

Tópicos Avançados em Entomologia Molecular

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular

INCT – EM – 2012.



1

CAPÍTULO 19

Uso de *Wolbachia* no Controle Biológico.

Caroline Dantas de Oliveira, Luciano Andrade Moreira.

Centro de Pesquisas René Rachou - FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG 301190-002,
Brasil. E-mail: luciano@cpqrr.fiocruz.br

Copyright: © 2012 [Caroline Dantas de Oliveira, Luciano Andrade Moreira]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações Iniciais.

2

As doenças transmitidas por mosquitos vetores como dengue e malária causam enorme impacto na saúde pública mundial. O controle é predominantemente voltado para a aplicação de inseticidas contra o mosquito adulto como também a utilização de mosquiteiros. No entanto, os métodos atuais de controle muitas vezes não são sustentáveis por longos períodos por causa da resistência aos produtos químicos. Neste sentido, a descoberta e aplicação de métodos alternativos são de extrema importância. Uma nova abordagem para o controle biológico de doenças transmitidas pelos mosquitos tem sido recentemente proposta que utiliza uma bactéria endossimbiótica (*Wolbachia pipientis*), a fim de interferir com a transmissão de patógenos. A importância de se utilizar essa bactéria é que fêmeas infectadas possuem uma vantagem reprodutiva por causa de uma incompatibilidade citoplasmática (IC), o que leva ao aumento de indivíduos infectados. Quando mosquitos *Aedes aegypti* foram transfectados com *Wolbachia* descobriu-se que a presença da bactéria inibia a replicação de patógenos, como os vírus da dengue e da febre Chikungunya e o parasito da malária de aves *Plasmodium gallinaceum*. Atualmente estudos mostram que o *Plasmodium falciparum* (causador da malária humana) também é bloqueado na presença dessa bactéria. Neste capítulo revisamos as possibilidades de utilização desta bactéria endossimbiótica como potencial agente de controle biológico em mosquitos vetores de doenças humanas.

Introdução.

As doenças transmitidas por vetores como malária, leishmaniose e dengue causam grande impacto na mortalidade e morbidade humana, em todo o mundo. Com o aumento do movimento humano devido à facilidade do deslocamento aéreo (Adams e Kapan, 2009) e os efeitos do aquecimento global (Barclay, 2008; Pachauri e Reisinger, 2007) o ressurgimento de patógenos (Gould e Solomon, 2008) como a dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV) estão se tornando uma ameaça crescente (Staples et al., 2009; Ng e Ojcius, 2009). A malária, doença causada por parasitas do gênero *Plasmodium*, é transmitida pela picada do mosquito do gênero *Anopheles*. Meigan é responsável por aproximadamente 800,000 mortes a cada ano com mais de 200 milhões de casos anuais (WHO, 2010).

A Dengue é ultimamente a arbovirose mais importante afetando comunidades em área tropicais e subtropicais de todo o mundo com uma estimativa de cerca de 50 milhões de casos anuais e causando milhares de mortes (WHO, 2009). Uma nova abordagem para o seu controle foi recentemente proposta que tem como alvo a longevidade do mosquito ao invés de sua abundância, através da introdução de uma cepa da bactéria *Wolbachia pipientis* Hertig e Wolbach, que causa redução na sobrevivência, na população de *Aedes aegypti* Linnaeus (Cook et al., 2008; Brownstein et al., 2003; Sinkins e O'Neill 2000; Rasgon et al., 2003). Como o período de incubação extrínseca de viroses e parasitos dentro do mosquito *A. aegypti* é longo (cerca de 15 dias), em comparação com a longevidade do inseto (cerca de 30 dias no campo), a infecção por *Wolbachia* pode causar a redução da longevidade poderá diminuir a transmissão por patógenos sem eliminar a população de mosquitos (Brownstein et al., 2003; Rasgon et al., 2003; Sinkins e O'Neill, 2000). A introdução com sucesso da cepa wMelPop-CLA de *Wolbachia* originária de

Drosophila melanogaster Meigen em *A. aegypti* foi recentemente obtida (McMeniman et al., 2009). Mosquitos contendo essa cepa de *Wolbachia* apresentaram cerca de 50% da redução na sobrevivência das fêmeas em comparação com as que não a continham. Além do efeito na longevidade do inseto, uma grande surpresa foi descobrir que a presença da bactéria nos mosquitos aumenta a resistência dos mesmos aos patógenos.

Efeitos Fenotípicos de *Wolbachia* em Insetos Hospedeiros.

Wolbachia são bactérias gram-negativas, obrigatoriamente intracelulares, que manipulam a reprodução do hospedeiro para garantirem a transmissão vertical (de mãe para filhos) (Sinkins et al., 1997). Nas últimas décadas a bactéria *Wolbachia* foi amplamente encontrada infectando diferentes espécies de invertebrados, com maior número de relatos entre os artrópodes como os insetos (Werren et al., 1995, Stouthamer et al., 1999; Jeyaprakash e Hoy, 2000), os aracnídeos (Breeuwer e Jacobs, 1996), os crustáceos (Cordaux et al., 2001; Gotoh et al., 2003) e os isópodes. Além disso, são encontradas em nematóides (Bandi et al., 1998; 2001). O primeiro relato da *Wolbachia* ocorreu nos tecidos reprodutivos de *Culex pipiens* por Hertig e Wolbach em 1924, sendo a espécie denominada *Wolbachia pipientis* (Werren, 1997). Análises estatísticas recentes confirmam a extensa distribuição desta bactéria entre os invertebrados, estimando encontrá-la em 65% das espécies de insetos (Hilgenboecker et al., 2008), o que reafirma estudos que propunham sua infecção de 20 a 70% dos insetos (Jeyaprakash e Hoy, 2000). Um estudo recente relatou que a proporção de *Wolbachia* por espécies de artrópode infectadas pode ser estimada em 40% (Zug e Hammerstein, 2012).

Em uma estratégia para garantir a transmissão vertical, a bactéria manipula seu hospedeiro de diversas formas como feminização, morte de machos, partenogênese e com o mecanismo de incompatibilidade citoplasmática, discutido a seguir.

Incompatibilidade citoplasmática - IC: este é o efeito mais comum causado pela *Wolbachia* na reprodução dos artrópodes. O fenótipo resulta na produção aberrante da progênie originária de linhagens de insetos que hospedam fatores citoplasmáticos diferentes e que irão afetar o movimento dos cromossomos do espermatozóide logo após a fertilização. Tipicamente, os cromossomos paternos são eliminados, levando à formação de embriões haplóides. Em ovos de cruzamentos incompatíveis, somente o pró-núcleo feminino forma cromossomos individuais e procede à primeira divisão. O pró-núcleo paterno, que aparece na forma de uma massa de cromatina tende a se fragmentar durante a primeira divisão mitótica. O efeito da IC nos cruzamentos é normalmente unidirecional: o cruzamento incompatível ocorre entre machos infectados e fêmeas não-infectadas, enquanto que cruzamentos recíprocos entre machos livres da bactéria e fêmeas positivas produzem progênie normal (Figura 1). Entretanto, há relatos de incompatibilidade bidirecional quando espécies de insetos (geralmente em mosquitos e *Drosophila*) hospedam mais de uma cepa da bactéria (Yen e Barr, 1971; Stouthamer et al., 1999).

Feminização: a indução da feminização por *Wolbachia* foi primeiramente descrita em isópodes (pequenos crustáceos) e mais recentemente relatada em outros insetos (Werren et al., 2008). Diversos são os mecanismos envolvidos, sendo que em várias

espécies de isópodes da subordem Oniscidea, a *Wolbachia* tem sido mostrada infectando a glândula androgênica, levando à sua hipertrofia e perda de função. Consequentemente, os machos genéticos desenvolvem-se como fêmeas. Na espécie *Armadillidium vulgare* Latreille (“tatu-bolinha”) normalmente os indivíduos desenvolvem-se como fêmeas caso sofram masculinização pela ação da glândula androgênica (que produz o hormônio responsável pela diferenciação dos machos). Mas se a *Wolbachia* for herdada da mãe, ela irá impedir a formação daquela glândula promovendo a produção de fêmeas. Além disso, se a bactéria for injetada em machos adultos ocorre formação de intersexos, mostrando que a *Wolbachia* afeta a resposta do hospedeiro ao hormônio (Juchault e Legrand, 1985).

Morte de machos: Esse fenótipo não é tão comum em hospedeiros de *Wolbachia*, embora tendo sido relatado nas ordens Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Pseudoscorpiones. A morte de machos ocorre mais frequentemente durante a embriogênese, o que pode resultar em mais alimento para a progênie fêmea. Na mariposa *Ostrinia scapulalis* Walker, onde ocorre feminização, se as mães forem tratadas com tetraciclina, para remover a *Wolbachia*, os machos aparecem na progênie. Interessantemente, sem *Wolbachia*, as fêmeas genéticas morrem durante o desenvolvimento larvário, enquanto na presença da bactéria, os machos se tornam feminizados e morrem durante o desenvolvimento larval (Werren et al., 2008). Esse mecanismo é de grande importância na ecologia de outra espécie de borboleta, a *Hypolimnas bolina* Linnaeus, encontrada nas ilhas do Pacífico, onde em alguns locais essa espécie pode até mesmo ser extinta (Duploux et al., 2010).

Partenogênese: A partenogênese (crescimento e desenvolvimento de embriões sem a fertilização pelos machos) pode ser induzida pela *Wolbachia*, normalmente em espécies em que machos são produzidos a partir de óvulos não fertilizados. Exemplos ocorrem em ácaros, himenópteros (vespas) e thisanópteros (trips). Ao invés de produzirem filhos dos óvulos não fecundados, as fêmeas infectadas com *Wolbachia* produzem filhas, que ao contrário dos machos, irão passar a bactéria para a progênie. Como na IC, a partenogênese é causada pela interrupção do ciclo celular durante o estágio inicial do embrião, resultando no desenvolvimento diplóide em óvulos não fertilizados (Werren et al., 2008).

Pode acontecer ainda que vários fenótipos estejam presentes em um mesmo hospedeiro, como por exemplo, a IC combinada com qualquer outro fenótipo relacionado acima. A importância disso na aplicação prática é que indivíduos com a bactéria tendem a ter maior vantagem reprodutiva e, com isso, rapidamente invadem a população selvagem.

Transfecção de *Wolbachia* em *Aedes aegypti*.

O sucesso da transfecção de *Wolbachia* entre as espécies de insetos em diferentes taxa é dependente da capacidade de adaptação da bactéria a novos ambientes intracelulares (Braig et al., 1994; Xi et al., 2005a). Um exemplo disso foi a transfecção em espécies do mesmo gênero obtido com a cepa de *wAlbB* presente em *Aedes albopictus* Skuse que foi estabelecida com êxito em *A. aegypti* utilizando a transferência citoplasmática de embriões (Xi et al., 2005b). No entanto, a transferência de cepas de *Wolbachia* de outros grupos de insetos parece obedecer a uma linha de adaptação celular do mosquito, podendo ser considerado como ponto crítico para o sucesso da transfecção. Desta forma, a fim de facilitar a transferência

da *Wolbachia* de moscas das frutas *D. melanogaster* para células de *A. aegypti*, a cepa wMelPop primeiramente foi transferida para uma linhagem de células do mosquito para permitir a adaptação ao ambiente intracelular (McMeniman et al., 2008). Após a passagem seriada contínua em cultura de células do mosquito por mais de três anos, a linhagem celular do mosquito tornou-se adaptada à cepa de *Wolbachia*

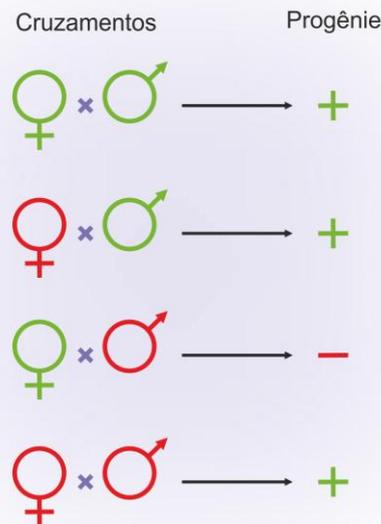


Figura 1. Mecanismo da Incompatibilidade Citoplasmática (IC). Fêmeas infectadas com *Wolbachia* produzirão maior número de progênie viável, aumentando o número de indivíduos infectados na população. Cruzamentos de machos *Wolbachia*-positivos, com fêmeas não infectadas, não produzem progênie viável

wMelPop-CLA, que por sua vez posteriormente foi introduzida de forma estável em *A. aegypti* por meio de microinjeção de embriões (McMeniman et al., 2009). Duas linhagens infectadas por *Wolbachia* foram geradas após um período experimental de seleção nas gerações iniciais e ambas as linhagens permaneceram altamente infectadas desde então. Em experimentos em laboratório utilizando *A. aegypti* infectados com wMelPop-CLA foi demonstrado que a bactéria reduziu cerca de 50% no tempo de vida dos adultos (McMeniman et al., 2009; Yeap et al., 2011). Essa redução na expectativa de vida das fêmeas de *A. aegypti* pode acarretar em uma diminuição significativa na transmissão do vírus dengue pelo mosquito, caso essa capacidade de diminuir a vida em condições de laboratório possa ser reproduzida em condições de campo.

A idade do mosquito é um fator crítico para a transmissão de patógenos (Dye, 1992), pois eles passam por um período de incubação extrínseco (PIE) dentro do mosquito. O PIE é o tempo necessário a partir da ingestão do patógeno até que seja transmitido ao hospedeiro vertebrado seguinte. Os parasitas da malária do gênero

Plasmodium, por exemplo, têm um longo PIE (11-21 dias), e desta forma, qualquer redução na idade do mosquito diminuiria significativamente a capacidade vetorial de mosquitos *Anopheles*. Atualmente, para malária, as estratégias mais eficazes de controle de vetores incluem aplicações de inseticidas residuais de interiores e a implementação de mosquiteiros impregnados com inseticida para ajudar a reduzir as taxas de sobrevivência diária dos mosquitos *Anopheles* (Enayati e Hemingway, 2010). Isso é primordial, pois a sua redução leva a um declínio aproximadamente exponencial na intensidade de transmissão nas áreas consideradas endêmicas (Bellan, 2010). Logo, diminuir a longevidade do mosquito utilizando cepas de *Wolbachia* em *Anopheles* causaria um impacto significativo na transmissão da malária.

Influência da *Wolbachia* na Capacidade Vetorial dos Insetos.

Estudos recentes em *Drosophila* mostraram que a infecção com *Wolbachia* pode proteger as moscas da infecção com vírus de RNA (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). As cepas de *Wolbachia* wMelCS e wMelPop que infectam *D. melanogaster* causaram redução na mortalidade das moscas quando foram infectadas com vários vírus patogênicos entre eles o vírus C de *Drosophila*, o vírus Flock House (FHV) e o vírus de paralisia de gafanhotos (*Cricket paralysis virus*).

Como a cepa wMelPop de *Wolbachia* promoveu proteção contra vírus RNA em *Drosophila*, era importante saber como a cepa wMelPop-CLA, que foi introduzida no mosquito *A. aegypti* (McMeniman et al., 2009), influenciaria a competência vetorial dos mosquitos. Para isso, mosquitos infectados e não-infectados com *Wolbachia* foram expostos aos vírus dengue e ao Chikungunya. Os mesmos mosquitos foram também testados com o parasito de malária aviária, *Plasmodium gallinaceum* Brumpt. Os resultados mostraram que a presença da bactéria no mosquito causou uma drástica redução tanto na presença como no desenvolvimento dos três diferentes patógenos, abrindo um novo campo de possibilidade de controle destas doenças (Moreira et al., 2009). Mais recentemente foi demonstrado que a bactéria (wMelPop-CLA) também fornece proteção contra nematóides que causam filariose (Kambris et al., 2009), sugerindo que algumas cepas de *Wolbachia* possam inibir uma ampla gama de patógenos humanos.

Como a interferência viral não é onipresente entre as cepas de *Wolbachia* (Moreira et al., 2009; Osborne et al., 2009) os mecanismos por trás da habilidade da bactéria para oferecer resistência contra patógenos são desconhecidos. Embora os genes imuno-efetores tenham a expressão aumentada em mosquitos *A. aegypti* infectados com wMelPop-CLA os principais componentes das vias de sinalização (Toll, IMD e Jak-STAT) não parecem ser transcricionalmente modulados por *Wolbachia* (Moreira et al., 2009; Kambris et al., 2010). Estudos anteriores também revelaram que alguns genes das vias IMD e Jak-STAT envolvidos no controle da infecção por vírus de RNA em insetos (Huszar e Imler, 2008) são regulados diferencialmente em *A. aegypti* infectados com dengue (Xi et al., 2008).

A capacidade da cepa wMelPop-CLA para proporcionar proteção contra vírus da dengue pode também ser dependente da competição celular de componentes essenciais do hospedeiro, como foi observado em infecção com DENV-2 em células de mosquitos infectados com wMelPop-CLA (Moreira et al. 2009). Além disso, em *D. melanogaster* existem evidências que cepas de *Wolbachia* obtêm grande parte da

sua energia através do metabolismo dos aminoácidos (Wu et al., 2004), incluindo a treonina – um aminoácido requerido na ativação da expressão da vitelogenina (Vg) em *A. aegypti* (Attardo et al., 2006). Recentemente McMeniman et al., (2011) levantaram a hipótese da existência de uma competição entre a *Wolbachia* wMelPop e *A. aegypti* para a obtenção de treonina necessária para expressão da Vg e subsequente inibição no desenvolvimento dos ovos. Alternativamente, sabe-se que os insetos também precisam obter colesterol e outros ácidos graxos através da dieta (Blitzer et al., 2005) e, como a própria *Wolbachia* e outras bactérias não realizam a biossíntese de colesterol, devem obtê-lo do inseto hospedeiro (Lin e Rikihisa, 2003; Wu et al., 2004). O colesterol é conhecido por ser um ácido graxo-chave necessário para o sucesso da replicação de *Flavivirus* e que deve ser obtido a partir da célula hospedeira (Lu et al., 1999; Mackenzie et al., 2007). Da mesma forma o *Plasmodium* também depende de lipídios do mosquito (Atella et al., 2009), sugerindo que o colesterol pode ser um nutriente crítico exigido por ambos, pela *Wolbachia* e pelo patógeno no mosquito.

A distribuição da *Wolbachia* nos diferentes tecidos do mosquito, bem como a densidade da mesma nas células dos insetos hospedeiros pode ser um fator importante de determinação na capacidade da bactéria interferir com os patógenos. Cepas de *Wolbachia* que fornecem proteção em *Drosophila simulans* Sturtevant estão intimamente relacionadas com a cepa wMelPop em *D. melanogaster* e são encontradas, comparativamente, em altas densidades em moscas (Osborne et al., 2009). A cepa não virulenta wMel, também de *Drosophila*, que apesar de estar presente em densidades bem inferiores que a wMelPop oferece proteção significativa contra o DENV-2 em mosquitos *A. aegypti* transfectados, resultando em um bloqueio total da transmissão de dengue em condições experimentais (Walker et al., 2011).

Curiosamente, as cepas de *Wolbachia*, que naturalmente residem em mosquitos, têm capacidade muito limitada para proteção contra os vírus. Mosquitos *A. albopictus* infectados com as cepas de *Wolbachia* não virulentas wAlbA e wAlbB (Sinkins et al., 1995) ainda são capazes de transmitir o vírus dengue (Kyle e Harris, 2008). Da mesma forma, os mosquitos *Armigeres subalbatus* Coquillett infectados com outra cepa de *Wolbachia*, não apresentou nenhuma evidência de interferência com o vírus da encefalite japonesa (Tsai et al., 2006). Já em mosquitos *Aedes fluviatilis* Lutz naturalmente infectados com a cepa wFlu, apesar de serem vetores competentes de *P. gallinaceum* em laboratório, não apresentam, aparentemente, nenhum efeito de interferência no desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito (Baton et al., em preparação). Isso pode ser explicado pelo fato da cepa wFlu ter um tropismo tecidual muito restrito no mosquito hospedeiro (Moreira et al., 2009). Recentemente, a cepa de *Wolbachia* wPip nativa de *Culex quinquefasciatus* Say, mostrou ter algum efeito protetor contra o vírus do Nilo Ocidental (Glaser e Meola, 2010). No entanto, este efeito foi muito menos pronunciado quando comparado com os efeitos sobre o vírus da dengue para *A. aegypti* transfectados (Moreira et al., 2009). De uma maneira geral, parece que a capacidade de *Wolbachia* para gerar interferências em patógenos é provavelmente restrita a cepas que crescem em altas densidades e têm um alto tropismo tecidual no inseto hospedeiro (Dobson et al., 1999; McGraw et al., 2001).

Transfecção de *Wolbachia* em mosquitos *Anopheles*.

8

A *Wolbachia* está presente naturalmente em diversos gêneros de mosquitos, incluindo *Aedes* Meigen, *Culex* Linnaeus, *Mansonia* Blanchard e *Coquillettidia* Dyar (Dean e Dobson, 2004; Kittayapong et al., 2000; Ricci et al., 2002) mas ainda não há relatos na literatura de Infecções naturais em nenhuma espécie do gênero *Anopheles* (Curtis e Sinkins, 1998; Kittayapong et al., 2000; Ricci et al., 2002; Slotman et al., 2005; Tsai et al., 2004). Vários laboratórios no mundo vêm tentando introduzir de maneira estável a *Wolbachia* em embriões de *Anopheles*, mas ainda sem sucesso. Isso pode ser devido ao fato dos embriões de anofelinos serem muito mais sensíveis ao processo de microinjeção, o que já foi discutido e observado em transformações gênicas de representantes deste gênero (Lobo et al., 2006).

O uso de *Wolbachia* para controlar a malária vai exigir uma infecção estável e que seja transmitida verticalmente à prole, como ocorre com cepas de *Wolbachia* transfectadas em mosquitos *A. aegypti* (McMeniman et al., 2009). A natureza desafiadora da microinjeção em mosquito tem impedido o progresso na transferência de *Wolbachia* entre outras espécies de mosquito. Isso porque a transferência de *Wolbachia* para embriões de mosquito é intrinsecamente mais difícil do que em *Drosophila*, uma vez que os mesmos são menos propícios à inoculação, especialmente os de *Anopheles*. Isso porque alguns fatores como a idade do mosquito no momento da injeção e o nível de dessecação são particularmente críticos para a microinjeção e sobrevivência dos embriões de anofelinos.

As cepas de *Wolbachia* podem ser mantidas in vitro em linhagens de células imunocompetentes de *Anopheles gambiae* (McMeniman et al., 2008; Rasgon et al., 2006) sugerindo que não há mecanismo genético intrínseco que previna a infecção de células *Anopheles* com *Wolbachia*. Além disso, quando a cepa wMelPop foi injetada na hemolinfa das fêmeas adultas de *Anopheles gambiae*, as bactérias foram capazes de sobreviver e se reproduzirem em tecidos somáticos (Jin et al., 2009). No entanto, a infecção não estava presente no tecido germinativo (ovários). A razão pela qual nenhuma cepa de *Wolbachia* infecta naturalmente espécies do gênero *Anopheles*, e nem forma infecções estáveis, é desconhecida. A capacidade de gerar infecções somáticas através da injeção de mosquitos adultos (Jin et al., 2009; Kambris et al., 2010) sugere a possibilidade de que a *Wolbachia* pode ser incapaz de colonizar o tecido germinativo (ovários).

Uma transfecção bem sucedida requer a infecção de células germinativas presentes na fase pré-blastodérmica do desenvolvimento embrionário. A transmissão materna de *Wolbachia* para a progênie é dependente da produção das infecções nos ovários das fêmeas adultas. Em última análise, essa barreira de infecção das células germinativas deve ser superada para estabelecer linhagens de células estáveis que poderão ser utilizadas nas estratégias de controle da malária.

Efeito da *Wolbachia* em *Plasmodium*.

Mosquitos do gênero *Anopheles* embora não naturalmente infectados, são passíveis de infecção por *Wolbachia*, tanto in vitro (Rasgon et al., 2006) quanto em tecidos somáticos do mosquito (Jin et al., 2009), e esses resultados podem destacar a capacidade da bactéria para reduzir significativamente os níveis de parasitas da malária. Vários estudos apresentam evidências de que a bactéria provavelmente forneça alguma proteção contra o *Plasmodium*. O efeito da wMelPop-CLA em *P. gallinaceum* foi testado em *A. aegypti* em laboratório. A carga de oocistos do *P. gallinaceum* foi reduzida para 67-88% em mosquitos *A. aegypti* infectados com wMelPop-CLA, em comparação com não infectados por *Wolbachia* sete dias após o repasto sanguíneo (Moreira et al., 2009). Em fêmeas de *A. gambiae* transientemente infectadas com wMelPop apresentaram redução de 75-84% nos níveis de infecção com *Plasmodium berghei* (Kambris et al., 2010). Mais recentemente, Hughes et al (2011) mostraram que existiu uma dinâmica da infecção entre duas linhagens divergentes de *Wolbachia* (wMelPop e wAlbB) em *A. gambiae* infectados por *P. falciparum* observando um encurtamento da vida do mosquito após o repasto sanguíneo e uma redução de 40-60% no desenvolvimento do oocisto do parasita no mosquito. Os resultados sugeriram que *A. gambiae* infectado com *Wolbachia* pode ter redução da capacidade para manter a transmissão de *Plasmodium* por múltiplos mecanismos dependentes da densidade cepa da bactéria.

Considerações Finais.

Há mais de uma década foi proposta a utilização de *Wolbachia* como um método de espalhar um gene de interesse em populações de campo. A ideia inicial era transformar a bactéria colocando-se, por exemplo, um gene de refratariedade e, por efeito da IC a bactéria invadiria a população selvagem, levando consigo o gene de interesse (Curtis e Sinkins, 1998). Entretanto desde então vários laboratórios vem tentando transformar essa bactéria sem nenhum sucesso.

A descoberta de que certas cepas de *Wolbachia* podem interagir com patógenos, bloqueando o desenvolvimento dos mesmos nos mosquitos vetores mudou o enfoque das estratégias de uso dessa bactéria. Nesse caso apenas a transfecção dos mosquitos com as cepas escolhidas poderá trazer grandes conquistas em programas de controle de endemias.

Mosquitos *A. aegypti* infectados com *Wolbachia* já são utilizados em nível de campo para uso no controle de dengue na Austrália e, em breve, serão também utilizados no Vietnã. A experiência australiana mostrou que a bactéria conseguiu se estabelecer no campo em alguns meses após a primeira liberação na natureza, pelo efeito da IC (Walker et al., 2011). Contando que os mosquitos de campo com a bactéria venham também bloquear o vírus da dengue isso trará um grande impacto no controle da doença no mundo.

Tão logo seja possível a transfecção de mosquitos *Anopheles* com a bactéria, trabalhos poderão ser focados para o controle de malária. Mas para isso será necessário a transfecção das diferentes espécies vetoras, dependendo da área

geográfica a ser aplicado, o que seria uma desvantagem em relação ao programa de dengue. Entretanto, isso não pode ser um empecilho para que essa técnica seja testada ao controle dessa importante doença, para a qual ainda não existe vacina e tira tantas vidas.

Referências Bibliográficas.

Adams, B., Kapan D.D., 2009. Man bites mosquito: understanding the contribution of human movement to vector-borne disease dynamics. PLoS One 4, e6763.

Atella, G.C., Bittencourt-Cunha, P.R., Nunes, R.D., Shahabuddin, M., Silva-Neto, M.A., 2009. The major insect lipoprotein is a lipid source to mosquito stages of malaria parasite. Acta Trop. 109, 159-162.

Attardo, G.M., Hansen, I.A., Shiao, S.H., Raikhel, A.S., 2006. Identification of two cationic amino acid transporters required for nutritional signaling during mosquito reproduction. J. Exp. Biol. 209, 3071-8.

Bandi, C., Anderson, C.G., Genchi, C., Blaxter, M.L., 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc. Biol. Sci. 265, 2407- 13.

Bandi, C.; Trees, A.J., Brattig, N.W., 2001. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. Vet. Parasitol. 98, 215-238.

Barclay, E., 2008. Is climate change affecting dengue in the Americas? Lancet 371, 973-4.

Bellan, S.E., 2010. The importance of age dependent mortality and the extrinsic incubation period in models of mosquito-borne disease transmission and control. PLoS One 5, e10165.

Blitzer, E.J., Vyazunova, I., Lan, Q., 2005. Functional analysis of AeSCP-2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Mol. Biol. 14, 301-7.

Braig, R.H., Guzman, H., Tesh, R.B., O'Neill, S.L., 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. Nature 367, 453-455.

Breeuwer, J.A.J., Jacobs, G., 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. Exp. App. Acarol. 20, 421-34.

Brownstein, J.S., Hett, E., O'Neill, S.L., 2003. The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. J. Invertebr. Pathol. 84, 24-29.

Cook, P.E., McMeniman, C.J., O'Neill, S.L., 2008. Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. Adv. Exp. Med. Biol. 627, 126-40.

Cordaux, R., Michel-Salzat, A., Bouchon, D., 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. J. Evol. Biol. 14, 237-243.

- Curtis, C.F., Sinkins, S.P., 1998. *Wolbachia* as a possible means of driving genes into populations. *Parasitology* 116, 111–115.
- Dean, J.L., Dobson, S.L., 2004. Characterization of *Wolbachia* infections and interspecific crosses of *Aedes* (*Stegomyia*) *polynesiensis* and *Ae.* (*Stegomyia*) *riversi* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 41, 894-900.
- Dobson, S.L., Bourtzis, K., Braig, H.R., Jones, B.F., Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S.L., 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29(2):153-60.
- Duploux, A., Hurst, G.D., O'Neill, S.L., Charlat, S., 2010. Rapid spread of male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Hypolimnas bolina*. *J. Evol. Biol.* 23, 231-5.
- Dye, C., 1992. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 1-19.
- Enayati, A., Hemingway, J., 2010. Malaria management: past, present, and future. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 569-591.
- Glaser, R.L., Meola, M.A., 2010. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS One* 5, e11977.
- Gotoh, T., Noda, H., Hong, X.Y., 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity.* 91, 208-216.
- Gould, E.A., Solomon, T., 2008. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371, 500-9.
- Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., Johnson, K.N., 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322, 702.
- Hertig, M., Wolbach, S.B., 1924. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *J. Med. Res.* 44, 329-374.7.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., Werren, J.H., 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? -A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 215-20.
- Hughes, G.L., Koga, R., Xue, P., Fukatsu, T., Rasgon, J.L., 2011. *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog.* 7, e1002043.
- Huszar, T., Imler, J.L., 2008. *Drosophila* viruses and the study of antiviral host-defense. *Adv. Virus Res.* 72, 227-65.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M.A., 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* 9, 393-405.
- Jin, C., Ren, X. Rasgon, J.L., 2009. The virulent *Wolbachia* strain wMelPop efficiently establishes somatic infections in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Appl. Microbiol. Meio Ambiente* 75, 3373-3376.
- Juchault, P., Legrand J.J., 1985. Mechanism of the refractory state of androgen hormone in *Armadillidium vulgare* Latr. (crustacean, isopod, oniscoid) harboring a feminizing bacteria. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 463-7.

- Kambris, Z., Cook, P.E., Phuc, H.K., Sinkins S.P., 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* 326, 134-136.
- Kambris, Z., Blagborough, A.M., Pinto, S.B., Blagrove, M.S., Godfray, H.C., Sinden, R.E., Sinkins, S.P., 2010. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog.* 6, e1001143.
- Kittayapong, P., Baisley, K.J., Baimai, V., O'Neill, S.L., 2000. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 37, 340-5.
- Kyle, J.L., Harris, E., 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 71-92.
- Lin, M., Rikihisa, Y., 2003. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect Immun.* 71, 5324-31.
- Lobo, N.F., Clayton, J.R., Fraser, M.J., Kafatos, F.C., Collins, F.H., 2006. High efficiency germ-line transformation of mosquitoes. *Nat. Protoc.* 1, 1312-7.
- Lu, Y.E., Cassese, T., Kielian, M., 1999. The cholesterol requirement for sindbis virus entry and exit and characterization of a spike protein region involved in cholesterol dependence. *J. Virol.* 73, 4272-8.
- Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Parton, R.G., 2007. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe.* 2, 229-239.
- McGraw, E.A., Merritt, D.J., Droller, J.N., O'Neill, S.L. 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proc Biol Sci.* 268(1485):2565-70.
- McMeniman, C.J., Hughes, G.L., O'Neill, S.L., 2011. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* disrupts mosquito egg development to a greater extent when mosquitoes feed on nonhuman versus human blood. *J. Med. Entomol.* 48, 76-84.
- McMeniman, C.J., Lane, A.M., Fong, A.W., Voronin, D.A, Iturbe-Ormaetxe, I., Yamada, R., McGraw, E.A., O'Neill, S.L., 2008. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6963-9.
- McMeniman, C.J., Lane, R.V., Cass, B. N., Fong, A.W., Sidhu, M., Wang, Y.F., O'Neill, S.L., 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti* *Science* 323, 141-4.
- Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M. Hugo, L.E., Johnson, K.N., Kay, B.H., McGraw, E.A., van den Hurk, A.F., Ryan, P.A., O'Neill, S.L., 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139, 1268-1278.
- Ng, L.F., Ojcius D.M., 2009. Chikungunya Fever - Re-emergence of an Old Disease. *Microbes Infect.* 11, 1163-4.

- Osborne, S.E., Leong, Y.S., O'Neill, S.L., Johnson, K.N., 2009. Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. PLoS Pathog. 5, e1000656.
- Pachauri, R.K., Reisinger, A., 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Core Writing Team. Geneva, Switzerland. pp 104.
- Rasgon, J.L., Ren, X., Petridis, M., 2006. Can *Anopheles gambiae* be infected with *Wolbachia pipientis*? Insights from an in vitro system. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7718–7722.
- Rasgon, J.L., Styer, L.M., Scott, T.W., 2003. *Wolbachia*-induced mortality as a mechanism to modulate pathogen transmission by vector arthropods. J. Med. Entomol. 40, 125-32.
- Ricci, I., Cancrini, G., Gabrielli, S., D'Amelio, S., Favi, G., 2002. Searching for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae): large polymerase chain reaction survey and new identifications. J. Med. Entomol. 39, 562-7.
- Sinkins, S.P., Braig, H.R., O'Neill, S.L., 1995. *Wolbachia* super infections and the expression of cytoplasmic incompatibility. Proc. Biol. Sci. 261, 325-30.
- Sinkins, S.P., Curtis, C.F., O'Neill, S.L., 1997. The potential application of inherited symbiont systems to pest control. In: O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., Werren, J.H. (Eds.). Influential Passengers. Oxford University Press, New York, pp. 155–175.
- Sinkins, S.P., O'Neill, S.L., 2000. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In: Handler, A.M., James A.A. (Eds.), Insect transgenesis: methods and applications. CRC Press., Boca Raton, Florida, pp. 271–288.
- Slotman, M., Della Torre, A., Powell, J.R., 2005. Female sterility in hybrids between *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*, and the causes of Haldane's rule. Evolution 59, 1016-26.
- Staples, J.E., Breiman, R.F., Powers, A.M., 2009. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. Clin. Infect. Dis. 49, 942-8.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J.A., Hurst, G.D., 1999: *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annu. Rev. Microbiol. 53, 71-102.
- Teixeira, L., Ferreira, A., Ashburner, M., 2008. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. PLoS Biol. 6, e2.
- Tsai, K.H., Huang, C.G., Wu, W.J., Chuang, C.K., Lin, C.C., Chen, W.J., 2006. Parallel infection of Japanese encephalitis virus and *Wolbachia* within cells of mosquito salivary glands. J. Med. Entomol. 43, 752-6.
- Tsai, K.H., Lien, J.C., Huang, C.G., Wu, W.J., Chen, W.J., 2004. Molecular (sub) grouping of endosymbiont *Wolbachia* infection among mosquitoes of Taiwan. J. Med. Entomol. 41, 677-83.

- Walker, T., Johnson, P.H., Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F.D., McMeniman, C.J., Leong, Y.S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A.L., Ritchie, S.A., O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A. 2011. The *wMel* *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*. 476(7361):450-3.
- Werren, J.H., 1997. *Biologia da Wolbachia*. *Rev. Entomol. Annu.* 42, 587-609.
- Werren, J.H., Baldo, L., Clark, M.E., 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 741-51.
- Werren, J.H., Zhang, W., Guo, L.R., 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. Biol. Sci.* 261, 55-63.
- WHO, 2009. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever In Fact Sheet, ed. W. H. Organization. Em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- WHO, 2010. World Malaria Report 2010. Em: <http://www.who.int/malaria/publications>
- Wu, M., Sun, L.V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J.C., McGraw, E.A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Madupu, R., Beanan, M.J., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Mohamoud, Y., Lee, P., Berry, K., Young, M.B., Utterback, T., Weidman, J., Nierman, W.C., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Tettelin, H., O'Neill, S.L., Eisen, J.A., 2004. Phylogenomics of the Reproductive Parasite *Wolbachia pipientis wMel*: A Streamlined Genome Overrun by Mobile Genetic Elements. *PLoS Biol.* 2, e69.
- Xi, Z., Dean, J.L., Khoo, C., Dobson, S.L., 2005a. Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 903-910.
- Xi, Z., Khoo, C.C., Dobson, S.L., 2005b. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science* 310, 326-328.
- Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000098.
- Yeap, H.L., Mee, P., Walker, T., Weeks, A.R., O'Neill, S.L., Johnson, P., Ritchie, S.A., Richardson, K.M., Doig, C., Endersby, N.M., Hoffmann, A.A., 2011. Dynamics of the "popcorn" *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. *Genetics* 187, 583-95.
- Yen, J.H., Barr, A.R., 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature* 232, 657-8.
- Zug, R., Hammerstein, P., 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *Plos One* 7(6):e38544.