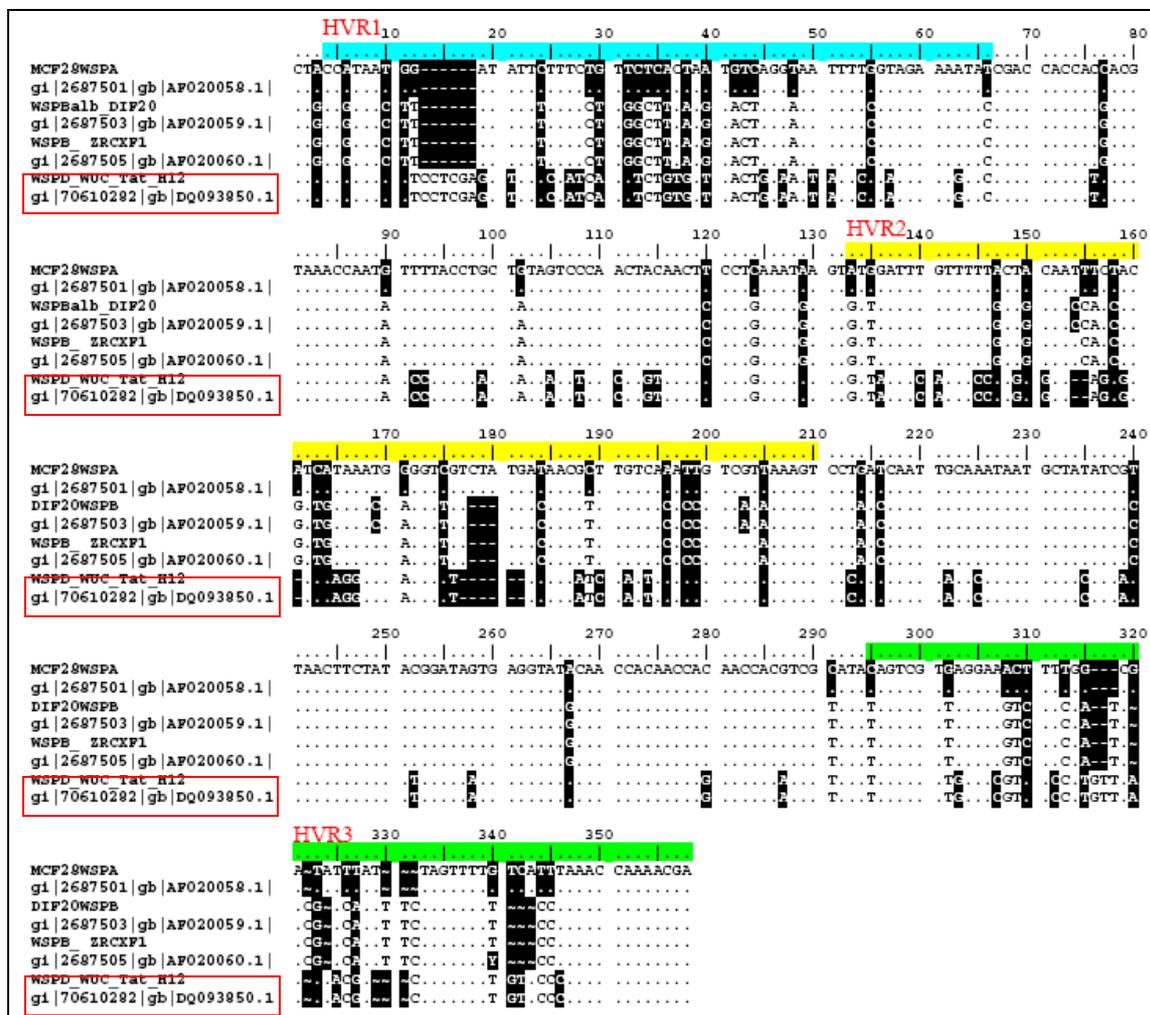
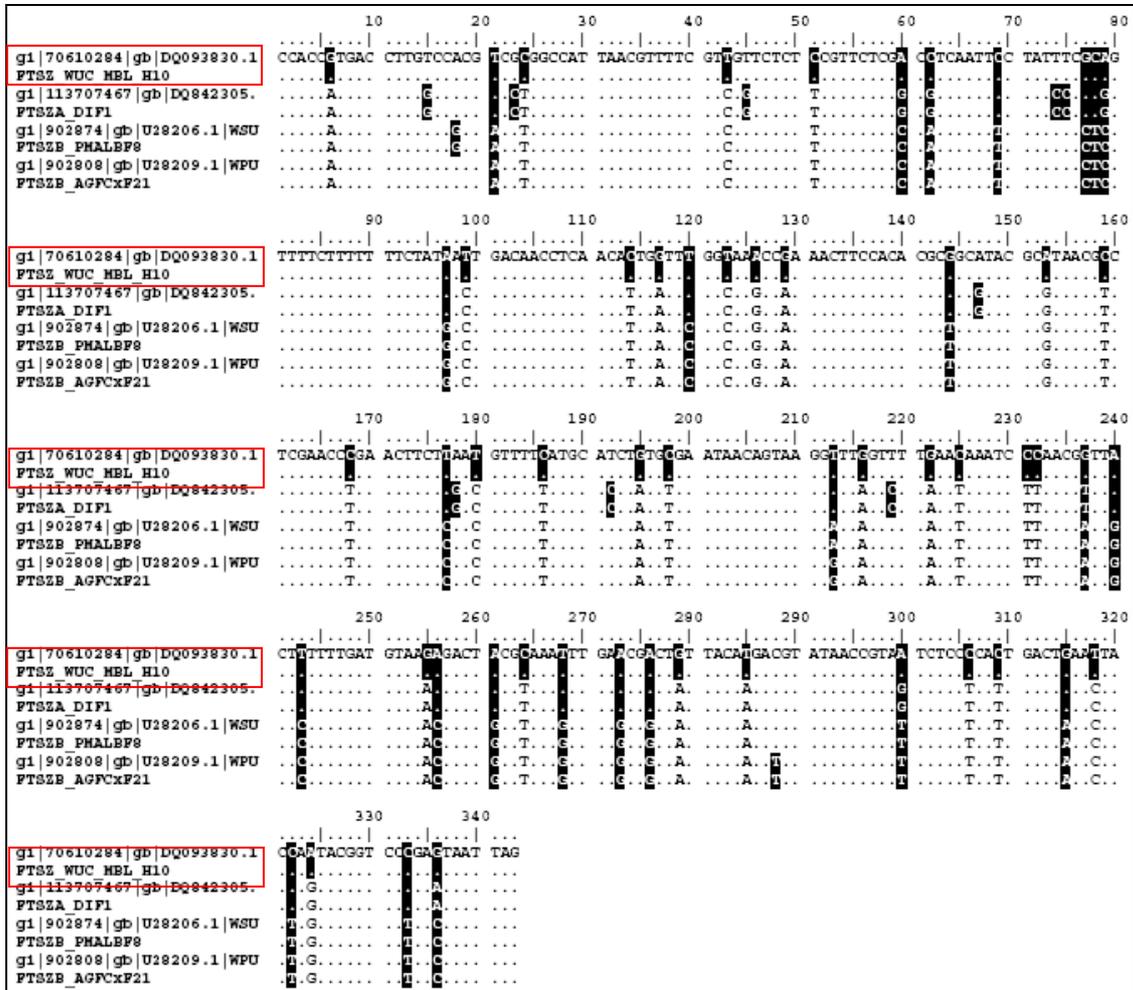


Figura 14. Alinhamento utilizando o programa BioEdit/Clustal W das seqüências de nucleotídeos entre os supergrupos A, B e D (marcadas em vermelho) do gene *wsp* (A) e *ftsZ* (B) de *Wolbachia* de *W. bancrofti*, *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus* obtidas no estudo e das respectivas seqüências referências publicadas.

Fonte: Dados da autora e do banco de dados NCBI depositados por Zhou *et al.* (1998), Werren *et al.* (1995), Plichart *et al.* (2005).

Nota: Nas seqüências os pontos mostram a conservação e as regiões sombreadas identificam as divergências. Destaque para as regiões hiper variáveis, HVR 1, 2 e 3, sombreado colorido e para as seqüências de *W. bancrofti*, retângulo vermelho.



**Figura 15.** Alinhamento utilizando o programa BioEdit/Clustal W das seqüências de nucleotídeos entre os supergrupos A, B e D do gene *ftsZ* (B) de *Wolbachia* de *W. bancrofti*, *A. albopictus* e *C. quinquefasciatus*.

**Fonte:** Dados da autora e seqüências do banco de dados depositada por Zhou *et al.* (1998), Werren *et al.* (1995), Plichart *et al.* (2005).

**Nota:** Nas seqüências os pontos mostram a conservação e as regiões sombreadas identificam as divergências. Destaque para as seqüências de *W. bancrofti*, retângulo vermelho.

## **8. DISCUSSÃO**

---

---

## 8 DISCUSSÃO

### *a. Prevalência*

A detecção de um grande número de indivíduos negativos ou infectados por um só supergrupo de *Wolbachia* no nosso estudo com *A. albopictus*, tanto em machos quanto em fêmeas, levou-nos a busca de uma nova estratégia para a comprovação de tal condição. No estudo realizado por Kittayapong *et al.* (2002), a confirmação do status de infecção de mosquitos *A. albopictus* por *Wolbachia* é feita pela PCR da F1 das fêmeas coletadas em campo. Porém, como os machos não transmitem a bactéria para a geração seguinte, a infecção não pode ser verificada por esse método. Além disso, no trabalho de Kittayapong *et al.* (2002) 12,5% das fêmeas superinfectadas apresentaram transmissão maternal de *Wolbachia* imperfeita, ou seja, apenas uma das linhagens é passada para a prole. Sendo assim, o estudo da F1 para confirmação de falso-negativos não é um método totalmente confiável, apresentando aplicabilidade restrita, e sem contar que é um meio bastante laborioso. Dessa forma, os resultados sobre prevalência produzidos no presente trabalho basearam-se na confirmação através da PCR *seminested* tanto dos mosquitos negativos para *Wolbachia* quanto dos infectados por apenas uma linhagem no caso de *A. albopictus*. Com base nessa experiência procedemos do mesmo modo para obtenção dos dados de prevalência em *C. quinquefasciatus*.

Nossos resultados mostraram que 98,82% das fêmeas de *A. albopictus* estavam superinfectadas com *W. pipientis* para os supergrupos A e B, semelhante ao que foi encontrado em fêmeas de *A. albopictus* da Tailândia por Kittayapong *et al.* (2002) (97.5%;  $P= 0.7475$ , quando comparados com 98.82% aqui encontrados) e Kittayapong *et al.* (2002) (97.93%;  $P= 0.8728$ , *versus* 98.82%). Resultados semelhantes de superinfecção também foram encontrados em *A. albopictus* de Madagascar por Zouache *et al.*, (2009).

Diferente da PCR *seminested*, através da PCR comum, uma taxa mais baixa de superinfecção por *W. pipientis* foi encontrada em machos (23,81% em MC; 40% em DI; e 50% em EM) e em fêmeas de EM (50%). Tal variação do *status* de infecção pode ser justificada por uma falha na transmissão maternal de *Wolbachia* para a prole

devido a variações nas condições ambientais, como sugerida em Kittayapong *et al.* (2002). Dessa forma a bactéria não seria transmitida a todos os indivíduos da prole, sendo detectada apenas uma linhagem de *Wolbachia* nos mosquitos quando investigados pela PCR convencional. Essa hipótese é reforçada por estudos que mostram que alterações ambientais, como por exemplo, a exposição prolongada a organofosforados seguida de seleção de genes de resistência e superprodução de esterases envolvendo aumento do custo biológico compromete a capacidade do inseto de controlar a densidade do endossimbionte (BERTICAT *et al.*, 2002; ECHAUBARD *et al.*, 2010). Como a prevalência foi encontrada através do método de PCR *seminested* e os adultos de *A. albopictus* foram coletados com idades diferentes, uma análise comparativa de densidade não foi viável, pois além de variar entre machos e fêmeas a densidade do simbionte também apresenta uma distribuição diferente ao longo da vida do inseto (BERTICAT *et al.*, 2002).

A ocorrência de machos negativos pode ser explicada pela pressão de seleção do endossimbionte sobre os machos para a manutenção da infecção, a qual é menor ou menos importante do que nas fêmeas; pois os machos não transmitem a bactéria. Mesmo estando não infectados, os machos podem cruzar com fêmeas de qualquer status infeccioso sem comprometer a produção da prole por causa da IC (HOFFMANN, 2005). Nas fêmeas, *Wolbachia* tem um papel de maior impacto, nas quais estudos com *A. albopictus* mostraram uma maior longevidade entre os indivíduos infectados (CALVITTI *et al.*, 2009), além de grandes taxas de oviposição e uma progênie mais numerosa (DOBSON; FOX; JIGGINS, 2002).

Uma diferença de prevalência (ou densidade) entre as linhagens também é encontrada para a maioria dos grupos analisados neste trabalho. Apesar de não apresentar diferença significativa nas fêmeas; nos machos a linhagem A apresentou-se menos frequente do que a B em todas as populações. Kittayapong *et al.* (2002) também já havia publicado uma pequena diferença na frequência dos supergrupos em fêmeas de *A. albopictus*. E em Dutton e Sinkins (2004) a densidade relativa de *wAlbB* foi significativamente maior que *wAlbA* tanto em machos quanto em fêmeas de *A. albopictus*. Ainda nesse trabalho alguns indivíduos negativos para a linhagem A submetidos a uma PCR *seminested* para aumentar a sensibilidade, e sete de doze machos de *A. albopictus* foram positivos para *wAlbA* no segundo *round* da PCR *seminested*. A linhagem A também demonstrou ser susceptível aos efeitos da idade,

quando apenas os machos de *A. albopictus* com *wAlbA* perderam progressivamente a capacidade de produzir a IC após o décimo dia da vida adulta (KITAYAPONG; MONGKALANGOON *et al.*, 2002). A partir da análise desses estudos sugere-se que a linhagem A está sob um controle de densidade diferente do que a linhagem B, similarmente ao que ocorre entre machos e fêmeas. Por outro lado, Zouache *et al.*, (2011) encontraram a linhagem *wAlbA* em uma população de *A. albopictus* na cidade de Tsimbazaza Park, Madagascar muito mais alta que a linhagem *wAlbB*.

O mosquito *A. albopictus* é considerado um bom modelo para estudos de modificação de populações de vetores, melhor que *Drosophila simulans*, devido a correspondência entre os dados de campo e de laboratório (SINKINS, 2004). Apesar da diferença de densidade, a superinfecção em fêmeas de *A. albopictus* tem-se mostrado comum e estável (KITAYAPONG; BAIMAI; O'NEILL, 2002; SINKINS, 2004) e confirmam os dados obtidos em Dois Irmãos e Morro da Conceição. Porém na população do EM os fatores que promovem essa variação precisam ser mais bem estudados, como a evolução deste perfil de prevalência com novas coletas. Para o uso de *Wolbachia* em programas de controle envolvendo a dispersão de genes de bloqueio de transmissão de doenças vetoriais, o conhecimento sobre os dados de prevalência de infecção são essenciais.

Os resultados de um modo geral obtidos com a PCR *seminested* são corroborados pelos estudos os quais mostram que a superinfecção por *Wolbachia* em fêmeas de *A. albopictus* é um evento estável e comum (KITAYAPONG; BAIMAI; O'NEILL, 2002; SINKINS, 2004). Além disso, o uso da técnica de PCR *seminested* mostrou-se eficaz para inquéritos de prevalência de *Wolbachia*, sendo recomendada para investigar indivíduos negativos pela PCR tradicional.

O resultado obtido com emprego da técnica de PCR *seminested* no diagnóstico da infecção por *Wolbachia* em *C. quinquefasciatus* foi tão satisfatório quanto o encontrado com o vetor *A. albopictus*. Em concordância com os resultados observados com o complexo *C. pipiens* na Califórnia por Rasgon e Scott (2003), os nossos dados de prevalência mostram que a bactéria *Wolbachia* está fixada ou próxima da fixação na população de *C. quinquefasciatus*.

### *b. Densidade*

Quanto à variação da densidade do endossimbionte *Wolbachia* em populações de *C. quinquefasciatus* susceptíveis *versus* resistentes a organofosforados, resultado semelhante foi observado no estudo em Montpellier (França). Nesse trabalho a população analisada possuía um fenótipo de resistência a organofosforado e alteração da densidade do endossimbionte no hospedeiro, os dados aqui obtidos também mostram que a população resistente apresenta uma densidade maior do endossimbionte. De acordo com Berticat *et al.* (2002) a condição de resistência a inseticidas, pelo menos quando ocorre aumento na produção de esterases, desequilibra o controle da densidade do simbiote pelo hospedeiro. Esse fenômeno pode estar associado a um maior custo biológico pelo fenótipo resistente devido ao aumento da produção de enzimas detoxificadoras, esterases, comprometendo dessa forma o emprego da energia necessária para controlar a densidade da bactéria dentro do hospedeiro.

### *c. Diversidade*

Analisando a diversidade genética dos genes *ftsZ* e *wsp*, diversos estudos sugerem que eventos de recombinação sejam frequentes na evolução do simbiote *Wolbachia* e que a superinfecção tenha um papel importante nesse evento. Porém não se sabe qual a taxa de co-infecção necessária para que ocorra a recombinação nem os mecanismos envolvidos (BALDO; LO; WERREN, 2005; JIGGINS *et al.*, 2001; JIGGINS, 2002; WERREN; ZHANG; GUO, 1995; WERREN; BARTOS, 2001). Com a possibilidade de uso de *Wolbachia* para controle populacional de vetores via IC, a identificação de diferentes linhagens dentro do mesmo supergrupo é importante, pois não se tem conhecimento ainda se esta provocaria também a IC.

Quanto à diversidade de *Wolbachia* no mosquito *C. quinquefasciatus*, o estudo de Rasgon e Scott (2003) revelou não haver nenhuma variação para o gene *wsp* em 30 indivíduos analisados em 14 populações da Califórnia. Na mesma linha de trabalho Armbruster *et al.* (2003) em um estudo interpopulacional analisando o gene *wsp* em 18 indivíduos de *A. albopictus* coletados em 14 diferentes pontos distribuídos no novo e no velho mundo não encontraram variação dentro dos supergrupos A e B. Porém como a análise foi pontual (apenas uma sequência de cada região) talvez houvesse diversidade não detectada, mas o nosso trabalho mostrou uma alta conservação mesmo

na análise intrapopulacional. Por outro lado, Reuter e Keller (2003) observaram uma alta taxa de recombinação no gene *wsp* em uma população de formiga, *Formica exsecta*, superinfectada com cinco linhagens de *Wolbachia*, das quais três parecem ter surgido a partir de recombinação homóloga. Em relação ao *ftsZ* de *Wolbachia*, seis diferentes tipos de sequências foram encontradas em 11 populações geográficas da aranha *Hylyphantes graminicola* (YUN *et al.*, 2011). Apesar de ser um dos genes que evolui mais rapidamente em *Wolbachia* (GUILLEMAUD; PASTEUR; ROUSSET, 1997), os dados aqui obtidos para o gene *ftsZ* em *A. albopictus* e *C. pipiens* sugere que a evolução desse gene é diferente nos diversos grupos de insetos, ainda que apresentem o mesmo fenótipo reprodutivo (IC).

De acordo com o estudo de Behbahani *et al.* (2005) em ilhas do Pacífico Sul com três espécies do grupo *Aedes scutellaris* (*A. polynesiensis*, *A. pseudoscutellaris* e *A. tongae*), as sequências do gene *wsp* de *Wolbachia* nesses hospedeiros são muito próximas, apresentando poucas transições nucleotídicas entre eles. A linhagem que infecta *A. polynesiensis* na Ilha Moorea não apresenta substituições em relação a *A. pseudoscutellaris*, porém difere do *A. polynesiensis* das Ilhas Fiji em uma única transição. Mas são pouco relacionados com a linhagem A do *A. albopictus*, espécie que é intimamente relacionada ao grupo *A. scutellaris*, porém este fato não é surpreendente, uma vez que é sabido que a filogenia de *Wolbachia* em artrópodos não acompanha a filogenia dos seus hospedeiros, como observado em *Wolbachia* de nematódeos (BANDI *et al.*, 1998; CASIRAGHI *et al.*, 2001; VAVRE *et al.*, 1999).

Ayres *et al.* (2002) observaram alta variabilidade genética e divergência entre populações de *A. albopictus* coletadas em diferentes regiões do Brasil. Porém, os resultados obtidos neste estudo e o citado anteriormente (ARMBRUSTER *et al.*, 2003) demonstram que as linhagens de *Wolbachia* presentes nesta espécie parecem ser estáveis e altamente conservadas independentemente do grau de divergência das populações de *A. albopictus* estudadas. Entre as hipóteses levantadas para justificar a conservação dos genes *ftsZ* e *wsp* em *Wolbachia* de *A. albopictus* está: a menor densidade da linhagem A em relação a B o que pode diminuir as chances de recombinação homóloga; ou ainda a importância desses genes na manifestação do fenótipo IC, cuja pressão de seleção pode estar inibindo o surgimento de novas linhagens. Essas questões precisam ser mais bem estudadas e a análise de outros marcadores para *Wolbachia*, tal como regiões intergênicas (PETRIDIS;

CHATZIDIMITRIOU, 2011), podem também ajudar a esclarecer o cenário atual e a entender um pouco mais sobre a relação entre essa bactéria e seus hospedeiros, ajudando no desenvolvimento de novas estratégias de controle de mosquitos.

Embora em nematódeos filariais o gene *ftsZ* tenha mostrado maior diversidade que o *wsp* quando comparados com artrópodos (BAZZOCCHI *et al.*, 2000), ainda assim os nossos dados mostraram conservação. Porém os dados populacionais sobre diversidade do endossimbionte de nematódeos filariais que por sua vez parasitam humanos é escasso, devido à dificuldade de aumentar o número de indivíduos coletados por questões éticas. Sendo assim a busca por marcadores mais variáveis podem solucionar o problema do tamanho amostral pequeno.

## **9. CONCLUSÕES**

---

---

## 9 CONCLUSÕES

Somente duas linhagens de *Wolbachia*, ambas sem diversidade genética de acordo com os genes estudados, estão presentes nas populações de *Aedes albopictus* estudadas; A falta de diversidade sugere não estar havendo recombinação entre elas nesta espécie, diferente do que já foi observado em outras espécies. Este fato deverá ser mais bem investigado no futuro. Em relação às populações de *Culex quinquefasciatus* analisadas, existe apenas um supergrupo de *Wolbachia*, também sem diversidade genética quanto aos marcadores usados. Porém a investigação de novos marcadores poderá ajudar a elucidar o complexo padrão de IC encontrado nesses organismos. Da mesma forma que nos culicídeos, o endossimbionte encontrado no verme filarial *W. bancrofti* não apresentou diversidade para os genes *ftsZ* e *wsp*.

Nas populações observadas, os genes *ftsZ* e *wsp* não mostraram aplicabilidade para estudos populacionais. Outros genes da bactéria *Wolbachia* deverão ser investigados em trabalhos futuros para identificar possíveis variações que não foram reveladas pelos genes analisados no presente trabalho e possibilitar que inferências populacionais sejam feitas.

O percentual de infecção nos culicídeos quando investigado através do método de PCR *seminested* mostrou que a infecção está próximo dos níveis de fixação em ambos os mosquitos. Tais dados serão de grande relevância em futuros programas de controle que envolvam a *Wolbachia* como veículo de dispersão de genes de bloqueio de transmissão de doenças vetoriais, ou ainda que visem introduzir uma linhagem diferente da bactéria na população de culicídeos local.

No que diz respeito à variação da densidade do endossimbionte em populações de *C. quinquefasciatus* resistentes a temefós, a hipótese de relação entre resistência a temefós e desequilíbrio do controle da densidade do simbiote pelo hospedeiro ganhou mais força. Porém, merece uma maior atenção a análise de outras variáveis que possam influenciar na densidade da bactéria no hospedeiro resistente como as condições ambientais ou o fator tempo (gerações). Tal conhecimento pode ajudar a compreender melhor a dinâmica dessa infecção e possíveis implicações nos programas de controle de culicídeos.

## Perspectivas

Além da busca por outros marcadores que melhor representem a bactéria *Wolbachia* nos hospedeiros estudados neste trabalho, é importante a análise de outros fatores que estejam relacionados à densidade do endossimbionte em diferentes populações de culicídeos vetores. A análise de marcadores para definir subpopulações de vetores isoladas pela incompatibilidade citoplasmática com o objetivo de identificar a presença e frequência de genes de resistência a inseticidas nessas subpopulações é um dos nossos objetivos futuros.

## **REFERÊNCIAS**

---

---

**REFERÊNCIAS**

ARMBRUSTER, P. *et al.* Infection of New- and Old-World *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the intracellular parasite *Wolbachia*: implications for host mitochondrial DNA evolution. J Med Entomol, v. 40, n. 3, p. 356-360, May 2003.

AYRES, C. F. *et al.* Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97, n. 6, p. 871-875, Sep 2002.

BALDO, L. *et al.* Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. Mol Biol Evol, v. 23, n. 2, p. 437-449, Feb 2006.

\_\_\_\_\_. Accelerated microevolution in an outer membrane protein (OMP) of the intracellular bacteria *Wolbachia*. BMC Evol Biol, v. 10, p. 48, 2010.

\_\_\_\_\_. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Appl Environ Microbiol, v. 72, n. 11, p. 7098-7110, Nov 2006.

\_\_\_\_\_. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. J Bacteriol, v. 187, n. 15, p. 5406-5418, Aug 2005.

BANDI, C. *et al.* Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc Biol Sci, v. 265, n. 1413, p. 2407-2413, Dec 22 1998.

BARBOSA, R. M. *et al.* Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102, n. 4, p. 523-529, Jun 2007.

BAZZOCCHI, C. *et al.* *wsp* gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodes. Curr Microbiol, v. 41, n. 2, p. 96-100, Aug 2000.

BEHBAHANI, A. *et al.* Population differentiation and *Wolbachia* phylogeny in mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group. Med Vet Entomol, v. 19, n. 1, p. 66-71, Mar 2005.

BERTICAT, C. *et al.* High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. Proc Biol Sci, v. 269, n. 1498, p. 1413-1416, Jul 7 2002.

BOURTZIS, K. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. Adv Exp Med Biol, v. 627, p. 104-113, 2008.

BRAIG, H. R. *et al.* Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. J Bacteriol, v. 180, n. 9, p. 2373-2378, May 1998.

BUTTNER, D. W. *et al.* Obligatory symbiotic *Wolbachia* endobacteria are absent from *Loa loa*. Filaria J, v. 2, n. 1, p. 10, May 9 2003.

CALVITTI, M. *et al.* Effects on male fitness of removing *Wolbachia* infections from the mosquito *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol, v. 23, n. 2, p. 132-140, Jun 2009.

CASIRAGHI, M. *et al.* A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. Parasitology, v. 122 Pt 1, p. 93-103, Jan 2001.

CLARK, M. *Wolbachia* Symbiosis in Arthropods In: A, H.; RU, R. (Ed.). Wolbachia: a bug's life in another bug: Karger, 2007. p. 90–123.

CONSOLI, R.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

DOBSON, S. L. *et al.* The effect of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility on host population size in natural and manipulated systems. Proc Biol Sci, v. 269, n. 1490, p. 437-445, Mar 7 2002.

DUMLER, J. S. *et al.* Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol, v. 51, n. Pt 6, p. 2145-2165, Nov 2001.

DUTTON, T. J.; SINKINS, S. P. Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. Insect Mol Biol, v. 13, n. 3, p. 317-322, Jun 2004.

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

FELSENSTEIN, J. PHYLIP: phylogeny inference package. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1995.

FERREE, P. M. *et al.* *Wolbachia* utilizes host microtubules and Dynein for anterior localization in the *Drosophila* oocyte. PLoS Pathog, v. 1, n. 2, p. e14, Oct 2005.

FOSTER, J. *et al.* The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. PLoS Biol, v. 3, n. 4, p. e121, Apr 2005.

FUNKE, B. R. *et al.* Microbiologia. Artmed, 2005.

GUILLEMAUD, T. *et al.* Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*. Proc Biol Sci, v. 264, n. 1379, p. 245-251, Feb 22 1997.

HAEGEMAN, A. *et al.* An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: member of a new *Wolbachia* supergroup. Int J Parasitol, v. 39, n. 9, p. 1045-1054, Jul 15 2009.

HEDGES, L. M. *et al.* *Wolbachia* and virus protection in insects. Science, v. 322, n. 5902, p. 702, Oct 31 2008.

HERTIG, M.; WOLBACH, S. B. Studies on *Rickettsia*-Like Micro-Organisms in Insects. J Med Res, v. 44, n. 3, p. 329-374 327, Mar 1924.

HILGENBOECKER, K. *et al.* How many species are infected with *Wolbachia*?--A statistical analysis of current data. FEMS Microbiol Lett, v. 281, n. 2, p. 215-220, Apr 2008.

HOERAUF, A. *et al.* Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis- depletion of *Wolbachia* endosymbionts from *Wuchereria bancrofti* and stop of microfilaria production. Med Microbiol Immunol, v. 192, n. 4, p. 211-216, Nov 2003.

HOERAUF, A.; PFARR, K. *Wolbachia* Endosymbionts: An Achilles' Heel of Filarial Nematodes. In: HOERAUF A; RU, R. (Ed.). Wolbachia: a bug's life in another bug: Karger, 2007. p. 31-51.

HOERAUF, A. *et al.* *Wolbachia* endobacteria depletion by doxycycline as antifilarial therapy has macrofilaricidal activity in onchocerciasis: a randomized placebo-controlled study. Med Microbiol Immunol, v. 197, n. 3, p. 295-311, Sep 2008.

HOFFMANN, A. A. Entomology: incompatible mosquitoes. Nature, v. 436, n. 7048, p. 189, Jul 14 2005.

JIGGINS, F. M. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. Mol Biol Evol, v. 19, n. 9, p. 1640-1643, Sep 2002.

JIGGINS, F. M. *et al.* Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. Proc Biol Sci, v. 268, n. 1474, p. 1423-1427, Jul 7 2001.

KITTAYAPONG, P. *et al.* Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. Am J Trop Med Hyg, v. 66, n. 1, p. 108-111, Jan 2002.

\_\_\_\_\_. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. Am J Trop Med Hyg, v. 66, n. 1, p. 103-107, Jan 2002.

\_\_\_\_\_. Host age effect and expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of *Wolbachia*-superinfected *Aedes albopictus*. Heredity, v. 88, n. 4, p. 270-274, Apr 2002.

KLASSON, L. *et al.* Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group. Mol Biol Evol, v. 25, n. 9, p. 1877-1887, Sep 2008.

KOSEK, W.; RAO, R. The Discovery of *Wolbachia* in Arthropods and Nematodes – A Historical Perspective in. In: HOERAUF A; RU, R. (Ed.). Wolbachia: a bug's life in another bug: Karger, 2007. p. pp 1–14.

LAN, Q.; FALLON, A. M. Sequence analysis of a mosquito ribosomal protein rpl8 gene and its upstream regulatory region. Insect Mol Biol, v. 1, n. 2, p. 71-80, 1992.

LAVEN, H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. Nature, v. 216, n. 5113, p. 383-384, Oct 28 1967.

LO, N. *et al.* How many *Wolbachia* supergroups exist? Mol Biol Evol, v. 19, n. 3, p. 341-346, Mar 2002.

\_\_\_\_\_. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. Int J Syst Evol Microbiol, v. 57, n. Pt 3, p. 654-657, Mar 2007.

MAND, S. *et al.* Bancroftian filariasis--absence of *Wolbachia* after doxycycline treatment. Am J Trop Med Hyg, v. 78, n. 6, p. 854-855, Jun 2008.

MCMENIMAN, C. J. *et al.* Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. Appl Environ Microbiol, v. 74, n. 22, p. 6963-6969, Nov 2008.

\_\_\_\_\_. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. Science, v. 323, n. 5910, p. 141-144, Jan 2 2009.

MOREIRA, L. A. *et al.* A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. Cell, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, Dec 24 2009.

MOUSSON, L. *et al.* *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. Mol Ecol, v. 19, n. 9, p. 1953-1964, May 2010.

OBSERVATÓRIO\_IPPUR/UFRJ-FASE. Mapa da Região Metropolitana de Recife. *Divisão político administrativa da RM*: Equipe Metrodata: Henrique Rezende, Paulo Renato Azevedo, Peterson Leal., 2002.

ORGANIZAÇÃO\_MUNDIAL\_DE\_SAÚDE. Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. . Wkly Epidemiol Rec, v. 81, p. 221–232, 2006.

\_\_\_\_\_. *TDR Business Line 5 Innovative vector control interventions Annual Progress Report*. 2008

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

PERNAMBUCO, G. D. Mapa de Pernambuco. v. 2011. Recife: Palácio do Campo das Princesas - Praça da República, s/n - CEP 50010-928 - Recife - Pernambuco - Brasil, 2011.

PETRIDIS, M.; CHATZIDIMITRIOU, D. Characterization of an intergenic polymorphic site (pp-hC1A\_5) in *Wolbachia pipientis* (wPip). Mol Ecol Resour, v. 11, n. 4, p. 753-756, Jul 2011.

PFARR, K.; HOERAUF, A. The annotated genome of *Wolbachia* from the filarial nematode *Brugia malayi*: what it means for progress in antifilarial medicine. PLoS Med, v. 2, n. 4, p. e110, Apr 2005.

PLICHART, C.; LEGRAND, A. M. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) var. *pacifica* and *Aedes (Stegomyia) polynesiensis* (Diptera: Culicidae). Am J Trop Med Hyg, v. 73, n. 2, p. 354-358, Aug 2005.

POPOVICI, J. *et al.* Assessing key safety concerns of a *Wolbachia*-based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 105, n. 8, p. 957-964, Dec 2010.

RASGON, J. L.; SCOTT, T. W. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. Genetics, v. 165, n. 4, p. 2029-2038, Dec 2003.

REBOUÇAS, M. M. *et al.* O Instituto Biológico e seu acervo documental. Cad. hist. ciênc., v. 5, n. 1, jun 2009.

RECIFE, A. D. D. H. N. Desenvolvimento Humano no Recife - atlas municipal. Recife: ESM Consultoria, 2005.

REGIS, L. *et al.* Integrated control of the filariasis vector with community participation in an urban area of Recife, Pernambuco, Brazil. Cad Saude Publica, v. 12, n. 4, p. 473-482, Oct 1996.

\_\_\_\_\_. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 103, n. 1, p. 50-59, Feb 2008.

REUTER, M.; KELLER, L. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. Mol Biol Evol, v. 20, n. 5, p. 748-753, May 2003.

ROS, V. I. *et al.* How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). Appl Environ Microbiol, v. 75, n. 4, p. 1036-1043, Feb 2009.

RUANG-AREERATE, T. *et al.* Molecular phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on *wsp* gene sequences. J Med Entomol, v. 40, n. 1, p. 1-5, Jan 2003.

SCOLA, B. *et al.* *Wolbachia* Hertig 1936, 472 AL. In: BRENNER, D. J. *et al* (Ed.). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Springer, 2005. p. 138-143.

SERBUS, L. R.; SULLIVAN, W. A cellular basis for *Wolbachia* recruitment to the host germline. PLoS Pathog, v. 3, n. 12, p. e190, Dec 2007.

SERUFO, J. C. *et al.* Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 88, n. 3, p. 503-504, Jul-Sep 1993.

SINKINS, S. P. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol, v. 34, n. 7, p. 723-729, Jul 2004.

SINKINS, S. P.; GODFRAY, H. C. Use of *Wolbachia* to drive nuclear transgenes through insect populations. Proc Biol Sci, v. 271, n. 1546, p. 1421-1426, Jul 7 2004.

SINKINS, S. P.; GOULD, F. Gene drive systems for insect disease vectors. Nat Rev Genet, v. 7, n. 6, p. 427-435, Jun 2006.

SLATKO, B. E. *et al.* The *Wolbachia* Genome Consortium. Microb Comp Genomics, v. 4, n. 3, p. 161-165, 1999.

\_\_\_\_\_. The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. Symbiosis, v. 51, n. 1, p. 55-65, Jul 2010.

SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Washington, DC.: Computer program distributed by the Smithsonian University, 1993.

TAYLOR, M. J. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes in the pathogenesis of disease and as a target for control. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 94, n. 6, p. 596-598, Nov/Dec 2000.

THOMPSON, J. D. *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov 1994.

TRAM, U. *et al.* Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. J Cell Sci, v. 119, n. Pt 17, p. 3655-3663, Sep 2006.

VAN MEER, M. M. *et al.* Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. Insect Mol Biol, v. 8, n. 3, p. 399-408, Aug 1999.

VAVRE, F. *et al.* Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. Mol Biol Evol, v. 16, n. 12, p. 1711-1723, Dec 1999.

VOLKMANN, L. *et al.* Antibiotic therapy in murine filariasis (*Litomosoides sigmodontis*): comparative effects of doxycycline and rifampicin on *Wolbachia* and filarial viability. Trop Med Int Health, v. 8, n. 5, p. 392-401, May 2003.

WEILL, M. *et al.* Quantitative polymerase chain reaction to estimate the number of amplified esterase genes in insecticide-resistant mosquitoes. Anal Biochem, v. 285, n. 2, p. 267-270, Oct 15 2000.

WERREN, J. H. Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomol, v. 42, p. 587-609, 1997.

WERREN, J. H. *et al.* *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nat Rev Microbiol, v. 6, n. 10, p. 741-751, Oct 2008.

WERREN, J. H.; BARTOS, J. D. Recombination in *Wolbachia*. Curr Biol, v. 11, n. 6, p. 431-435, Mar 20 2001.

WERREN, J. H. *et al.* Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proc Biol Sci, v. 262, p. 197-204, 1995.

\_\_\_\_\_. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. Proc Biol Sci, v. 261, n. 1360, p. 55-63, Jul 22 1995.

XI, Z. *et al.* Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. Insect Biochem Mol Biol, v. 35, n. 8, p. 903-910, Aug 2005.

\_\_\_\_\_. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. Science, v. 310, n. 5746, p. 326-328, Oct 14 2005.

\_\_\_\_\_. Interspecific transfer of *Wolbachia* into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. Proc Biol Sci, v. 273, n. 1592, p. 1317-1322, Jun 7 2006.

YEN, J. H.; BARR, A. R. The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. J Invertebr Pathol, v. 22, n. 2, p. 242-250, Sep 1973.

YUN, Y. *et al.* *Wolbachia* strains typing in different geographic population spider, *Hylyphantes graminicola* (linyphiidae). Current Microbiology, v. 62, n. 1, p. 139-145, 2011.

ZABALOU, S. *et al.* Natural *Wolbachia* infections in the *Drosophila yakuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the wRi modification. Genetics, v. 167, n. 2, p. 827-834, Jun 2004.

ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 3rd. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996.

ZHOU, W. *et al.* Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proc Biol Sci, v. 265, n. 1395, p. 509-515, Mar 22 1998.

ZOUACHE, K. *et al.* Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. FEMS Microbiol Ecol, v. 75, n. 3, p. 377-389, Mar 2011.

\_\_\_\_\_. Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. PLoS One, v. 4, n. 7, p. e6388, 2009.

**APÊNDICE A- ARTIGO NA FORMA DE COMUNICAÇÃO BREVE**

---

---

## APÊNDICE A- Artigo na forma de comunicação breve aceito pela revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106(6): 773-776, September 2011 773

### High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipientis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil

Alessandra Lima de Albuquerque, Tereza Magalhães, Constância Flávia Junqueira Ayres/†

<sup>1</sup>Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n, 50670-420 Recife, PE, Brasil

*The use of Wolbachia as a tool to control insect vectors has recently been suggested. In this context, studies on the prevalence and diversity of this bacterium in wild populations are relevant. Here, we evaluated the diversity of two Wolbachia genes (ftsZ and wsp) and the prevalence of this endosymbiont in wild Aedes albopictus. Using semi-nested polymerase chain reaction, our results showed that 99.3% of the individuals were superinfected with Wolbachia. In regards to genetic diversity, the two genes showed no variation within or among mosquito populations. An analysis of other Wolbachia markers may help to clarify the relationship between insect and endosymbiont.*

Key words: endosymbiont - mosquito control - semi-nested PCR

*Wolbachia pipientis* is an intracellular bacterium belonging to the Anaplasmataceae family (Scola et al. 2005) that infects a broad range of insects in which infection rates vary from 16-66% of the species screened (Hilgenboecker et al. 2008). Part of the success of the prevalence of *Wolbachia* in these organisms may be explained by the mode of dispersion. *Wolbachia* are spread through the manipulation of reproductive processes in arthropods, with cytoplasmic incompatibility (CI) as the most common phenotype. CI occurs when non-infected females cannot produce offspring when they mate with *Wolbachia*-infected males, thereby privileging *Wolbachia*-infected females as these will produce offspring when mating with infected males (Hoffmann 2005).

A majority of insects harbour one of the two clades (or supergroups) of *W. pipientis*, A or B, which are found exclusively in arthropods (Werren et al. 2008). However, multiple infections have been observed in a variety of insect species, including *Aedes albopictus*, thus making the CI process more complex as individuals infected with different *Wolbachia* strains are not compatible for mating (Sinkins 2004).

Superinfection, defined by infection with two or more *Wolbachia* strains, allows genetic exchange to occur among supergroups, thereby increasing bacteria diversity (Werren et al. 1995, Jiggins et al. 2001). Recombination events in *W. pipientis* permit the use of these bacteria as a tool to genetically manipulate insect populations by introducing genes of interest into the *W. pipientis* genome (Werren & Bartos 2001).

For these reasons, the use of *Wolbachia* as a tool for driving genes has become a subject of interest among the scientific community, considering its potential application

to control agricultural pests and insect vectors (Bourtzis 2008). Other control strategies include the utilisation of *Wolbachia* strains that shorten insect longevity (wMelPop) (Moreira et al. 2009). Field trials to release *Aedes aegypti* infected with wMelPop *Wolbachia* strain are scheduled for 2011 in Australia (Popovici et al. 2010).

*A. albopictus* is among the medical important mosquitoes that are naturally infected with *Wolbachia* (Zhou et al. 1998). Although *A. albopictus* has not been associated with dengue epidemics in Brazil, larvae naturally infected with dengue virus have been found in the state of Minas Gerais (MG) (Serufo et al. 1993). Moreover, this mosquito has been considered the main vector in dengue epidemics in Japan, Indonesia, Seychelles, Thailand, Malaysia (Hawley 1988) and Hawaii (Effler et al. 2005).

In the present study, the prevalence and diversity of *W. pipientis* in wild *A. albopictus* from Brazil were studied through the analysis of two single copies *W. pipientis* chromosomal genes, *ftsZ* and *wsp* (Werren et al. 1995, Braig et al. 1998). *ftsZ* is a cell cycle gene involved in the regulation of cell division (Werren et al. 1995). *wsp* codes for a major *Wolbachia* surface protein (Braig et al. 1998) and is considered a quickly evolving gene (Zhou et al. 1998). The maximum divergence of *wsp* sequences among strains that infect distinct insect taxa is 16% for supergroup A, 23% for supergroup B and 23% between A-B (Zhou et al. 1998, Van Meer et al. 1999); *ftsZ* diverged 3%, 6% and 15% for strains A, B and between A-B, respectively (Werren et al. 1995). We did not find any bibliography on *ftsZ* and *wsp* diversity among *A. albopictus* within the same population (intrapopulation analysis).

Previous analysis of *ftsZ* and *wsp* suggest that recombination events are common features for *Wolbachia* evolution and that superinfection plays an important role in recombination. However, nothing is known about the coinfection rate necessary for recombination (Werren & Bartos 2001, Jiggins 2002, Baldo et al. 2006). If *Wolbachia* is to be used for vector population control through CI, the identification of potentially new strains within the same supergroup is important as these strains may also cause CI.

Financial support: CNPq, FACEPE (APQ 1361-4.00/08)

+ Corresponding author: tans@cpqam.fiocruz.br

Received 23 February 2011

Accepted 9 August 2011

Considering the interest of using *Wolbachia* as a genetic drive tool or as a controlling agent of insect vectors, information about its prevalence and/or diversity in natural insect populations is extremely relevant, nevertheless it is scarce. In this study, the prevalence and diversity of two *Wolbachia* genes in *A. albopictus* from Northeast Brazil were analysed.

To analyse the prevalence of *W. pipientis* in *A. albopictus*, 150 mosquitoes from three neighbourhoods (Dois Irmãos, Engenho do Meio and Morro da Conceição) of Recife, state of Pernambuco (PE), Brazil, were assayed. These mosquitoes were obtained from eggs collected through installed ovitraps similar to the model developed by Fay and Perry (1965). Eggs were hatched and larvae were maintained until the adult phase in the insectary of the Department of Entomology at Aggeu Magalhães Research Centre-Oswaldo Cruz Foundation. Adult mosquitoes were separated by sex and total DNA was individually extracted according to the protocol described by Ayres et al. (2002).

For the analysis of *W. pipientis* diversity, 20 mosquitoes from each of the above mentioned neighbourhoods and samples from the Culicidae DNA bank of the Department of Entomology were used. Samples from the DNA bank consisted of four individuals from other neighbourhoods of Recife (Parnamirim, Casa Forte and Dois Unidos), eight individuals from other cities of PE (Olinda, Zona Rural and Bultrins neighbourhood; Moreno, Cohab and Bonança), and a Lab strain representative of Moreno neighbourhood. In order to check if different *A. albopictus* populations harboured different *Wolbachia* strains, mosquitoes from other states (also obtained from the Culicidae DNA bank) were also included in the analysis: two individuals from Rio de Janeiro (city of Rio de Janeiro, Manguinhos and Jacarepaguá neighbourhoods) and one from MG (city of Passos).

Initially, diagnosis of *W. pipientis* infection in the 150 *A. albopictus* individuals was performed through standard polymerase chain reaction (PCR) using primers that amplify a fragment of 432 bp of the *ftsZ* gene (*W. pipientis* supergroup-specific), as described by Baldo et al. (2006). As a positive control, DNA from an individual mosquito previously diagnosed with *W. pipientis* A and B supergroups was utilised. As a negative control, no DNA was added to the PCR reaction. Samples that were negative for *W. pipientis* were assayed in a second PCR reaction with primers that amplify a region of 122 bp of the ribosomal gene *rpl8* (Lan & Fallon 1992). This was used as an endogenous control to check if the negative result was due to a lack of or poor quality DNA, or to the absence of *W. pipientis*. Samples that were not amplified by the *rpl8* primers were excluded from analysis.

In order to increase the sensitivity of *Wolbachia* detection, the samples that were negative by standard PCR (except the *rpl8* negatives) and infected samples that were diagnosed with only one strain of *Wolbachia* were further analysed by semi-nested PCR assays. The general *Wolbachia*-specific primers, *wsp81F* and *wsp691R* (618–632 bp), were used in the first PCR and 0.5 µL of the PCR product was used in the second PCR (semi-nested PCR) utilising the primers *wsp136F* and *wsp691R* (577 bp) to

detect supergroup A and *wsp81F* and *wsp522R* (449 bp) to detect supergroup B. These primers have been previously described according to *Wolbachia* classification to discriminate supergroups A and B (Zhou et al. 1998).

Samples utilised for *W. pipientis* genetic diversity analysis (cited above) had been previously diagnosed with both *W. pipientis* strains (A and B). Diversity was assessed by analysing fragments of *ftsZ* and *wsp* genes. Primers for *ftsZ* and *wsp* were described above. PCR products were purified by GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) then sequenced from both directions. Bioinformatics analyses were performed through CodonCode Aligner version 3.6.1 (to form contigs and to exclude poor quality sequences) and BioEdit/ClustalW (Hall 1999) for multiple alignment and manual editing. Sequence identity was confirmed by Blast search.

For comparative analysis of *Wolbachia* infection among populations, chi-square analyses were performed in addition to Fisher's exact tests. In all cases, 5% was considered a significant level. The software programs utilised were Excel 2000 and R v2.10.0. (Zar 1996).

This is the first published study to investigate *Wolbachia* prevalence and its genetic diversity in mosquitoes from Brazil. Out of the 150 *A. albopictus* tested, seven were excluded from analysis as the *rpl8* gene (endogenous control) was not amplified. Of the remaining 143 samples screened through standard PCR, 91.61% were PCR positive for *Wolbachia* and 67.13% (96/143) were superinfected with both strains [37.9% of males (48/58) and 87.1% of females (83/85)]. There was a significant difference between the percentages of infected males versus females; 82.76% of males and 97.65% of females were infected ( $p = 0.0043$ ).

The detection of an unexpected number of negative samples or individuals harbouring only one *Wolbachia* strain in our study, in both males and females, led us to use a second method to confirm this observation. In a study conducted in *A. albopictus* by Kittayapong et al. (2002a), the confirmation of *Wolbachia* infection status was carried out by a PCR screen of F1 from field collected females. However, two facts raised issues about the F1 screening method: (i) males do not transmit the bacteria to the next generation, thus *Wolbachia* prevalence in males cannot be performed through this method and (ii) females may present imperfect maternal transmission and only pass a single strain to their offspring, as shown by Kittayapong et al. (2002b). Thus, the *Wolbachia* infection data shown in the present study were initially obtained by traditional PCR and then through semi-nested PCR of negative samples and those diagnosed with a single strain. We were not able to compare the prevalence rate in males found here to other studies as no literature on the frequency of *Wolbachia* in males was found.

According to Berticat et al. (2002), *Wolbachia* density may vary between females and males, with a lower density in males. If this was true for samples analysed here, it may partially explain the lower superinfection rate in males by standard PCR as there is a DNA threshold in the template to allow amplification by PCR in comparison to nested or long PCR (Dutton & Sinkins 2004), i.e., if the amount of DNA is too low in a sample,

there may be no amplification, leading to a false negative result. *Wolbachia* density could also be influenced by environmental changes. Previous studies showed that changes, such as a long exposure to organophosphates (which can affect fitness cost), may interfere with *Wolbachia* density (Berticat et al. 2002).

When these samples were re-examined by semi-nested PCR, the values of *Wolbachia* prevalence changed in all cases. For instance, 99.3% of the 143 individuals were superinfected with both *Wolbachia* strains, differing significantly from the 67.13% obtained by standard PCR ( $p = 0.000$ ). Males showed superinfection in 100% of the samples. Using this method, no mosquito was negative for *Wolbachia* (superinfected or with 1 strain) and only one female from Engenho do Meio neighbourhood (1.18%) was diagnosed with only one strain (B). In regards to the relationship between infected males and females, the semi-nested PCR did not show any significant difference ( $p = 1$ ).

Our results showed that 98.82% of *A. albopictus* females were superinfected with *W. pipientis* A and B strains, similar to what was found in *A. albopictus* females from Thailand by Kittayapong et al. (2002b) (97.5%;  $p = 0.7475$ , compared to 98.82% found here) and Kittayapong et al. (2002a) (97.93%;  $p = 0.8728$ , compared to 98.82% found here). The general data obtained with semi-nested PCR is corroborated by studies showing that *Wolbachia* superinfection in *A. albopictus* females is a common and stable event (Kittayapong et al. 2002a, Sinkins 2004). Moreover, the semi-nested PCR-based method seemed to be efficient for surveying *Wolbachia* prevalence and is recommended for further screening of negative individuals that were diagnosed by traditional PCR.

According to the quality criteria of the CodonCode Aligner program (quality value  $\geq 20$ , error probability for the base call  $\leq 1\%$ ), 70 sequences of *ftsZ* A, 65 of *ftsZ* B, 40 of *wsp* A and 71 of *wsp* B genes were chosen for analysis from the 14 *A. albopictus* populations. The results showed there was no variation in the nucleotide sequences among individuals within the same population (intrapopulation) or among different populations (inter-population). The nucleotide sequences of *wsp* and *ftsZ* were 100% identical to those published by Werren et al. (1995), Zhou et al. (1998) and Baldo et al. (2006).

Similar to the results presented here, Armbruster et al. (2003) found no variation when they analysed *wsp* sequences in 18 *A. albopictus* individuals collected in 14 regions distributed throughout the new and old world. However, in the Armbruster et al. (2003) study, the lack of diversity could be the result of the sampling methodology (only 1 individual per locality). On the other hand, Reuter and Keller (2003) observed a high recombination rate of *wsp* among *Formica exsecta* individuals from the same population that was superinfected by five *Wolbachia* strains, of which three may have arisen from homologous recombination. As for the *ftsZ* gene, our findings showed no divergence, while in another study six different sequences were found among 11 populations of the spider *Hylyphantes graminicola* collected from distinct geographic regions (Yun et al. 2010).

Ayres et al. (2002) found high genetic variability and divergence among *A. albopictus* populations from different regions of Brazil. Notwithstanding, the results presented here and in other studies (Armbruster et al. 2003) indicate that *Wolbachia* strains infecting *A. albopictus* are stable and highly conserved, independent of the degree of divergence among mosquito populations. Two hypotheses that may explain the conservation of *ftsZ* and *wsp* in *Wolbachia* infecting *A. albopictus* are: (i) there is probably a lower density of one strain compared to the other (Dutton & Sinkins 2004), thereby decreasing the chances of homologous recombination or (ii) these genes may have a possible role in the CI phenotype, causing a high selective pressure that may inhibit the emergence of new strains. Clearly, these hypotheses must be further studied. In addition, analysis of other *Wolbachia* markers, such as intergenic sites (Petridis & Chatzidimitriou 2011), may help to clarify the symbiotic relationship between these bacteria and their hosts, thereby aiding the development of novel mosquito control strategies.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To PDTIS/Fiocruz, for using its facilities, and to George Tadeu, for his help in analyzing the data.

#### REFERENCES

- Armbruster P, Damsky WE Jr, Giordano R, Birungi J, Munstermann LE, Conn JE 2003. Infection of New and Old-World *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the intracellular parasite *Wolbachia*: implications for host mitochondrial DNA evolution. *J Med Entomol* 40: 356-360.
- Ayres CFJ, Romao TPA, Melo-Santos MAV, Furtado AF 2002. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 871-875.
- Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H, Werren JH 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol* 72: 7098-7110.
- Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu A, Weill M 2002. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proc Biol Sci* 269: 1413-1416.
- Bourtzis K 2008. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol* 627: 104-113.
- Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* 180: 2373-2378.
- Dutton TJ, Sinkins SP 2004. Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Insect Mol Biol* 13: 317-322.
- Effler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, Elm J, Tom T, Reiter P, Rigau-Perez JG, Hayes JM, Mills K, Napier M, Clark GG, Gubler DJ 2005. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. *Emerg Infect Dis* 11: 742-749.
- Fay RW, Perry AS 1965. Laboratory studies of ovipositional preferences hatch of *Aedes aegypti*. *Mosq News* 25: 276-281.
- Jiggins FM 2002. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. *Mol Biol Evol* 19: 1640-1643.
- Jiggins FM, von Der Schulenburg JH, Hurst GD, Majerus ME 2001. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proc Biol Sci* 268: 1423-1427.

776 *Wolbachia* prevalence in *A. albopictus* • Alessandra de Lima Albuquerque et al.

- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hawley WA 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 1 (Suppl. 1): 1-39.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* 281: 215-220.
- Hoffmann AA 2005. Entomology: incompatible mosquitoes. *Nature* 436: 189.
- Kittayapong P, Baimai V, O'Neill SL 2002a. Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg* 66: 108-111.
- Kittayapong P, Baisley KJ, Sharpe RG, Baimai V, O'Neill SL 2002b. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 66: 103-107.
- Lan Q, Fallon AM 1992. Sequence analysis of a mosquito ribosomal protein *rpL8* gene and its upstream regulatory region. *Insect Mol Biol* 1: 71-80.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139: 1268-1278.
- Petridis M, Chatzidimitriou D 2011. Characterization of an intergenic polymorphic site (pp-hC1A\_5) in *Wolbachia pipientis* (wPip). *Mol Ecol Resour* 11: 753-756.
- Popovici J, Moreira LA, Poinssignon A, Iturbe-Ormaetxe I, McNaughton D, O'Neill SL 2010. Assessing key safety concerns of a *Wolbachia*-based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 957-964.
- Reuter M, Keller L 2003. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. *Mol Biol Evol* 20: 748-753.
- Scola B, Bandi C, Raoult D 2005. Genus IV. *Wolbachia* Hertig 1936, 472 AL. In DJ Brenner, NR Krieg, GM Garrity, JT Staley, DR Boone, P Vos, M Goodfellow, FA Rainey, K-H Schleifer (eds.), *Bergey's manual® of systematic bacteriology*, Springer, New York, p. 138-143.
- Serufu JC, de Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, Lemos JR, Oliveira MA, Nogueira RMR, Schatzmayr HG 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 503-504.
- Sinkins SP 2004. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 723-729.
- Van Meer MM, Witteveldt J, Stouthamer R 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol Biol* 8: 399-408.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6: 741-751.
- Werren JH, Bartos JD 2001. Recombination in *Wolbachia*. *Curr Biol* 11: 431-435.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci* 261: 55-63.
- Yun Y, Lei C, Peng Y, Liu F, Chen J, Chen L 2010. *Wolbachia* strains typing in different geographic population spider. *Hylyphantes graminicola* (Linyphiidae). *Curr Microbiol* 62: 139-145.
- Zar JH 1996. *Biostatistical analysis*, 3rd ed., Prentice Hall, New Jersey, 662 pp.
- Zhou W, Rousset F, O'Neil S 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc Biol Sci* 265: 509-515.

**ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

---

---

**ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

**Título do Projeto:** Diversidade genética de *Wolbachia* em populações de culicídeos vetores e em nematódeos filariais

**Pesquisador responsável:** Alessandra Lima de Albuquerque

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/FIOCRUZ

**Data de apresentação ao CEP:** 20/11/2007

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 95/07

**Registro no CAAE:** 0095.0.095.000-07

**PARECER Nº 006/2008**

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 18 de fevereiro de 2011. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 18 de fevereiro de 2008.

  
Aldemy Fernandes Freyre  
Professor  
Vice-Coordenador  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 18/02/2009.