

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Letícia Amaral Nogueira

**Detecção e dinâmica da infecção da bactéria *Wolbachia*
em mosquitos *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)**

Dissertação de Mestrado

2006

LETÍCIA AMARAL NOGUEIRA

**Detecção e dinâmica da infecção da bactéria *Wolbachia*
em mosquitos *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas - área de concentração Genética - para obtenção do título de Mestre.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Nogueira, Letícia Amaral.

Detecção e dinâmica da infecção da bactéria *Wolbachia* em mosquitos
Aedes albopictus (Díptera: Culicidae) / Letícia Amaral Nogueira. – 2006.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu, 2006.

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Assunto CAPES: 20200005

1. Mosquito - Genética 2. Mosquito como transmissor de
doenças

3. Bactéria

CDD 595.77

CDD 614.098161

Palavras-chave: *Aedes albopictus*; Bacteriófago *WO*; Incompatibilidade
citoplasmática; *Wolbachia*.

Dedico esse trabalho ao meu admirável avô,
Geraldo Toledo Amaral, por todo seu caráter, conduta, e
exemplo que sempre levarei comigo nessa caminhada.

Sempre sua “doutorinha”.

Agradecimientos

Acima de tudo e de todos, à minha Família, assim mesmo com letra maiúscula, como o meu amor e orgulho por vocês. De longe e de perto, de ontem e de hoje, avôs e avós, tios e primos, **todos** têm um singular significado na minha vida e levam um pedaço de mim.

A Deus, pela minha saúde, pelas oportunidades, por minha sorte e felicidade nessa vida. Pela minha amada família e meu querido amor. Tenho tudo o que preciso!

Aos meus pais, José e Dú, pelos ensinamentos, amor e apoio incondicional de sempre. Pelo “paitrocínio” que ajuda bastante a “engordar” a bolsa. Ao meu lindo irmão, Juarez, pela amizade, companhia e pelos churrascos de fim de semana. Ao Tobbinho, por preencher nossa casa de alegria e esquentar meu pé de noite na hora de dormir. A minha cunhadinha, Taís, pela amizade e por compartilhar comigo a paixão pela culinária (qualquer coisa, a gente abre um restaurante!).

Ao meu amor, Diego, por me completar e encher minha vida de sonhos, alegria, sabedoria, e carinho, meu cúmplice de todas as horas. Desde ficar em casa vendo novela até nossas conversas filosóficas sobre a ciência e a vida. Eu te amo!

Ao meu orientador, Paulo, por apostar em minha capacidade e me dar a liberdade para crescer e me desenvolver intelectualmente. Pela amizade e agradáveis momentos com a Débora, o Lucas e o Gustavo (e, quem está por vir!).

Às minhas irmãs de Botucatu, que seguiram outros caminhos, mas sempre se fazem presentes de um jeito ou de outro: Koma, Xebinha, Conguinha, Pisto, Xura e Piry's. O que vivemos juntas é ímpar e insubstituível.

A Vera e ao Sergio pelos momentos especiais, aqui, e em Santos, e pelo carinho e consideração por mim. Pelas deliciosas aventuras gastronômicas no Japa, na Bel, no Tabajara... Além, é claro, por me darem meu maior presente, seu filho.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia Molecular: Lili's, Kari's, Jaymex, Élen, Alberto (Roberto), Neto, Bianca, Leticinha, Sandra, Soneca e Mininão (nossa que laboratório!) pela maravilhosa convivência, troca, aprendizado, e pelos finais de semana cuidando dos meus mosquitinhos no insetário. Jaymex, valeu, pela ajuda fundamental com o *PCR* em tempo real de última hora!

Aos amigos da turma XXXVI e de Santos, que aqui não caberiam, com os quais deixei de conviver, mas que dos meus pensamentos nunca sairão.

A todo o Departamento de Parasitologia da UNESP de Botucatu, funcionários, professores, amigos da "salinha BBB" pelo maravilhoso clima que nos incentiva no dia-a-dia.

Ao prof. Newton, por sua amizade, idéias, sugestões, e por me emprestar suas B.O.D.s para realização dos experimentos biológicos (e agora serão com os mosquitos tratados!).

Ao prof. João Pessoa, por sempre estar disponível e oferecer seu laboratório para realização de nossos trabalhos, inclusive com *PCR* em tempo real.

A todos os mestres que passaram por minha vida e semearam em mim o gosto pelo estudo. Espero um dia corresponder à dedicação de vocês!

À CAPES pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho e minha formação profissional.

“Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre os ramos muito leves, sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas.”

(Victor Hugo)

Resumo

Bactérias do gênero *Wolbachia* constituem um grupo comum de microorganismos obrigatoriamente intracelulares, maternalmente herdados que se encontra em simbiose e amplamente distribuídos nos artrópodes. Preferencialmente instalados nas células do tecido gonadal de mais de um milhão de espécies de insetos, aracnídeos, crustáceos, e em alguns nematódeos, esses parasitas atuam diretamente na manipulação do ciclo reprodutivo de seus hospedeiros causando drásticas desordens, entre elas a incompatibilidade citoplasmática e a indução da partenogênese. Tais alterações garantem a bactéria uma incrível habilidade em se espalhar rapidamente pelas populações. Considerando as relevantes implicações biológicas relacionadas à *Wolbachia* em diversas ordens de insetos, no presente trabalho sua presença foi detectada em mosquitos de grande importância para saúde pública, o *Aedes albopictus*, e sua influência estudada sob vários aspectos da biologia desses insetos. No município de Botucatu, os mosquitos *A. albopictus* se encontram infectados pelas duas linhagens de *Wolbachia*, *wAlbA* e *wAlbB*, perfazendo um total de 45,7% de infecção dos mosquitos analisados. Confirmamos o tropismo da bactéria por tecidos reprodutivos e a ocorrência do fenômeno da incompatibilidade citoplasmática com seus diferentes níveis de penetrância. Constatamos também a existência da associação entre o bacteriófago específico *WO* e a bactéria *Wolbachia*, bem como sua distribuição durante as diferentes formas evolutivas do mosquito.

Abstract

Wolbachia are a common group of obligate intracellular bacteria, maternally inherited, that are found in symbiosis with a great diversity of arthropods. Preferentially harbored in reproductive tissue cells of more than a million arthropods species, (insects, arachnids, and crustacean) and some nematodes, these parasites act manipulating the reproductive cycle of their hosts, leading to drastic disorders such as cytoplasmic incompatibility and parthenogenesis induction. These alterations might confer to *Wolbachia* an unpaired ability to rapidly spread in host populations. Considering the relevant biological implications related to *Wolbachia* infection in insects, in this study we detected the bacteria in a mosquito of medical importance, *Aedes albopictus*, and determined its influence in many aspects of mosquito biology. In Botucatu city we found *A. albopictus* infected by two strains of *Wolbachia*, *wAlbA* and *wAlbB*, in an infection rate of 45,7%. We confirmed *Wolbachia* tropism for reproductive tissues, and the occurrence of cytoplasmic incompatibility with different levels of penetrance. We also observed the association between *Wolbachia* specific bacteriophage (*WO*) and the bacteria, as well as its distribution along the evolutive stages of mosquito.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Eletromicrografia de tecido reprodutivo feminino de <i>Culex pipiens</i> .	19
Figura 2. Exemplos dos possíveis cruzamentos com hospedeiros de <i>Wolbachia</i> .	25
Figura 3. Modelos bioquímicos para o fenômeno da incompatibilidade citoplasmática.	30
Figura 4. Mapa da distribuição global do mosquito <i>A. albopictus</i> (1999).	34
Figura 5. Fotografia de um mosquito fêmea <i>Aedes albopictus</i> ingurgitada de sangue.	35
Figura 6. Ciclo do desenvolvimento biológico de mosquitos <i>Aedes</i> sp mostrando suas diversas fases.	36
Figura 7. Fotografia de uma armadilha de oviposição utilizada na coleta de <i>A. albopictus</i> .	40
Figura 8. Esquema das reações de PCR e <i>semi-nested</i> PCR.	43
Figura 9. Fotografia da câmara de criação de mosquitos (insetário).	48
Figura 10. Fotografia da distinção de adulto macho e fêmea de <i>A. albopictus</i> . A: antena plumosa (macho) e B: antena pilosa (fêmea).	50
Figura 11. Quantificação de DNA extraído pelo método de <i>Extração de DNA de um único mosquito</i> .	61
Figura 12. Quantificação de DNA extraído com o kit <i>Genomic PrepTM Cells and Tissue DNA Isolation</i> (Nucleon).	62
Figura 13. Reação de PCR de amostras de <i>A. albopictus</i> .	63
Figura 14. Reação de <i>semi-nested</i> PCR de amostras de <i>A. albopictus</i>	64
Figura 15. Distribuição tissular da <i>Wolbachia</i> em <i>Aedes albopictus</i> .	66
Figura 16. Frequência sexual observada em <i>A. albopictus</i> com <i>Wolbachia</i> .	69

Figura 17. Gráficos da emergência dos indivíduos adultos, segundo ao sexo, em função do tempo, nas três repetições (E1, E2 e E3).	70
Figura 18. Gráfico da emergência dos indivíduos adultos, segundo ao sexo, em função do tempo na colônia em tratamento na 9 ^a geração.	71
Figura 19. Curva de sobrevivência de adultos, machos (em preto) e fêmeas (em vermelho), em função do tempo.	73
Figura 20. Perfil de fecundidade das diferentes fêmeas da colônia analisadas.	74
Figura 21. Curvas de sobrevivências de adultos, machos (em preto) e fêmeas (em vermelho), em função do tempo segundo condição de criação larval.	77
Figura 22. Fecundidade média das fêmeas crescidas nas três diferentes condições de densidade larval de criadouros.	78
Figura 23. Curvas de sobrevivências de adultos, machos (em preto) e fêmeas (em vermelho), em função do tempo, segundo regime alimentar.	80
Figura 24. Fecundidade média das fêmeas crescidas sob os diferentes regimes alimentares.	81
Figura 25. Quantificação relativa do bacteriófago WO nas diferentes formas evolutivas de <i>A. albopictus</i> expressa em escala logarítmica determinada através do PCR em tempo real.	85
Figura 26. Reação de <i>PCR</i> do fragmento <i>ND4</i> de mosquitos infectados e não-infectados por <i>Wolbachia</i> .	86

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos específicos utilizados na reação do <i>PCR</i> quantitativo em tempo real e o tamanho em pares de base do produto de cada amplificação.	55
Tabela 2. Quadro-resumo dos resultados de infecção por <i>Wolbachia</i> para os mosquitos <i>A. albopictus</i> analisados nas três diferentes ocasiões de coleta.	65
Tabela 3. Tempos médios de desenvolvimento (em dias) das larvas e das pupas e respectivas mortalidades (%), sob diferentes condições de temperatura.	75
Tabela 4. Quantidade de formação de pupas, emersão de adultos e freqüência sexual referente às larvas de diferentes densidades de criadouro.	76
Tabela 5. Quantidade de formação de pupas, emersão de adultos e freqüência sexual referente às larvas submetidas a diferentes regimes alimentares.	79
Tabela 6. Cruzamentos para avaliação da incompatibilidade citoplasmática diante das diferentes linhagens de <i>Wolbachia</i> e sua correlação com o bacteriófago <i>WO</i> .	82

ÍNDICE

Resumo

Abstract

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
1. Introdução	
1.1. <i>Wolbachia</i> – um fascinante grupo de bactérias.....	19
1.2. Incompatibilidade Citoplasmática - fenômeno da esterilização de cruzamentos.....	28
1.3. <i>Aedes albopictus</i> – importante vetor para saúde pública.....	33
2. Objetivos.....	38
3. Material e Métodos	
3.1. Coleta dos mosquitos <i>A. albopictus</i>	40
3.2. Extração de DNA dos mosquitos coletados.....	41
3.3. Reação de <i>PCR</i> para detecção da bactéria <i>Wolbachia</i>	42
3.3.1. Purificação do produto de <i>PCR</i>	45
3.3.2. Reação de sequenciamento do fragmento do gene <i>wsp</i>	45
3.4. Colonização e manutenção dos mosquitos coletados.....	47
3.5. Obtenção de colônia de mosquitos não-infectados por <i>Wolbachia</i>	49
3.6. Ensaio biológico.....	49
3.6.1. Proporção dos sexos.....	50
3.6.2. Taxa de sobrevivência (longevidade).....	51
3.6.3. Fecundidade.....	51
3.6.4. Variações de temperatura.....	51
3.6.5. Condições de criadouro.....	52
3.6.6. Disponibilidade de alimento.....	52
3.7. Associação da bactéria <i>Wolbachia</i> com bacteriófagos <i>WO</i> e correlação com os níveis de incompatibilidade citoplasmática.....	54
3.8. Quantificação do bacteriófago associado à bactéria ao longo dos estágios de vida do mosquito hospedeiro.....	55

3.9. Relação entre condição infectada e DNA mitocondrial dos mosquitos.....	58
4. Resultados	
4.1. Coleta dos mosquitos e extração de DNA.....	61
4.2. Reação de <i>PCR</i> para detecção da bactéria <i>Wolbachia</i>	63
4.3. Colonização e manutenção dos mosquitos infectados.....	66
4.4. Obtenção de colônia não-infectada pela <i>Wolbachia</i>	66
4.5. Ensaio biológicos.....	69
4.5.1. Proporção dos sexos.....	69
4.5.2. Taxa de sobrevivência (longevidade).....	72
4.5.3. Fecundidade.....	74
4.5.4. Variações de temperatura.....	75
4.5.5. Condições de criadouro.....	76
4.5.6. Disponibilidade de alimento.....	79
4.6. Associação da bactéria <i>Wolbachia</i> com bacteriófagos <i>WO</i> e correlação com os níveis de incompatibilidade citoplasmática.....	82
4.7. Quantificação do bacteriófago associado à bactéria ao longo dos estágios de vida do mosquito hospedeiro.....	84
4.8. Relação entre condição infectada e DNA mitocondrial dos mosquitos.....	86
5. Discussão.....	88
6. Conclusões.....	98
7. Referências Bibliográficas.....	101

1. Introdução

1.1. *Wolbachia* - um fascinante grupo de bactérias

Os organismos do gênero *Wolbachia* são membros do filo *Proteobacteria* (da subdivisão α), agrupam-se na ordem *Rickettsiales*, e pertencem à família *Anaplasmataceae* que abrange também os gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, e *Neorickettsia* (Dumbler et al., 2001). São bactérias gram-negativas, ou seja, microorganismos unicelulares que possuem espessa parede celular envolvendo sua membrana citoplasmática. Tal parede é formada por uma única camada de proteoglicanos (conjugado de proteínas e açúcares), caracterizando-a como frágil em contrapartida das gram-positivas, que a possui em diversas camadas desse composto, sendo assim bastante resistentes. Parasitos intracelulares obrigatórios, essas bactérias são encontradas infectando uma diversidade de artrópodes (Werren et al., 1995b) dentre eles: insetos, aracnídeos e crustáceos; e alguns nematódeos (Bazzocchi et al., 2000). Instalando-se principalmente nas células do tecido reprodutivo de seus hospedeiros (**figura 1**), a *Wolbachia* atua diretamente na manipulação dos seus ciclos reprodutivos causando drásticas desordens.

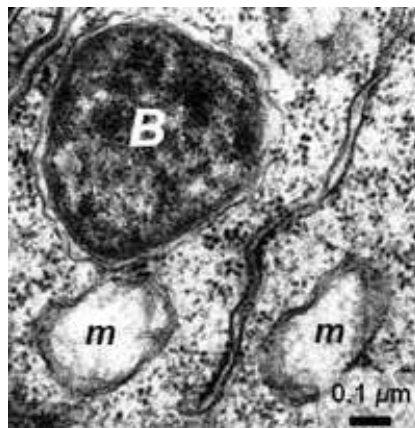


Figura 1. Eletromicrografia de tecido reprodutivo feminino de *Culex pipiens*, em detalhe: B: bactéria *Wolbachia*; m: mitocôndrias.

Em 1924, a bactéria *Wolbachia* foi pela primeira vez detectada em células do tecido reprodutivo (ovários) do mosquito *Culex pipiens* por Hertig & Wolbach e classificada como sendo um tipo de *Rickettsia*. Subseqüentemente, recebeu o nome *Wolbachia pipientis* em homenagem a um dos seus descobridores. Na década de 1950, Ghelelovitch e Laven descobriram dentro do gênero *Culex* que determinados cruzamentos intraespecíficos eram incompatíveis, levando a produção de pouca ou nenhuma progênie. Laven estabeleceu que a incompatibilidade tivesse um padrão de herança citoplasmática e nomeou este fenômeno de incompatibilidade citoplasmática (I.C.). A conexão entre *Wolbachia* e incompatibilidade citoplasmática só foi feita formalmente no início de 1970, quando Yen & Barr estabeleceram que I.C. estivesse associada com a presença do agente riquetsial pela eliminação da *Wolbachia* através do tratamento de fêmeas infectadas com antibiótico.

Ao longo dos 25 anos subseqüentes, novos exemplos de I.C. foram encontrados em uma diversidade de insetos, como exemplos: carunchos (*Tribolium confusum*), parasitas de vespas (*Mormoniella vitripennis*), gafanhotos (*Laodelphax striatellus*), mosquitos (*Aedes scutellaris*), moscas da fruta (*Drosophila melanogaster*), entre outros. Em alguns casos, a presença da bactéria nos ovários ou testículos foi estabelecida microscopicamente e/ou pela cura por antibióticos ou aquecimento. Dois outros achados foram particularmente relevantes para o estudo da *Wolbachia*: primeiro Legrand e colegas (1987) descobriram fatores de herança citoplasmática induzindo feminização em isópodes; segundo, Stouthamer e Kazmer (1994) descobriram que fêmeas partenogênicas de

algumas linhagens de vespas *Trichogramma* poderiam ser “curadas” pelo uso de antibióticos, ou seja, terem a produção revertida para machos.

Contudo, as relações filogenéticas entre as bactérias encontradas no tecido reprodutivo de insetos divergentes eram desconhecidas até o início dos anos 90. Uma maior inovação ocorreu nos últimos anos com a aplicação de métodos de genética molecular para identificar esses microorganismos intracelulares. Estudos usando o sequenciamento dos genes 16S *rDNA*, 23S *rDNA*, entre outros têm mostrado que bactérias causadoras da I.C., da feminização, e da partenogênese formam um grupo monofilético - *Wolbachia* (Breeuwer et al., 1992; O’Neill et al., 1992; Rousset et al., 1992; Stouthamer et al., 1993). No final de 2004, o genoma completo da bactéria *Wolbachia pipientis* de *Drosophila melanogaster* (*wMel*) foi seqüenciado para melhor entender como essas manipulações bioquímicas ocorrem em nível celular (Wu et al., 2004). Com o advento das ferramentas moleculares nos estudos taxonômicos e filogenéticos, foi revelada a existência de seis linhagens dentro do grupo *Wolbachia*: os grupos A, B, E, e F em insetos, ácaros e crustáceos (Werren et al., 1995b e Lo et al., 2002), e os grupos C e D em nematódeos (Bazzochi et al., 2000).

Wolbachia é transmitida através do citoplasma do ovo materno de seus hospedeiros para prole (transmissão vertical), assim como a herança mitocondrial. Porém a transmissão horizontal (intertaxônica) também foi sugerida como um possível mecanismo, a partir de isolados idênticos ou quase idênticos na seqüência dos genes *ftsZ* (de ciclo celular) e *wsp* (de proteína de superfície) obtidos de hospedeiros das diferentes ordens: *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, e *Lepidoptera* (Werren et al., 1995a; Tagami e Miura, 2004).

Extremamente difundidas, essas bactérias são encontradas infectando até 75% das espécies de invertebrados testadas (Jeyaprakash e Hoy, 2000; Werren e Windsor, 2000). Estima-se que esse grupo de microorganismos se encontra em simbiose com mais de um milhão de espécies de insetos, ácaros e nematódeos (Stouthamer et al., 1999-revisão). Como os insetos compreendem aproximadamente 85% de todas as espécies animais, *Wolbachia* são por extrapolação um dos mais abundantes parasitos intracelulares obrigatórios da biosfera.

À maioria dos micróbios parasitas pouco importa se o organismo a que atacam são machos, fêmeas ou hermafroditas. Entretanto, os interesses de um grupo endossimbionte estão muito mais a favor dos hospedeiros fêmeas do que os machos. Como no esperma há pouca quantidade de citoplasma enquanto nos ovos há uma grande porção deste, a herança desses simbioses se dá através das fêmeas, e não dos hospedeiros machos. Conseqüentemente, esses parasitas têm desenvolvido uma variedade de estratégias para promover a continuidade de sua própria existência, pelo favorecimento dos hospedeiros femininos em detrimento dos machos (Majerus, 2003), quadro este que também se pode observar no grupo das bactérias endossimbiontes *Wolbachia*.

Microorganismos que empregam comportamentos que beneficiam as fêmeas podem causar impacto na evolução de seus hospedeiros em vários caminhos. *Wolbachia* podem afetar processos evolutivos incluindo seleção sexual (Jiggins et al., 2000), determinação sexual (Rigaud et al., 1997), e especiação (Bordenstein, 2003) em seus hospedeiros artrópodes. Uma característica comum dos simbioses intracelulares como a *Wolbachia* é a perda

do material genético seguido à adaptação ao hospedeiro. Em *Mycobacterium leprae*, bactéria causadora da hanseníase, por exemplo, foi descrita a perda de mais da metade do genoma bacteriano (Cole et al., 2001). Nesses casos, as bactérias intracelulares lançam mão das capacidades metabólicas e desenvolvem uma relação de dependência com os mecanismos básicos do metabolismo de seu hospedeiro. Isto é evidente nos genomas completos da *Wolbachia* que codificam uma capacidade metabólica limitada. Ou seja, a síntese de aminoácidos é extremamente limitada na bactéria e a *Wolbachia* importa aminoácidos do seu hospedeiro para síntese de proteínas e produção de energia.

Apesar de o termo simbiote ser largamente usado para fazer referência à bactéria *Wolbachia*, o que se observa na realidade é um amplo cenário possível de relação *Wolbachia* - hospedeiro. Dependendo da combinação entre a bactéria e um dado hospedeiro, essas interações podem oscilar do parasitismo ao mutualismo. No caso dos hospedeiros artrópodes a bactéria endossimbiote *Wolbachia* está amplamente distribuída e gera algumas desordens reprodutivas que a princípio não prejudicariam a biologia desses hospedeiros. Devido à transmissão vertical da bactéria, todas essas manipulações promovem o aumento no *fitness* das fêmeas infectadas. Então, os tratamentos com antibiótico dos insetos infectados resultam na “cura” com (geralmente) nenhum efeito fatal no hospedeiro artrópode. *Wolbachia* de artrópodes são, portanto, parasitas. *Wolbachia* encontrada em nematódeos têm uma distribuição mais restrita nos hospedeiros do que aqueles da contraparte em artrópodes, tendo sido descritos até o momento em alguns nematódeos como *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi* e

Wuchereria bancrofti, agentes causadores de filariose humana (Casiraghi, 2001; McGarry, 2004). A relação entre a bactéria e seu hospedeiro nematódeo, apesar da simbiose intracelular, tem características de mutualismo. O tratamento dos nematódeos infectados com agentes antibacterianos não apenas prejudica a *Wolbachia* como também afeta agressivamente o hospedeiro, resultando em falha na embriogênese (esterilização efetiva), redução na taxa de crescimento e morte, evidência de um comportamento mutualista. Tanto, que para alguns casos de filariose humana, um tratamento alternativo por antibiótico vem sendo testado com sucesso (Hoerauf et al., 2001; Taylor, et al., 2001).

Como visto, as bactérias *Wolbachia* agem no tecido reprodutivo de seus hospedeiros causando algumas desordens reprodutivas sendo por isso denominada como “parasito reprodutivo” (Werren, 1997). As alterações observadas nos hospedeiros da *Wolbachia* são: incompatibilidade citoplasmática (I.C.), morte dos machos, indução da partenogênese e feminização. A incompatibilidade citoplasmática é, de maneira simplificada, uma incompatibilidade reprodutiva entre machos infectados e fêmeas não-infectadas (Bourtzis et al., 2003), como mostra o quadro a seguir (**figura 2**):

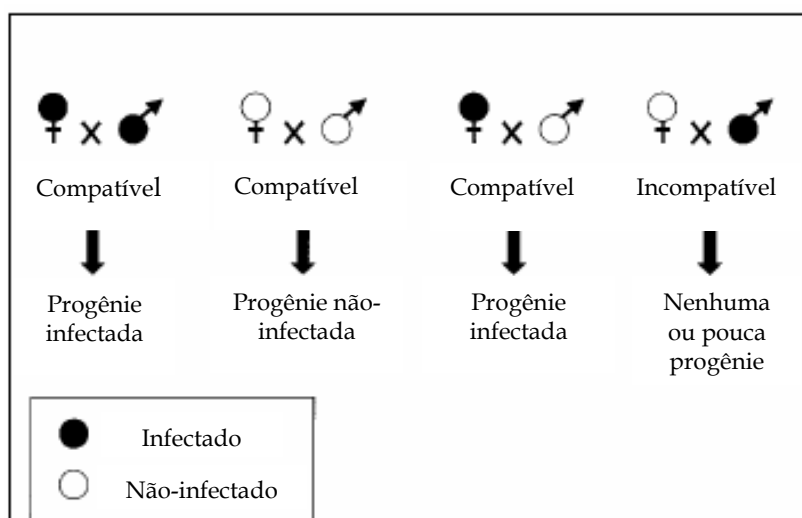


Figura 2. Exemplos de possíveis cruzamentos com hospedeiros de *Wolbachia*. Mostrando que as fêmeas infectadas (símbolo pintado) garantem progênie independente da condição do macho em relação à infecção pela bactéria.

A prole do cruzamento incompatível mostra um aumento de mortalidade dos embriões em comparação aos outros cruzamentos, ela pode estar muito reduzida ou em alguns casos até mesmo completamente ausente. Tal fenômeno é explicado pelo modelo “modificação-recuperação” (Werren, 1997), no qual cada espermatozóide do macho infectado é modificado pela bactéria de um modo prejudicial, e a mesma deve estar presente nas fêmeas para ocorrer a recuperação de tal modificação nos ovos. A essa incompatibilidade citoplasmática é dada a designação de unidirecional por se tratar apenas da presença e/ou ausência da bactéria. Quando diferentes linhagens da bactéria estão presentes nesses cruzamentos é a similaridade da linhagem de *Wolbachia* que deve estar presente para a produção dos descendentes, a essa incompatibilidade é dada a designação bidirecional.

No caso da morte dos machos, os filhos das fêmeas infestadas são mortos pela bactéria (Hurst et al., 2003). A sobrevivência das filhas é garantida pela

assim chamada compensação de “fitness”, ou seja, seu *fitness* aumenta devido ao canibalismo exercido, competição reduzida por alimento ou procriação diminuída. Exemplo de morte dos machos ocorre na borboleta-africana *Acraea encedon*. Na indução da partenogênese que ocorre em espécies haplóides, ovos não-fertilizados (que normalmente se desenvolveriam em machos) são manipulados para que se desenvolvam em fêmeas (Huigens e Stouthamer, 2003). Isso é possível na maioria dos casos, pela duplicação dos seus cromossomos (Stouthamer e Kazmer, 1994). Exemplo de indução da partenogênese ocorre na vespa do gênero *Trichogramma*. E por fim, a feminização de machos que tem sido descrita em alguns crustáceos que têm seus descendentes machos convertidos para fenótipo feminino funcional (Rigaud, 1997). Exemplo de feminização ocorre no tatuzinho de jardim, *Armadillium vulgare*, o qual quando embrião possui o conjunto genômico sexual tanto feminino quanto masculino que será determinado por ação hormonal. Quando infectados pela bactéria as glândulas hormonais masculinas são inibidas. Como podemos observar as alterações descritas anteriormente podem ser entendidas como uma estratégia da bactéria para beneficiar as fêmeas e assim se perpetuar em seus hospedeiros.

Dados os impactos que esses microorganismos podem causar na evolução de seus hospedeiros, é essencial que se aumente o entendimento sobre a sua biologia e que comecemos a ter uma visão desse assunto como parte integral e influente do material herdável desses hospedeiros, principalmente quando esses são vetores de importantes doenças para saúde pública como é o caso do presente trabalho. Além disso, *Wolbachia* tem sido proposta como

controle biológico como um inimigo natural microbiano ou como um potente vetor para espalhar modificações genéticas desejáveis em populações de insetos, no combate de diversas doenças (Laven, 1967; Beard et al., 1993). O sucesso dessa aplicação depende da habilidade do agente em invadir e se manter no hospedeiro em alta frequência sob condições de campo.

1.2. Incompatibilidade Citoplasmática - fenômeno da esterilização de cruzamentos

A incompatibilidade citoplasmática é uma comum alteração reprodutiva induzida pela *Wolbachia* em insetos, inclusive em mosquitos *Aedes albopictus*. Se expressa como uma incompatibilidade de cruzamentos entre hospedeiros machos infectados e fêmeas não-infectadas que resulta em formação de pouca ou nenhuma prole, e oferece uma vantagem relativa às fêmeas infectadas pela diminuição do *fitness* das fêmeas não-infectadas (Bourtzis et al., 2003). Os meios como a bactéria induz essa incompatibilidade são ainda desconhecidos, porém há um consenso a respeito de que há alguma modificação no esperma dos machos infectados, que só permitirá o desenvolvimento normal do embrião se o ovo materno a ser fecundado for também infectado, e consiga resgatar tal modificação.

Estudos citológicos detalhados em vespas haplodiplóides *Nasonia vitripennis* indicam que uma modificação no esperma em machos infectados leva a um atraso na quebra do envelope nuclear do pronúcleo masculino durante a primeira mitose (Tram e Sullivan, 2002), resultando em uma condensação imprópria dos cromossomos paternos depois da fertilização do ovo não-infectado (Reed e Werren, 1995). Assim o desenvolvimento do embrião haplóide anormal se dá com a perda dos cromossomos paternos e segregação apropriada dos cromossomos maternos, enquanto o desenvolvimento de um embrião inseto diplóide como a *Drosophila*, por exemplo, seria interrompido (Hoffmann et al., 1986). Quando o ovo a ser fecundado está infectado com a

mesma linhagem de *Wolbachia* dos espermatozoides, a fertilização e o desenvolvimento embrionário ocorrem normalmente.

Há três modelos bioquímicos propostos que tentam traduzir de maneira concreta os fatores “modificação” e “resgate” que ditam a I.C. (Poinsot et al., 2003). A **figura 3** apresenta tais modelos esquematizados separadamente em: (1) hipótese “chave-fechadura”; (2) hipótese “titulação-restituição”; (3) hipótese “câmara lenta”. Tais modelos tratam de fenômenos que ocorrem durante a fase inicial da espermatogênese e que permanecem no esperma maduro, com a expulsão da bactéria por bolsas citoplasmáticas (*w.b.*, vide figura). Quando o ovo fecundado por esse esperma não está infectado pela bactéria, os cromossomos paternos não são funcionais e apenas os maternos normalmente se dividem na mitose (em D, vide figura). Assim, em organismos diplóides ocorre a morte de embrião.

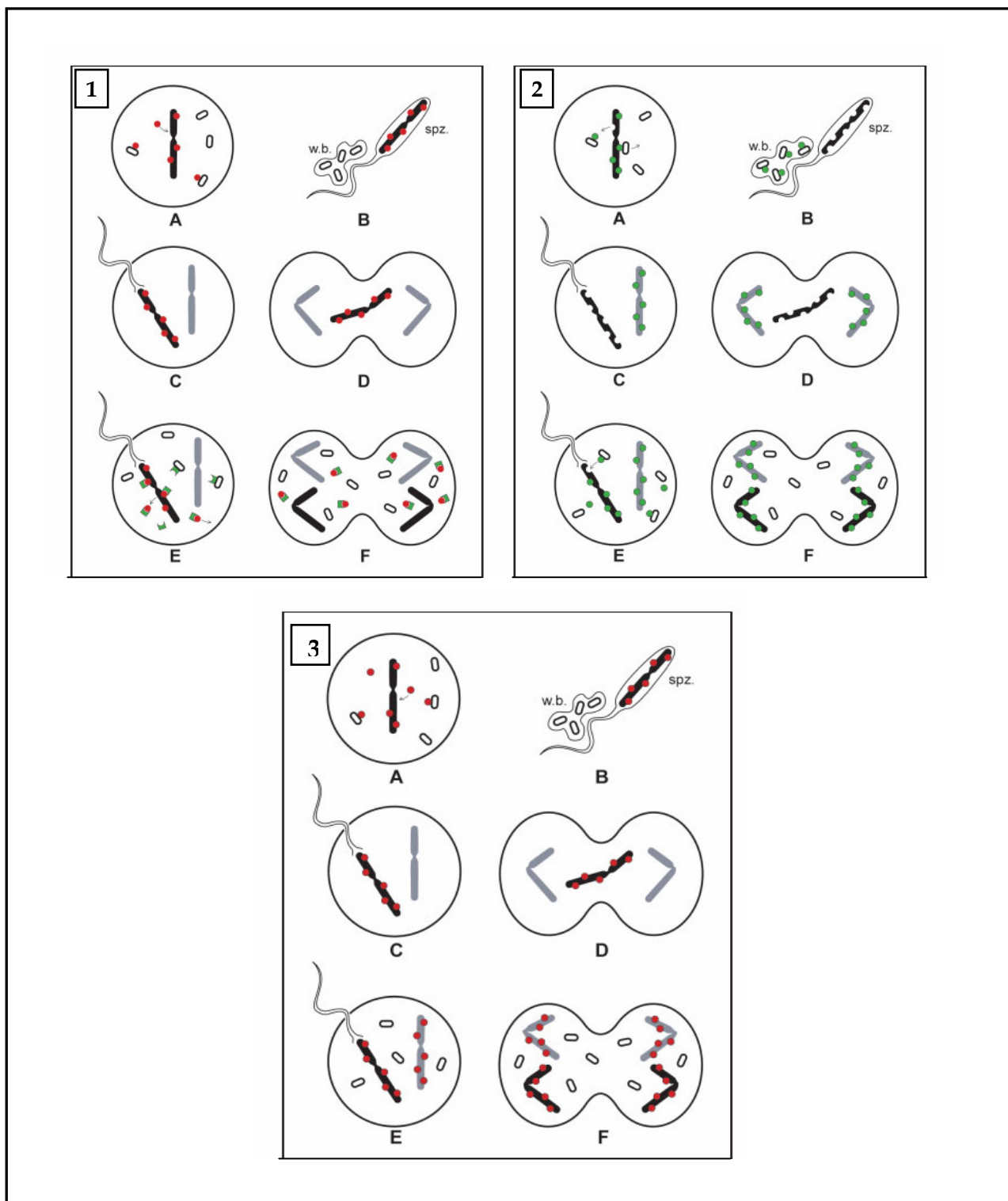


Figura 3. Modelos bioquímicos para o fenômeno da incompatibilidade citoplasmática: (1) hipótese “chave-fechadura”; (2) hipótese “titulação-restituição”; (3) hipótese “câmara lenta”. Em todos os esquemas: (A) e (B) representam a espermatogênese em macho infectado, (C) e (D) mostram um cruzamento incompatível entre um macho infectado e uma fêmea não-infectada, e (E) e (F) mostram um cruzamento compatível entre dois indivíduos infectados. Nos cruzamentos compatíveis ocorre mitose normal tanto para o conjunto cromossômico feminino quanto masculino.

O modelo 1 explica que a função *mod* (de modificação) é resultado da produção de uma “fechadura” (símbolo vermelho) pela bactéria (símbolo branco) que se liga a um componente do cromossomo paterno. O cruzamento só é compatível se os ovos apresentarem a bactéria, pois nessa situação é produzida uma “chave” (símbolo verde) que irá remover a “fechadura” (função *resc*). Há duas características importantes nessa proposição: (i) *mod* e *resc* não resultam de um mesmo mecanismo molecular e são determinados por diferentes genes bacterianos; (ii) *mod* penetra no ovo junto com o cromossomo paterno, seguindo uma interação física direta entre os produtos *mod* e *resc*.

O modelo 2 propõe que a função *mod* seja devido à remoção de algumas proteínas associadas com os cromossomos do hospedeiro via reação de titulação e a função *resc* seria a devolução (restituição) dessas proteínas. Nesse caso, *mod* e *resc* devem ser determinados por diferentes genes (um codificando um fator de titulação, e um segundo codificando um inibidor da titulação, resultando na restituição).

E por último, o modelo 3 postula que *mod* seja resultado da produção de um fator pela bactéria que se liga ao cromossomo paterno e então diminua a velocidade de seus movimentos durante a primeira mitose embriogênica, levando a uma quebra na sincronia entre os cromossomos maternos e paternos. Da mesma maneira, a função *resc* seria causada por uma modificação similar dos cromossomos maternos quando a *Wolbachia* está presente no ovo, restaurando o ciclo sincrônico entre os complementos maternos e paternos.

Das três hipóteses disponíveis para explicar a incompatibilidade citoplasmática, a mais parcimoniosa, ou seja, a mais simples e provável é a

primeira, modelo “chave-fechadura”, uma vez que os outros dois modelos requeiram hipóteses adicionais, como expressão sexo-específico dos genes bacterianos, para serem viáveis.

O fenômeno da incompatibilidade citoplasmática pode ser parcial ou completo na qual pouca ou nenhuma progênie, respectivamente, é produzida. Os fatores microbianos que moldam a variação da I.C. permanecem evasivos, sabe-se que as densidades de *Wolbachia* estão positivamente associadas com níveis de I.C. (Breeuwer e Werren, 1993). Um recente estudo mostrou também que além da densidade bacteriana, a presença de um bacteriófago específico de *Wolbachia*, denominado *bacteriófago WO*, interfere na variação da I.C. (Bordenstein et al., 2006). Esse fago é denominado “temperado” por possuir tanto o ciclo lítico quanto o ciclo lisogênico de vida dentro da célula bacteriana. Dependendo do estímulo recebido, como por exemplo, um estresse ambiental, o bacteriófago segue para um determinado caminho. O estudo revela que os bacteriófagos *WO* mantêm com suas células hospedeiras uma correlação positiva em número de cópias, uma vez que o desenvolvimento lisogênico permite sua co-transmissão com o genoma bacteriano. O ciclo lítico depende da frequência bacteriana encontrada na célula hospedeira, estando envolvido com a regulação da densidade de *Wolbachia* em níveis baixos. Quando lítico, o fago reduz a densidade da bactéria e conseqüentemente reduz o nível da I.C.

Além de fatores intrínsecos, foi mostrado que fatores extrínsecos à bactéria como estresse ambiental, tratamento com calor, e condições de criação larval dos hospedeiros podem reduzir as densidades bacterianas (Feder et al., 1999; Sinkins et al., 1995).

1.3. *Aedes albopictus* - importante vetor para saúde pública

Os mosquitos do gênero *Aedes* incluem espécies de grande importância do ponto de vista da transmissão de patógenos, uma vez que entre eles encontramos vetores de doenças como a dengue e a febre amarela. O mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) é considerado a segunda espécie de importância médica dentro desse gênero, sendo superado apenas pelo *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Knudsen, 1995). Nos países asiáticos, de sua origem, é a espécie transmissora da dengue, febre amarela urbana e silvestre, e encefalite. Já no Brasil ainda não é considerado como vetor da dengue e da febre amarela, apesar de populações existentes no país demonstrarem ser suscetíveis e capazes de transmitir o vírus da dengue em laboratório (Miller & Ballinger, 1988). Dengue, febre amarela e encefalites são doenças viróticas denominadas arboviroses (*arthropods born viruses*) pois são transmitidas por artrópodes, nesse caso, por mosquitos.

A. albopictus ocorre mundialmente conforme o mapa de distribuição da **figura 4**. Seu primeiro registro em território brasileiro foi em 1986 nos estados de Rio de Janeiro e Minas Gerais (Forattini, 1986), trazido do sul da Ásia por meio do comércio marítimo, durante o transporte de minério de ferro, e se interiorizou via estrada de ferro (Consoli e Lourenço de Oliveira, 1994). Segundo Gomes e colaboradores (1999), a presença dessa espécie já foi detectada em 14 Estados brasileiros.

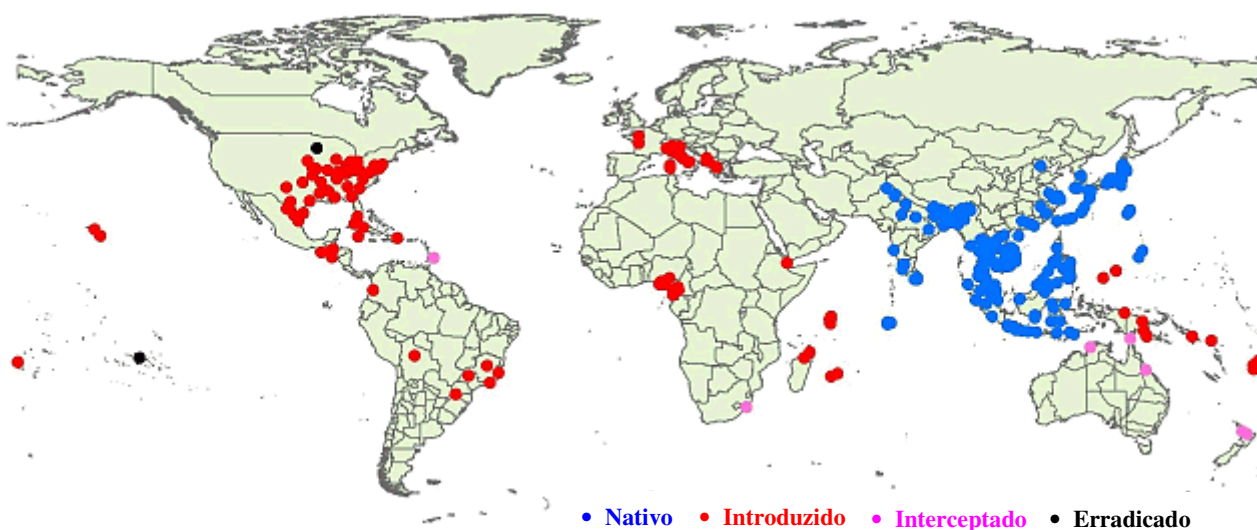


Figura 4. Mapa da distribuição global do mosquito *A. albopictus* (1999). Em azul, populações nativas; em vermelho, populações introduzidas; em preto, populações erradicadas; e em rosa, populações interceptadas. Fonte: OMS.

Conhecido como o “Tigre Asiático” o adulto dessa espécie é facilmente reconhecido pela sua cor negra com uma faixa estreita, longitudinal, mediana, branco - prateada que vai do occipício (cabeça) até o escutelo, porção posterior do tórax (**figura 5**). Como outros culicídeos, *A. albopictus* são holometábolos, ou seja, seu ciclo biológico é dividido em quatro fases: ovo, larva (com quatro estádios - L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (**figura 6**). Esses mosquitos utilizam como fonte energética soluções de açúcar encontradas na natureza, como néctar de flores e suco dos frutos; as fêmeas são hematófagas, alimentam-se de sangue para maturação dos seus ovos. Como são antropofílicos, têm preferência por picar humanos, porém também podem se alimentar de outros animais, tais

como: eqüinos, bovinos, cães, macacos, aves e roedores. Possuem hábitos diurnos de hematofagia, cópula e oviposição.

Depositam seus ovos isoladamente sobre a água ou nas paredes dos criadouros preferencialmente escuros que podem ser naturais (buracos no solo, árvores, etc) ou artificiais (pneus, latas e caixas d'água). Desenvolvem-se em temperaturas variadas desde 15°C até 30°C, podendo ser vistos em ambientes silvestres, rurais, urbanos e periurbanos. Esse último fato aliado à sua alta suscetibilidade a vírus o torna um inseto perigoso, pois pode veicular várias arboviroses naqueles ambientes.



Figura 5. Fotografia de um mosquito fêmea *Aedes albopictus* ingurgitada de sangue. Observar os detalhes de sua morfologia: corpo de cor negra com manchas brancas-prateadas esparsas, e linha horizontal na porção posterior do tórax (característica diferencial dessa espécie).

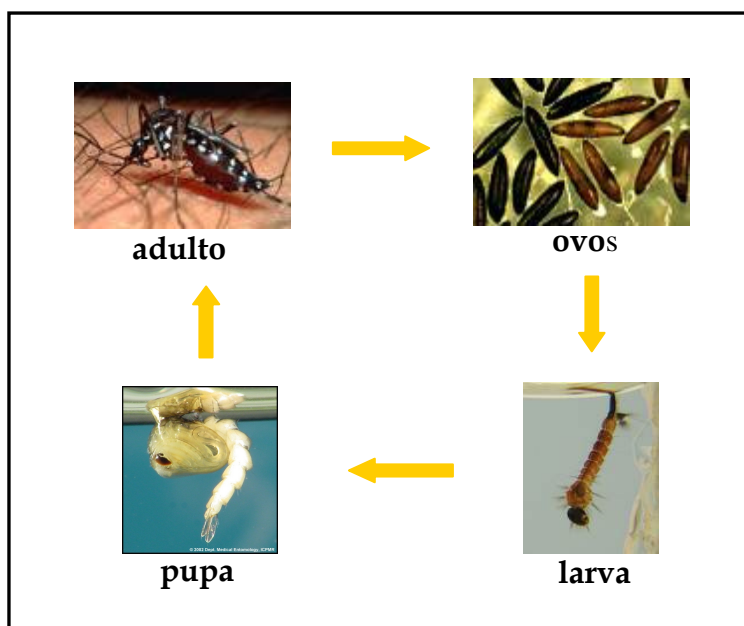


Figura 6. Ciclo do desenvolvimento biológico de mosquitos *Aedes sp* mostrando suas diversas fases.

A. albopictus tem sido relatado infectado naturalmente pela bactéria endossimbionte *Wolbachia* com uma única linhagem (*wAlbA*) ou superinfectado com os tipos *wAlbA* e *wAlbB* (Kambhampati et al., 1993; Sinkins et al., 1995; O'Neill et al., 1997; Otsuka e Takaoka, 1997; Dobson et al., 2001, Kittayapong et al., 2002). Estudos mostram que a condição da superinfecção pelas duas linhagens da bactéria nos hospedeiros permite alta penetrância da *Wolbachia* em novas populações não-infectadas e/ou infectadas com uma única linhagem, além de garantir aumento considerável no *fitness* dos exemplares hospedeiros femininos (Dobson et al., 2004). Por essas razões *A. albopictus* tem atraído considerável interesse como modelo de estudo da dinâmica de infecção pela bactéria *Wolbachia*, e do fenômeno da incompatibilidade citoplasmática.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi analisar a distribuição da bactéria *Wolbachia* em mosquitos *Aedes albopictus* selvagens de Botucatu e avaliar a influência de sua presença na biologia desses mosquitos.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Detecção da presença da bactéria *Wolbachia* e suas diferentes linhagens nos mosquitos coletados em Botucatu.
- ✓ Colonização em laboratório da linhagem de mosquitos *A. albopictus* de Botucatu infectados por *Wolbachia* bem como obtenção de uma outra colônia de mosquitos curados de tal infecção.
- ✓ Estudo da biologia dos mosquitos infectados pela bactéria sob os seguintes aspectos: proporção sexual; longevidade; fecundidade; *fitness* dos adultos e larvas diante de variações de temperaturas, diferentes densidades populacionais em criadouro e sob estresse nutricional.
- ✓ Existência de associação da bactéria *Wolbachia* com bacteriófagos *WO* e correlação com os níveis de incompatibilidade citoplasmática.
- ✓ Quantificação do bacteriófago associado à bactéria *Wolbachia* nos diferentes estágios do desenvolvimento do mosquito.
- ✓ Verificação de divergências no genoma mitocondrial desses hospedeiros uma vez que a presença da bactéria está relacionada com o processo de especiação.

3. Material e Métodos

3.1. Coleta dos mosquitos *A. albopictus*

Exemplares de mosquitos da espécie *Aedes albopictus* foram obtidos em campo em companhia de agentes da saúde da Equipe de Controle de Zoonoses de Botucatu (Secretaria Municipal da Saúde). As coletas foram realizadas na cidade de Botucatu em três ocasiões compreendendo os períodos de abril de 2004 a junho de 2005 nos quais foram instaladas e retiradas armadilhas de oviposição (ovitrampas) para captura dos mosquitos em forma de ovos (**figura 7**). A cidade foi dividida em toda sua extensão em 115 quadrantes, uma residência por quadrante foi aleatoriamente escolhida para a instalação da armadilha. Após verificação da positividade de ovos por armadilha e sua contagem, esses foram transferidos para nosso insetário a fim de completarem seu ciclo de vida. Os adultos foram classificados quanto à espécie através da marca torácica de acordo com Forattini (2002).



Figura 7. Fotografia de uma armadilha de oviposição utilizada na coleta de *A. albopictus*.

3.2. Extração de DNA dos mosquitos coletados

Os ovos coletados foram mantidos no insetário do laboratório, até a obtenção das formas adultas de *A. albopictus* que foram utilizadas na extração de DNA.

Os mosquitos tiveram seu DNA extraído inicialmente pelo método da *Extração de DNA de um único mosquito* (modificado de BENDER et al (1983)) que utiliza um tampão de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, contendo NaCl 0,1 M, sacarose 0,2M, EDTA 0,05 M e SDS (sulfato dodecil de sódio) 0,5% p/v (tampão de extração). Nesse método, os mosquitos foram rapidamente lavados com éter para esterilização e em seguida colocados em tubos de 1,5 ml contendo 100µl do tampão de extração. Após serem macerados, foram adicionados mais 100µl do tampão de extração contendo 2µl de DEPC (dietil pirocarbonato) para inativar DNAses. Os tubos então foram incubados a 65°C por 30 minutos, adicionados de 25µl de acetato de potássio 8M e incubados em gelo por 30 minutos para precipitação das proteínas. Após centrifugação por 15 minutos (12000 x g a 4°C) o sobrenadante foi transferido para novo tubo onde teve início a precipitação do DNA pela adição de 400µl de etanol 100%, centrifugação por 10 minutos (12000x g a 4°C), descarte do sobrenadante, adição ao sedimento de 400µl de etanol 70% a 4°C, centrifugação por 5 minutos, descarte do sobrenadante e por fim a lavagem com etanol absoluto. Após a lavagem, o sedimento foi seco a temperatura ambiente por 5 minutos e ressuscitado em 50µl de TE (Tris - HCl 10mM pH 7,4; EDTA 1mM). O produto de cada extração foi estocado a -20°C até o momento do uso.

Além dessa extração, o kit *Genomic PrepTM Cells and Tissue DNA Isolation Kit* (Nucleon) foi testado conforme protocolo do fabricante.

Em um terceiro momento, testou-se a aplicação da resina *Chelex 100 BioRad* indicada para estudo de amostras muito pequenas, como as forenses e os microorganismos de modo geral (Loxdale e Lushai, 1998). Trata-se de um método rápido, fácil e eficaz de extração que não envolve solventes orgânicos e com uma quantidade de amostra final de até seis vezes comparada a outros métodos. Através de sua propriedade quelante, essa resina seqüestra o magnésio do meio que é responsável pela ativação de endonucleases resultando assim em um DNA mais íntegro. O procedimento realizado para extração de DNA dos mosquitos utilizados para esse trabalho seguiu-se assim:

- Preparação de 300µl de solução *Chelex* (5%) distribuída em tubos de 1,5ml.
- Maceração dos indivíduos inteiros nos tubos com a solução da resina.
- Agitação desse material em vortex por 10-15s.
- Centrifugação rápida (20 seg) a alta velocidade (13000 rpm).
- Incubação por 20 min a 90°C.
- Nova agitação em vortex por 10-15s.
- Nova centrifugação rápida (20 seg) a alta velocidade (13000 rpm).
- Amostra pronta para o uso. (DNA se encontra no sobrenadante)

3.3. Reação de PCR para detecção da bactéria *Wolbachia*

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) se trata de uma técnica de biologia molecular na qual são empregados iniciadores de seqüências de DNA denominados oligonucleotídeos (ONTs) que em condições ideais de temperatura e substratos, como: DNA-alvo, os quatro nucleotídeos, e a enzima DNA polimerase, amplificam em magnitude exponencial o gene de interesse. Utilizando uma máquina que reproduz os ciclos de temperatura exigidos, essa reação acontece e por eletroforese em gel de agarose os seus produtos podem ser visualizados como bandas. A **figura 8** mostra um esquema da reação de PCR bem como uma variante chamada *semi-nested PCR* também aplicada neste estudo.

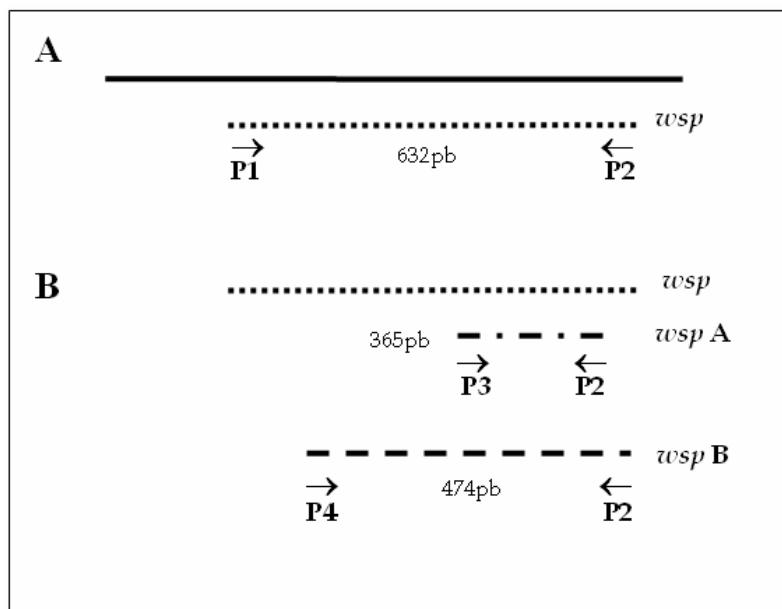


Figura 8. Esquema das reações de PCR e *semi-nested PCR*. **(A)** Reação de PCR com os ONTs *wsp forward* (P1) e *reverse* (P2). **(B)** Reação de *semi-nested PCR* para as diferentes linhagens A (P3) e B (P4).

Para detecção da presença da *Wolbachia*, os ONTs utilizados na reação de PCR correspondem à proteína de superfície *wsp* (*Wolbachia surface protein*) descritos por Braig et al. (1998). As reações de trabalho foram procedidas em ensaios contendo concentração final de 0,5 mM de MgCl₂, 2,5µL tampão 10X (100mM tris-HCl pH 9,0; 15 mM de MgCl₂; 500 mM de KCl), 0,4 µmol de cada um dos ONTs (*forward* e *reverse*), 0,1 mM de dNTPs, 1 unidade de *Taq* polimerase, 3µL da amostra de DNA, e água até completar volume final de 50µL/reação. Para as amplificações utilizamos o termociclador *Biometra T Gradient* com o seguinte perfil de temperatura: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min para cada ciclo. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 1% em solução de TAE 1X contendo brometo de etídeo a 0,5µg/ml, por eletroforese, junto com um padrão de tamanho. Para visualização das bandas no gel foi utilizado um transluminador de UV.

Para identificação de quais linhagens da bactéria estavam presentes nos mosquitos, reações de *semi-nested PCR* foram feitas com os ONTs *wsp A* e *wsp B* (Zhou et al., 1998) seguindo as mesmas concentrações finais de reagentes e condições dos ciclos de temperatura descritos anteriormente, exceto pela temperatura de anelamento dos ONTs que nesse caso foi de 47 °C.

Com o objetivo de nos certificarmos de que esses produtos obtidos realmente correspondiam ao gene de interesse, *wsp*, seguimos com o protocolo de sequenciamento desse DNA (conforme será detalhado nos próximos 2 itens).

3.3.1. Purificação do produto de PCR

As bandas geradas e visualizadas foram cortadas do gel com auxílio de espátula, transferidas para tubos de 1,5ml e pesadas. Quando, então, foram submetidas a um protocolo de purificação pelo kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences)*. De posse dos produtos purificados, partiu-se para o sequenciamento do fragmento do gene *wsp*.

3.3.2. Reação de sequenciamento do fragmento do gene *wsp*

Na reação de sequenciamento, utilizou-se 4µl de 2,5X *Save Money* (400mM Tris-HCl pH 9,0; 10mM MgCl₂), 4µl *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA)*, 3,2 µmol dos oligonucleotídeos, e 4µl do DNA genômico a 5ng/µl. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o ONT *forward* e outra para o *reverse*. As reações foram realizadas no termociclador com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 seg, 50°C por 5 seg, 60°C por 4, com rampa de 1°C/seg, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação.

A cada reação de sequenciamento foram adicionados 80µl de isopropanol 65%, incubando a T.A. por 20 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a velocidade de 30 min a 2000xg a T.A. O isopropanol foi removido invertendo os tubos e, a seguir, adicionou-se 200µl de etanol 60% e centrifugou-se a velocidade máxima por 5 min a 2000xg a T.A. Removeu-se todo o etanol com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. As amostras foram secas em T.A. e o DNA

foi eluído em 2µl de tampão de amostra contendo Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25mM EDTA pH 8,0 contendo 50mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação no seqüenciador, as amostra foram aquecidas a 95°C para denaturação por 3 min, e rapidamente transferidas para o gelo.

As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems). Quando, então, foram alinhadas com auxílio do programa MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) e analisadas através do programa CLUSTAL X (Higgins, D.; Thompson, J.; Gibson, T.). Assim, foram comparadas com outras disponíveis no *GenBank* e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.4. Colonização e manutenção dos mosquitos coletados

Constatada a positividade da infecção por *Wolbachia*, uma colônia com indivíduos infectados (n=50 larvas) por *Wolbachia* foi iniciada no nosso insetário.

O insetário consiste em uma câmara climatizada com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados, revestida por prateleiras nas quais adultos e larvas são criados em gaiolas de papelão e potes de plástico, respectivamente (**figura 9**). A uma temperatura média de 28°C e umidade relativa em torno de 90%, as formas evolutivas dos mosquitos crescem sob fotoperíodo 12h/12h (claro e escuro). O suprimento nutritivo dos adultos é dado através de uma solução açucarada (sacarose 10%) que fica sempre disponível sendo trocada a cada três dias. Para obtenção de ovos, as fêmeas são alimentadas com sangue de cobaia anestesiada uma vez por semana e então, após três dias copos de postura são colocados na gaiola para retirada dos ovos. Os ovos são eclodidos em contato com água em potes redondos nos quais as larvas vivem até fase de pupa, quando então são transferidas para as gaiolas de plástico. Para as larvas a alimentação é feita com ração de peixe *Tetramin* macerada.



Figura 9. Fotografia da câmara de criação de mosquitos (insetário).

Estabelecida essa colônia de *A. albopictus*, ensaios biológicos com esses mosquitos foram realizados para avaliar a influência da bactéria *Wolbachia* na biologia desses insetos, conforme será mostrado em detalhes em um item a seguir. Para comparação e conclusão dessa participação da bactéria no ciclo de vida desses artrópodes, procederam-se experimentos para eliminação da *Wolbachia* nesses mosquitos e obtenção de uma colônia de *A. albopictus* curados dessa infecção.

3.5. Obtenção de colônia de mosquitos não-infectados por *Wolbachia*

Para obtenção de uma colônia de *A. albopictus* livres da presença da bactéria *Wolbachia* foram testados diferentes tratamentos por aquecimento e pelo uso de um antibiótico (tetraciclina) nas larvas e adultos desses mosquitos segundo Dobson (2001). Tanto larvas quanto adultos foram criadas a 32°C e tratados com tetraciclina a diferentes concentrações. A taxa de mortalidade foi avaliada e a conduta mais apropriada foi escolhida.

3.6. Ensaios biológicos

Para avaliar as alterações que a infecção de *Wolbachia* pode gerar nos mosquitos *Aedes albopictus* foram procedidos alguns ensaios no intuito de correlacionar características, comportamentos de sobrevivência e reprodução dos mosquitos colonizados no laboratório. Cada experimento foi realizado em triplicata (E1, E2 e E3) com a intenção de descontar possíveis interferências dos procedimentos. Os experimentos foram executados para a colônia infectada, porém, infelizmente, não foi possível realizá-los para colônia tratada. Feitas as observações de determinados parâmetros em ambas as colônias de mosquitos, uma comparação será aplicada e o *fitness* desses mosquitos definitivamente avaliado quanto à presença da infecção por *Wolbachia*. Os parâmetros observados estão destacados a seguir:

- ❖ Proporção dos sexos
- ❖ Taxa de sobrevivência (longevidade)
- ❖ Fecundidade
- ❖ Variações climáticas
- ❖ Condições do criadouro
- ❖ Disponibilidade de alimento

3.6.1. Proporção dos sexos

Para o experimento da influência da bactéria *Wolbachia* na proporção sexual da prole dos mosquitos, gaiolas contendo 25 fêmeas e 25 machos virgens com cinco dias de eclosão receberam alimentação sanguínea, decorridos três dias um copo de postura foi colocado dentro de cada gaiola. Após dois dias de permanência estes copos foram retirados e colocados em pote com água para eclosão das larvas. Quando em estágio de pupas foram separadas uma a uma em gaiolas individuais para observação da emergência desses mosquitos e seus correspondentes sexos. A determinação sexual dos mosquitos se deu pelo exame das antenas, em machos a antena é plumosa e em fêmeas é pilosa, como mostra a **figura 10** (A e B respectivamente).

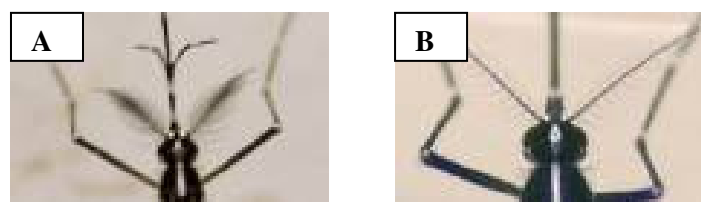


Figura 10. Fotografia da distinção de adulto macho e fêmea de *A. albopictus*.

A: antena plumosa (macho) e **B:** antena pilosa (fêmea).

3.6.2. Taxa de sobrevivência (longevidade)

O experimento de longevidade foi procedido distintamente para larvas e adultos. Para os experimentos com as larvas, potes contendo 50 larvas recém-eclodidas (L1) da colônia foram separadas e diariamente alimentadas e observadas quanto à mortalidade, formação de pupas e emergência dos adultos. Para os experimentos com os adultos, gaiolas contendo 25 fêmeas e 25 machos recém-emergidos foram diariamente acompanhadas e observadas quanto à mortalidade ao longo de todo o período de vida desses mosquitos.

3.6.3. Fecundidade

Para o experimento de fecundidade 30 fêmeas virgens da colônia foram colocadas na companhia de 30 machos em gaiola de criação. Os cruzamentos se deram aleatoriamente por um período de cinco dias quando essas fêmeas foram alimentadas com sangue e transferidas individualmente para gaiolas com copo de postura onde permaneceram por mais seis dias. Os ovos referentes a cada postura foram contabilizados e colocados para eclosão com a finalidade apenas de confirmar fecundação desses ovos.

3.6.4. Variações de temperatura

Para avaliar como as populações de mosquito se comportam sob diversas condições climáticas, o experimento sob diferentes condições de temperaturas foi conduzido. Potes com 50 larvas recém-eclodidas foram submetidos às seguintes temperaturas: 15°C, 20°C, 28°C e 32°C, e acompanhadas diariamente até a fase adulta. Assim, características como tempo de desenvolvimento larval,

formação e morte de pupas, tempo para eclosão dos adultos e seus respectivos sexos foram observados e anotados.

3.6.5. Condições de criadouro

Para o experimento referente às condições de criadouro, larvas foram submetidas a diferentes densidades populacionais por potes de criação com a finalidade de detectar diferença na competitividade desses indivíduos por espaço e comida. Desde recipientes com pouca densidade (10 larvas/pote) a recipientes bastante densos (200 larvas/potes) foram testados quanto à capacidade de estabelecimento desses indivíduos até a fase adulta. Quando adultos foram transferidos para as gaiolas respeitando a densidade original de cada recipiente. A fecundidade e a taxa de sobrevivência desses mosquitos foram observadas.

3.6.6. Disponibilidade de alimento

Para o experimento referente à disponibilidade de alimento, as larvas e os adultos foram analisados separadamente com a finalidade de detectar diferença na competitividade desses indivíduos. As larvas (n=50, cada triplicata) foram submetidas a diferentes quantidades de alimento por pote de criação, foram oferecidas quatro situações de alimentação da ração para as larvas: a padrão, utilizada normalmente na rotina da manutenção da colônia; metade do padrão, representando a restrição calórica; o dobro do padrão, representando abundância de alimento; e o jejum, representando escassez absoluta de alimento. Os adultos foram submetidos a duas situações diferentes

quanto ao oferecimento da solução açucarada: a diária, utilizada normalmente na rotina da manutenção da colônia; e o jejum.

3.7. Associação da bactéria *Wolbachia* com bacteriófagos *WO* e correlação com os níveis de incompatibilidade citoplasmática.

Para a verificação de associação entre bacteriófagos *WO* e a *Wolbachia* dos mosquitos *A. albopictus* com os níveis de incompatibilidade citoplasmática, experimentos, denominados aqui de teste de cruzamentos, foram procedidos da seguinte maneira: casais formados por membros virgens de cinco dias de vida foram colocados para conviver em pequenas gaiolas plásticas já com pequenos copos de postura. Decorridos três dias, cada fêmea recebeu alimentação e depois do 6° dia, a postura contabilizada separadamente em cada gaiola. Os casais então tiveram seus DNAs extraídos para a realização das reações de *PCR* para *Wolbachia* (*wsp*) e fago *WO* (*ORF7*) conforme já descritos. Os ovos, por sua vez, foram colocados em contato com água para eclosão, e as larvas foram então contabilizadas.

3.8. Quantificação do bacteriófago associado à bactéria ao longo dos estágios de vida do mosquito hospedeiro

A finalidade desse experimento foi avaliar como as densidades relativas do bacteriófago específico de *Wolbachia* se comportam durante a evolução dos estágios da vida dos mosquitos *A. albopictus*, e com isso indiretamente prever também a densidade da bactéria dentro de um organismo hospedeiro desde seu nascimento. Para isso, reações de *PCR* quantitativo em tempo real foram realizadas para amostra de DNA de: ovos; larvas L1, L2, L3, L4; pupas; e adultos masculinos e femininos de *A. albopictus*. Cada experimento biológico foi feito em triplicata.

Através desse tipo de *PCR* é possível monitorar o progresso da reação da polimerase, em tempo real, pela fluorescência emitida e mensurar a quantidade de ácido nucléico de cada ciclo de amplificação. Os oligonucleotídeos utilizados nesse experimento estão mostrados na **tabela 1**.

Tabela 1. Seqüências dos oligonucleotídeos específicos utilizados na reação do *PCR* quantitativo em tempo real e o tamanho em pares de base do produto de cada amplificação.

ONTs	F	R	Tamanho
WO	5' GTC TGG AAA GCT	5' CTC GCC AAA ATA TAG	125pb
ORF7	TAC AAA AAG 3'	CCC TGC 3'	
Aeg S7	5' TGA AGT CGT CGG	5' GTG TCG ACC TTG TGT	105 pb
	CAA GCG TAT G 3'	GTT CAA TGG TG 3'	

As reações para cada experimento biológico foram realizadas em triplicatas em placas de 96 poços, às quais foram acrescentados controles negativos (também em triplicata) constituídos da mistura de reagentes e água (no lugar do DNA). Para cada amostra foi preparada inicialmente uma mistura de reação em volume final de 35 µl. Essa mistura era constituída de 5 µl de DNA, 0,7 µl dos ONTs de cada gene a 10 µM para uma concentração final de 400 nM e 17,5 µl de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). A seguir, 10 µl da mistura foram transferidos para cada poço da triplicata na placa de reação. A reação de *PCR* quantitativo em tempo real foi realizada no equipamento *Applied Biosystems Amp 7300 Sequence Detection System*, sob as seguintes condições: 95°C por 10min; 40 ciclos de 95°C por 15s seguidos de 50°C por 30s e 60°C por 1min. Após a reação uma curva de dissociação (CD) foi construída para cada amostra.

Curvas de eficiência foram delineadas para cada um dos ONTs. Além disso, a concentração ideal de DNA para os experimentos foi achada através de sucessivas diluições (1:1, 1:3, 1:9, 1:27 e 1:81). A eficiência (E) foi calculada através da fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação})}$. A quantificação relativa (R) dos DNAs amplificados foi determinada de acordo com Pfaffl (2001), onde CP (*crossing point*) é definido como o ponto em que a fluorescência detectada está apreciavelmente acima da fluorescência de fundo:

$$R = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta\text{CPalvo (controle-amostra)}}}{E_{\text{endógeno}}^{\Delta\text{CPendógeno (controle-amostra)}}$$

As análises foram realizadas comparando as quantidades de DNA do bacteriófago em relação ao do gene ribossomal S7 de mosquito (endógeno).

3.9. Relação entre condição infectada e DNA mitocondrial dos mosquitos

Para verificarmos se a presença da bactéria *Wolbachia* exerceu alguma pressão na evolução dos mosquitos coletados em Botucatu, sequenciamos parte de um gene mitocondrial de mosquito com a intenção de detectarmos possíveis diferenças entre os genomas mitocondriais dos indivíduos com e sem a bactéria. Tanto exemplares positivos quanto os negativos via *PCR* (*wsp*) para bactéria *Wolbachia* foram submetidos a reações de amplificação do gene mitocondrial e posterior sequenciamento do mesmo. Um total de 20 indivíduos (infectados e não-infectados) foi utilizado nessa análise. O gene escolhido foi o *ND4* - subunidade 4 da nicotinamida desidrogenase.

A *PCR* do gene *ND4* foi procedida num volume final de 25µl utilizando-se 3µl de DNA da amostra, Tris-HCl 10mM pH 8.0, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 10mM, 20µM dos oligonucleotídeos específicos *ND4F* (5'-TGATTGCCTAAGGCTCATGT-3') e *ND4R* (5'-TTCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT-3') e 1,0U de Taq DNA polimerase. As reações de amplificação foram realizadas com os ciclos de temperatura programados para: 3 ciclos de 94°C por 2 min, 37°C por 2 min, 72°C por 1 min; seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 1 min; com um ciclo de extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos da *PCR* foram analisados em gel de agarose 1%, por eletroforese, junto com um padrão de tamanho. Para visualização das bandas o DNA foi corado com brometo de etídeo.

De posse desse produto, seguimos com o protocolo de purificação, precipitação e o sequenciamento propriamente dito, da mesma forma como já

detalhado no item 3.3., com a única diferença dos ONTs específicos utilizados em cada situação.

4. Resultados

4.1. Coleta dos mosquitos e extração de DNA

Além dos exemplares de *A. albopictus*, mosquitos da espécie *A. aegypti* também foram coletados nas três diferentes ocasiões. Aproveitando essas amostras, 30 indivíduos desta espécie também foram testados quanto à presença da bactéria, apesar de ainda não ter sido descrita infectada pela *Wolbachia*. As coletas resultaram um total de 70 mosquitos adultos de *A. albopictus* para serem analisados. Um casal por quadrante foi utilizado para o trabalho, quando não, pelo menos um indivíduo (macho ou fêmea) constituiu nossa amostra.

A extração de DNA através do método modificado de BENDER *et al.* não reproduziu os mesmos resultados entre as diferentes espécies de mosquitos testados como mostra a **figura 11**. Esse método demonstrou melhor eficácia apenas para os mosquitos *A. aegypti*.

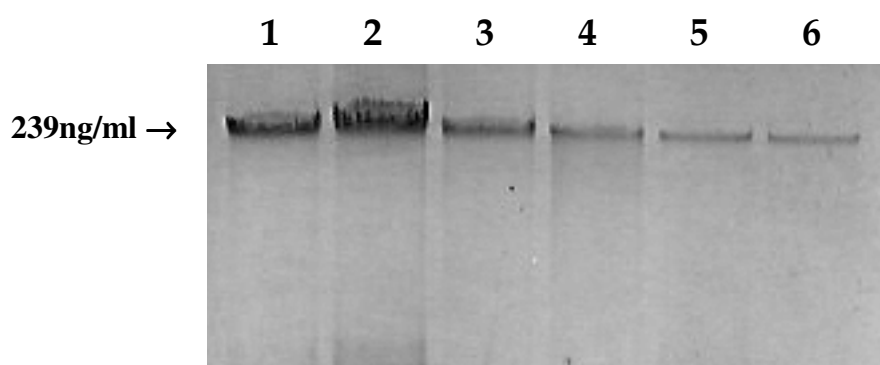


Figura 11. Quantificação de DNA extraído pelo método de *Extração de DNA de um único mosquito* (modificado de Bender et al (1983)). (1) a (3) correspondem ao DNA extraído de *A. aegypti*; e (4) a (6) correspondem ao DNA extraído de *A. albopictus*.

Um outro método foi utilizado com o intuito de se obter melhor recuperação do material extraído, *Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit* (Nucleon). O kit demonstrou superioridade na qualidade de visualização das bandas de DNA de *A. albopictus* em comparação ao método anterior, porém essa superioridade não foi reprodutível para todas as amostras, como mostra a **figura 12**.

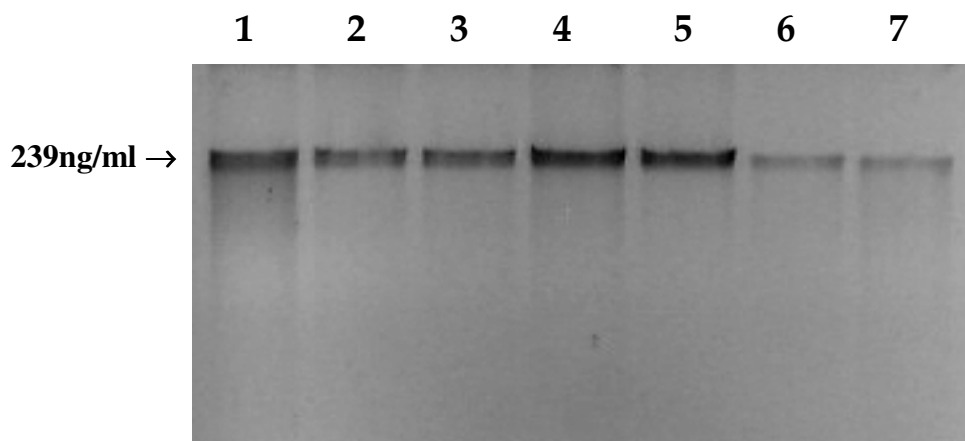


Figura 12. Quantificação de DNA extraído com o kit *Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation* (Nucleon). (1) a (3) correspondem ao DNA extraído de *A. aegypti*; e (4) a (7) correspondem ao DNA extraído de *A. albopictus*.

O método de extração de DNA finalmente escolhido para esse trabalho foi o realizado com a utilização da resina *Chelex*, que resultou em maior quantidade de amostra final (200µl). Apesar de diluído, esse material se apresentou de qualidade superior, garantindo os melhores resultados nas reações de *PCR*.

4.2. Reação de *PCR* para detecção da bactéria *Wolbachia*

Os fragmentos do gene *wsp* do DNA de *Wolbachia* foram amplificados pelos oligonucleotídeos *wsp* 81F e *wsp* 691R como pode ser observado na **figura 13**.

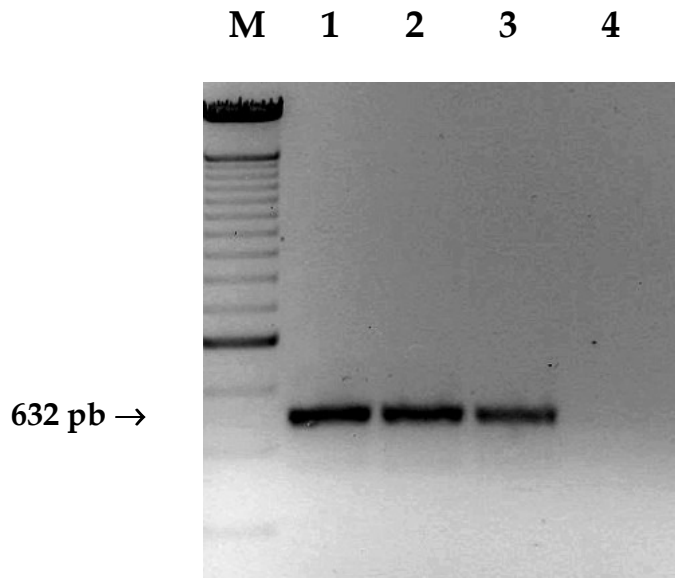


Figura 13. Reação de *PCR* de amostras de *A. albopictus*. (M) Padrão de peso molecular (250pb), colunas de 1 e 2 correspondem ao produto da amplificação de *wsp*, (3) controle positivo e (4) controle negativo.

Tanto as amostras que apresentaram produto para *wsp* quanto aqueles que a princípio foram negativos para essa amplificação, foram submetidas a uma segunda reação, de *semi-nested PCR*, que é mais sensível, para detecção das diferentes linhagens da bactéria *Wolbachia* e confirmação da negatividade. Os experimentos foram realizados utilizando os produtos do primeiro *PCR* diluídos 1000 vezes, como mostra a **figura 14**.

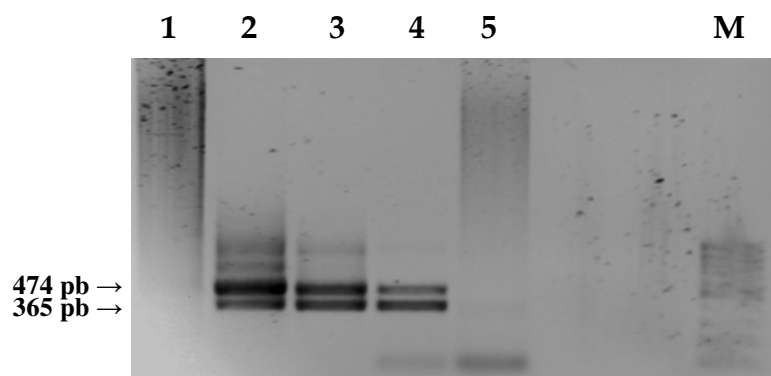


Figura 14. Reação de *semi-nested PCR* de amostras de *A. albopictus*. (M) Padrão de peso molecular (100pb); colunas 1, 2, 3 e 4 correspondem ao produto das reações de *semi-nested PCR* a partir dos produtos do *PCR* de *wsp* em diferentes diluições: não diluído, 100X, 500X, 1000X (respectivamente); e a coluna 5 corresponde ao controle negativo da reação.

Nenhum exemplar testado da espécie *A. aegypti* foi positivo para infecção por *Wolbachia*.

De um total de 70 mosquitos *A. albopictus* analisados, 32 indivíduos foram positivos para presença da *Wolbachia* (**tabela 2**). Durante esse período pudemos observar o seguinte quadro: na primeira coleta 61,7% dos mosquitos se apresentaram infectadas pela bactéria, já nas coletas subseqüentes, as freqüências da infecção caíram bastante, na segunda para 26,9% e na terceira para 40%. Nas três coletas sempre o número de fêmeas infectadas foi muito próximo ao de machos, totalizando 53,1% para 46,9%, respectivamente. Antes da realização do *semi-nested PCR* essa proporção era de 70,9% para 29,1%, respectivamente, denunciando um alto número de falsos negativos principalmente em machos.

Tabela 2. Quadro-resumo dos resultados de infecção por *Wolbachia* para os mosquitos *A. albopictus* analisados nas três diferentes ocasiões de coleta.

	Nº de indivíduos analisados	Positivos para <i>Wolbachia</i>		Linhagens	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
1ª coleta	34	10	11	A(2) e AB(8)	A(3) e AB(8)
2ª coleta	26	3	4	AB	AB
3ª coleta	10	2	2	AB	AB
TOTAL	70	15	17		

A população de mosquitos de Botucatu analisados e positivos para a infecção por *Wolbachia* apresentaram tanto a simples infecção pela linhagem *wAlbA* (365pb) quanto à superinfecção por *wAlbA* (365pb) e *wAlbB* (474pb). Porém, a superinfecção foi detectada em 84,4% dos casos positivos contra apenas 15,6% da simples infecção.

Um outro experimento foi feito para determinar a distribuição tissular de *Wolbachia* dentro do organismo do mosquito. Machos e fêmeas foram dissecados individual e separadamente para obtenção das seguintes partes: tecido nervoso (cabeça), testículos e ovários (porção final do abdômen), corpo gorduroso (tórax) e trato digestivo (porção média do abdômen). Evidenciando a sua preferência pelos tecidos reprodutivos como mostra a **figura 15**. Esse experimento foi repetido para 5 indivíduos de cada sexo e demonstrou o mesmo perfil.

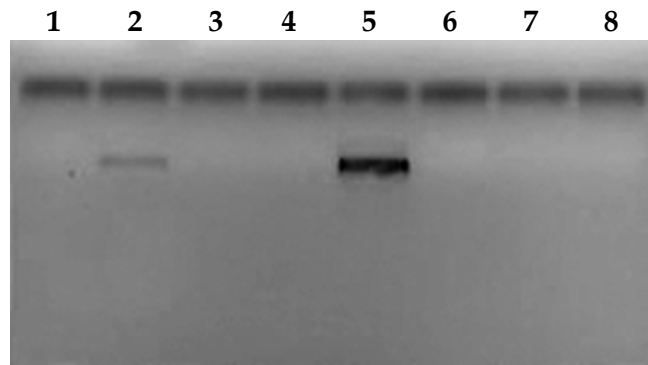


Figura 15. Distribuição tissular da *Wolbachia* em *Aedes albopictus*. (1) Tecido nervoso, (2) Testículos, (3) Corpo gorduroso, (4) Trato digestivo - de machos, (5) Ovários, (6) Tecido nervoso, (7) Corpo gorduroso e (8) Trato digestivo - de fêmeas.

4.3. Colonização e manutenção dos mosquitos infectados

Diante da positividade da infecção nos mosquitos *A. albopictus* para *Wolbachia*, uma colônia dessa população foi estabelecida em nosso insetário.

A partir da colônia de *A. albopictus* naturalmente infectada e estabelecida no nosso insetário, experimentos para os tratamentos de aquecimento e uso de antibiótico (tetraciclina) foram aplicados. Os procedimentos e seus resultados estão detalhados a seguir.

4.4. Obtenção de colônia não-infectada pela *Wolbachia*

Os resultados dos diferentes tratamentos para larvas e adultos por antibióticos e aumento da temperatura de criação estão apresentados separadamente a seguir:

Tratamento das larvas com tetraciclina

Três bandejas contendo 50 larvas recém-eclodidas (L₁) cada e acrescidas do antibiótico a 0,1% (p/v) em solução aquosa foram observadas. Um alto índice de mortalidade foi observado nos quatro testes, totalizando uma média de 80% de mortalidade.

Tratamento dos adultos com tetraciclina

Três gaiolas contendo 50 indivíduos adultos cada (metade de fêmeas e metade de machos) foram acompanhadas quanto à presença de fonte nutritiva açucarada adicionada de antibiótico a diferentes concentrações: 0,4%, 0,3%, 0,2% e 0,1% (p/v). Conforme a diminuição da concentração final do antibiótico na solução alimentícia a taxa de mortalidade nos adultos em tratamento diminuiu consideravelmente: 50%, 40%, 20% e 10%, respectivamente.

Tratamento das larvas por aquecimento

Três bandejas contendo 50 larvas recém-eclodidas (L₁) foram colocadas em B.O.D (câmara de criação com fotoperíodo e temperatura controlados) a 32°C resultando em boa manutenção dos mosquitos na fase larvária nessa temperatura. A taxa de mortalidade foi de aproximadamente 10%.

Tratamento dos adultos por aquecimento

Três gaiolas contendo 50 indivíduos adultos cada (metade de fêmeas e metade de machos) foram acompanhadas quando colocadas em B.O.D a 32°C para criação. Cerca de 60% dos mosquitos morreram a essa temperatura.

Diante deste quadro, a conduta mais adequada seria tratamento das larvas por aquecimento e dos adultos por antibiótico, porém a postura das fêmeas referente à criação larval a 32°C foi bastante afetada, reduzindo-se à cerca da metade da postura na condição do insetário (28°C). Por isso o único tratamento aqui aplicado foi o tratamento por antibiótico.

O tratamento por antibiótico a 0,1% nos adultos demonstrou bons resultados na cura dos mosquitos infectados por *Wolbachia*, já na segunda geração os primeiros machos curados começaram a aparecer. Exceto pela nula produtividade de ovos viáveis que teve de ser solucionada pela padronização de um regime de oferecimento de antibiótico. Inicialmente os mosquitos receberam diariamente na solução açucarada 0,1% de tetraciclina, depois receberam em dias alternados, receberam também a cada dois dias, e assim sucessivamente. O regime ideal de tratamento foi estabelecido por 3 dias de oferecimento do antibiótico e no dia seguinte alimentação sanguínea e obtenção de ovos. Dessa maneira foi possível obter postura das fêmeas e atualmente na 8ª geração, 100% de cura em machos e 60% cura em fêmeas. Os machos foram os primeiros indivíduos a serem curados.

4.5. Ensaio biológicos

Como não foi possível a obtenção da colônia dos mosquitos livres da infecção pela *Wolbachia*, os experimentos biológicos só puderam ser concluídos com a colônia de *A. albopictus* infectada. Exceto para os experimentos de variação climática, todos os ensaios foram procedidos dentro do insetário à temperatura média de 28°C e umidade relativa em torno de 90%.

4.5.1. Frequência dos sexos

Esse experimento mostrou que não houve desvio sexual para os mosquitos infectados por *Wolbachia*, como mostra a **figura 16**. Além das frequências finais observadas, foi analisado também o comportamento na emergência desses mosquitos, como mostra a **figura 17**. Nos gráficos pode-se observar que há dois picos de emergência de adultos, em tais picos tanto os machos quanto as fêmeas emergiram juntos e essa proporção foi muito próxima (E1), ou com fêmeas emergindo em maior proporção (E2 e E3).

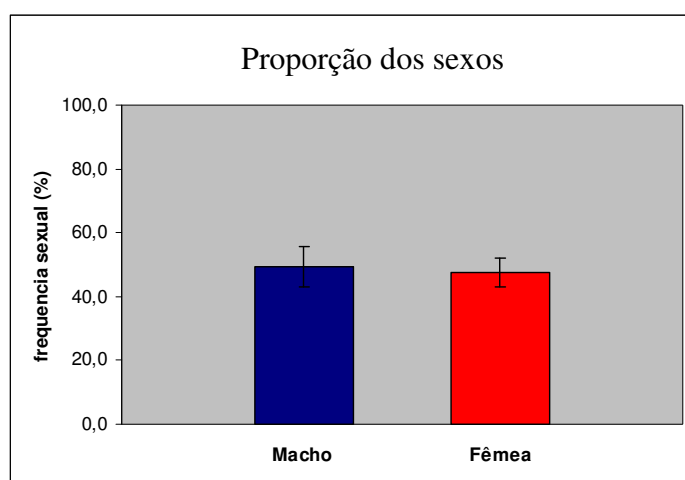


Figura 16. Proporção sexual observada em *A. albopictus* com *Wolbachia*.

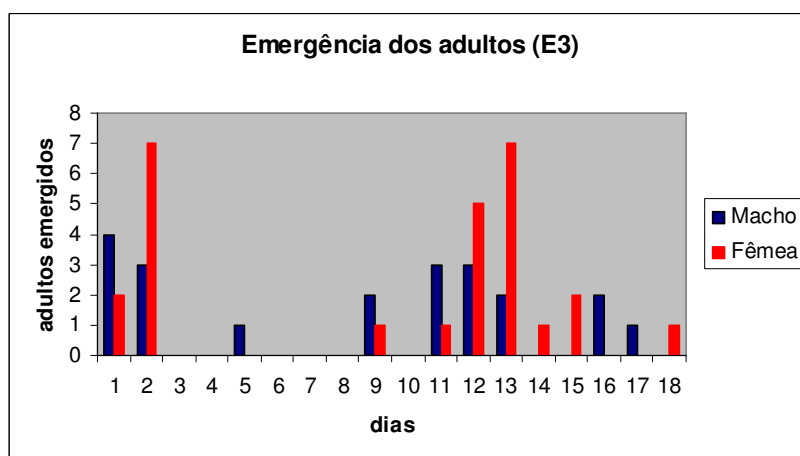
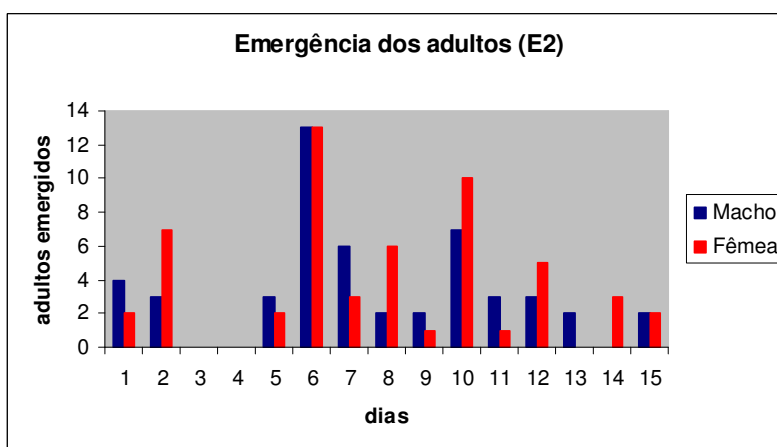
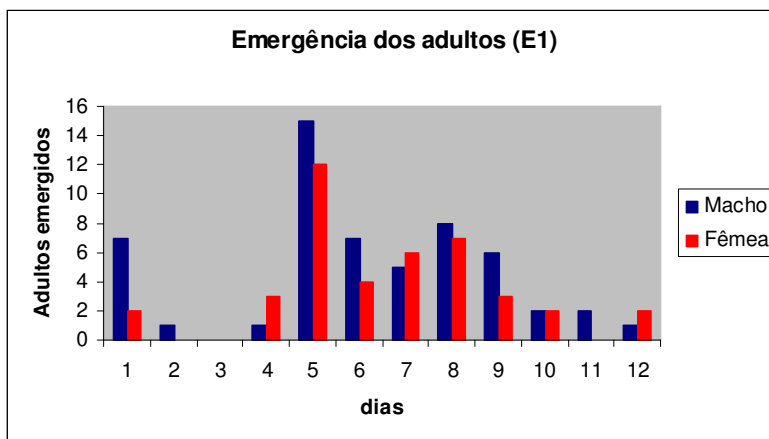


Figura 17. Gráficos da emergência dos indivíduos adultos, segundo ao sexo, em função do tempo, nas três repetições (E1, E2, E3).

Como já mencionado, não foi possível realizar os ensaios biológicos para os mosquitos sem *Wolbachia*, porém com a colônia em tratamento por antibiótico na 9ª geração foi possível observar uma interessante alteração no comportamento de emergência dos adultos de *A. albopictus*, esse resultado está apresentado na **figura 18**. Podemos claramente observar que, diferentemente da colônia com *Wolbachia*, há um primeiro pico de emergência predominante masculino (dia 1) e um segundo, feminino (dia 3).

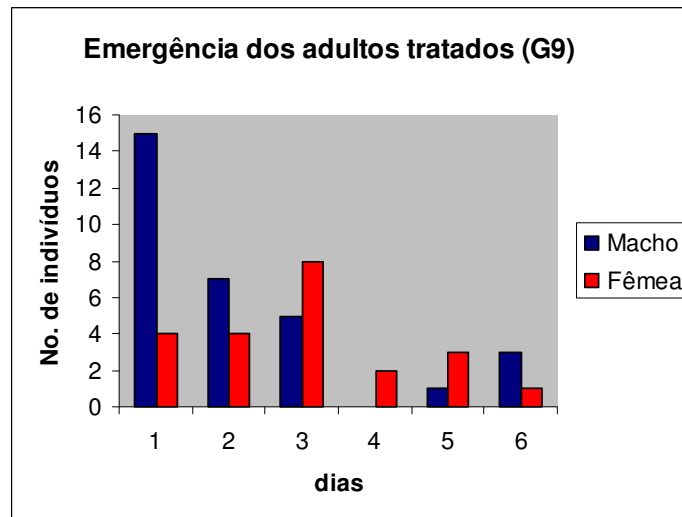


Figura 18. Gráfico da emergência dos indivíduos adultos, segundo ao sexo, em função do tempo na colônia em tratamento na 9ª geração.

4.5.2. Taxa de sobrevivência (longevidade)

Os resultados do experimento da longevidade larval e dos adultos dos mosquitos com *Wolbachia* estão apresentados separadamente em dois itens.

➤ Longevidade larval

O resultado do ensaio de longevidade com larvas mostrou uma taxa de eclosão de $52,5\% \pm 12,6$. O tempo médio de desenvolvimento larval foi de $6,5$ dias $\pm 0,9$. A mortalidade larval média observada foi de $33,7\% \pm 11,4$. O alto desvio padrão observado para mortalidade larval pode ser explicado devido ao aumento dessas mortalidades conforme número inicial maior de ovos por pote de criação, caracterizando a competitividade dessas larvas por espaço e comida.

➤ Longevidade dos adultos

O resultado do ensaio de longevidade com adultos está demonstrado nos gráficos da **figura 19**. As curvas de sobrevivência para os indivíduos machos e fêmeas foram comparadas usando o método *Kaplan-Meier* e o teste *Log-Rank*. Como podemos observar nas três repetições as fêmeas possuíram sobrevivência significativamente maior em relação aos machos. Os machos tiveram um tempo médio de vida de $20,86$ dias $\pm 0,28$, enquanto as fêmeas em média viveram mais, $42,55$ dias $\pm 2,14$.

Curva de sobrevivência de adultos

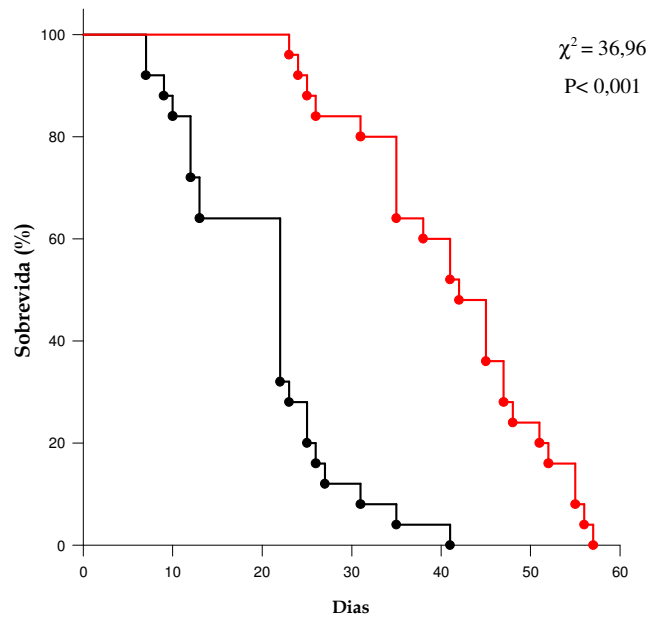


Figura 19. Curva de sobrevivência de adultos, machos (em preto) e fêmeas (em vermelho), em função do tempo.

4.5.3. Fecundidade

O experimento a respeito da fecundidade das fêmeas de mosquito infectadas por *Wolbachia* mostrou uma produção média de 29,4 ovos/fêmea \pm 13,4. O resultado desse experimento está demonstrado na figura a seguir:

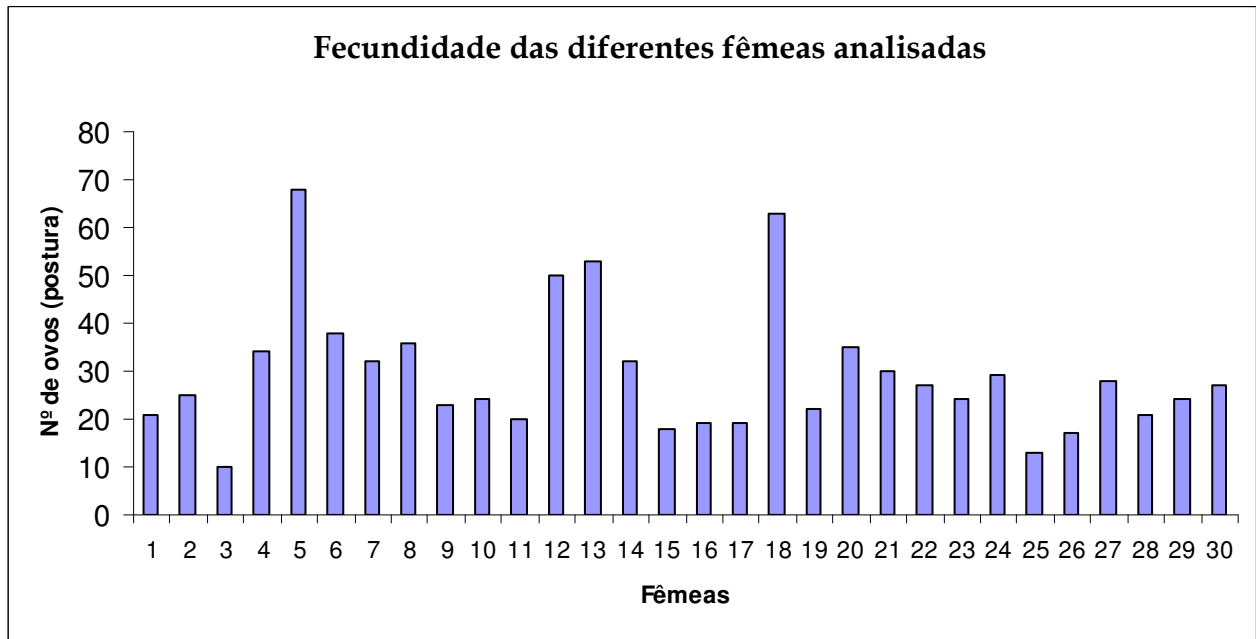


Figura 20. Perfil de fecundidade das diferentes fêmeas da colônia analisadas.

Como podemos notar nesta figura, há uma variação comum na oviposição das diferentes fêmeas envolvidas, contudo os quatro picos discrepantes: fêmeas 5, 12, 13 e 18 (vide figura) correspondem à segunda oviposição desses indivíduos, podendo ser um indicativo de maior eficiência das subseqüentes posturas em relação à primeira.

4.5.4. Variações de temperatura

O resultado das diferentes condições de temperatura sobre o desenvolvimento das formas imaturas dos mosquitos com *Wolbachia* está resumido na **tabela 3**.

Tabela 3. Tempos médios de desenvolvimento (em dias) das larvas e das pupas e respectivas mortalidades (%), sob diferentes condições de temperatura.

Experimento	Tempo médio de desenvolvimento larval	Tempo médio de desenvolvimento pupal	Mortalidade larval	Mortalidade pupal
15°C	29,7 dias \pm 1,32	5,6 dias \pm 0,45	61,3% \pm 5,0	54,1% \pm 8,1
20°C	15,5 dias \pm 0,5	4,8 dias \pm 0,28	8% \pm 2,8	25,1% \pm 3,0
28°C	8,3 dias \pm 0,8	1,9 dias \pm 0,02	2,7% \pm 0,9	2,1% \pm 2,9
32°C	5,0 dias \pm 0,5	1,2 dias \pm 0,02	10% \pm 6,5	9,4% \pm 3,5

Exceto na condição de 15°C, tanto adultos macho quanto fêmeas emergiram das pupas produzidas sob as demais condições de temperatura. Nas três triplicatas do experimento a 15°C apenas indivíduos masculinos foram produzidos, evidenciando a extrema sensibilidade das larvas femininas sob tal adversidade.

Como podemos observar pela tabela, os tempos de desenvolvimento médio larval e pupal diminuíram considerável e progressivamente conforme a temperatura aumentou. Além disso, a mortalidade das larvas e das pupas foi bem maior para a temperatura mais baixa de criação (15°C) enquanto que a condição mais favorável de criação foi a 28°C.

4.5.5. Condições do criadouro

Os resultados das diferentes densidades de criadouro sobre o desenvolvimento dos mosquitos com *Wolbachia* estão resumidos na **tabela 4**, e nas **figuras 21 e 22**.

A **tabela 4** traz os dados referentes à formação de pupa e emergência de adultos quanto ao sexo nas diferentes condições de criação inicial larval (n=10, n=100 e n=200).

Tabela 4. Quantidade de formação de pupas, emergência de adultos e frequência sexual referente às larvas de diferentes densidades de criadouro.

	% formação de pupa	% emergência de adultos	% machos	% fêmeas
n=10	100%	97% ± 4,71	55,9% ± 25,6	44,1% ± 25,6
n=100	97,3% ± 1,70	89,6% ± 7,72	56,7% ± 5,42	43,3% ± 5,42
n=200	98,5% ± 6,60	77,5% ± 10,63	48,7 ± 4,05	51,3% ± 4,05

Através desse experimento pudemos observar que a formação de adultos é mais prejudicada quando as larvas crescem em um criadouro mais denso. Não observamos desvio sexual em nenhuma das condições.

A **figura 21** traz as curvas de sobrevivências das formas adultas que resultaram dos três tratamentos de criação larval. Essas curvas foram obtidas através do método *Kaplan-Meier* e o teste *Log-Rank*. O tempo médio de vida para cada condição foi de (machos/fêmeas): 32 dias ± 3/ 51,5 dias ± 4,5 (n=10); 26 dias ± 2,42/ 46,6 dias ± 2,49 (n=100); e 26,7 ± 0,56/ 37,2 ± 2,31 (n=200).

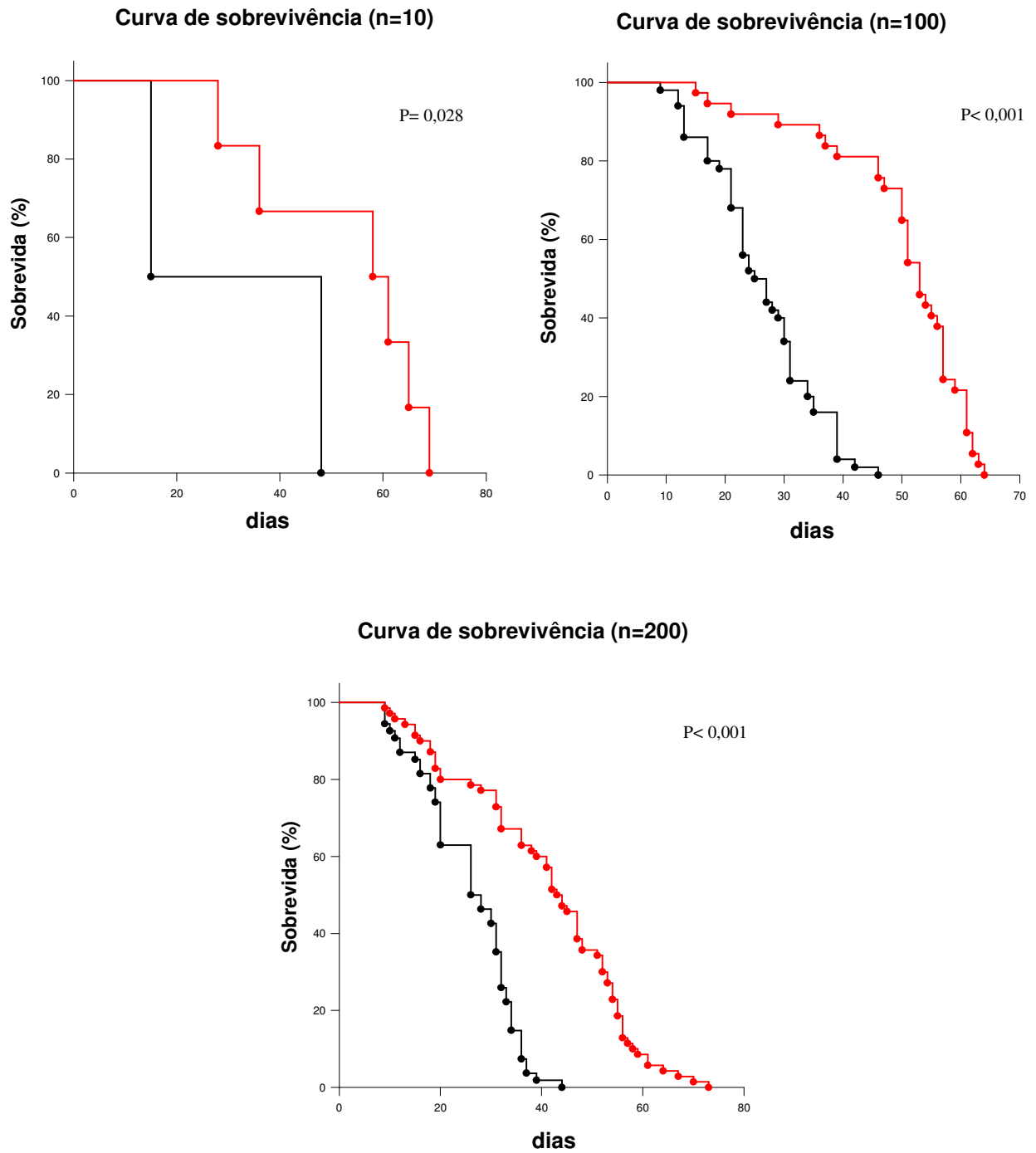


Figura 21. Curvas de sobrevivências de adultos, machos (em preto) e fêmeas (em vermelho), em função do tempo segundo condição de criação larval: n=10 – baixa densidade, n=100 – média densidade, e n=200 – alta densidade por pote de eclosão.

Podemos claramente observar pelas curvas que os indivíduos adultos femininos sobreviveram mais do que os machos independentemente da condição de criação larval. Além disso, os tempos médio de vida mostram que os adultos (tanto os machos quanto as fêmeas) vivem mais quando criados em baixas densidades de larva/pote de criação. Isso é possivelmente explicado pelo fato de haver mais espaço e comida para as larvas nessa condição.

A **figura 22** mostra que as fêmeas mantidas à densidade média (ideal) de criação são mais fecundas do que as demais. O resultado da fecundidade referente à baixa densidade de criação apresentou alto desvio padrão, isso se deu provavelmente ao número muito reduzido de machos emergidos por gaiola (da triplicata), reduzindo assim taxa cópula. As fêmeas menos fecundas são as mantidas em criadouro denso, provavelmente pela maior competição por alimento nesse espaço.

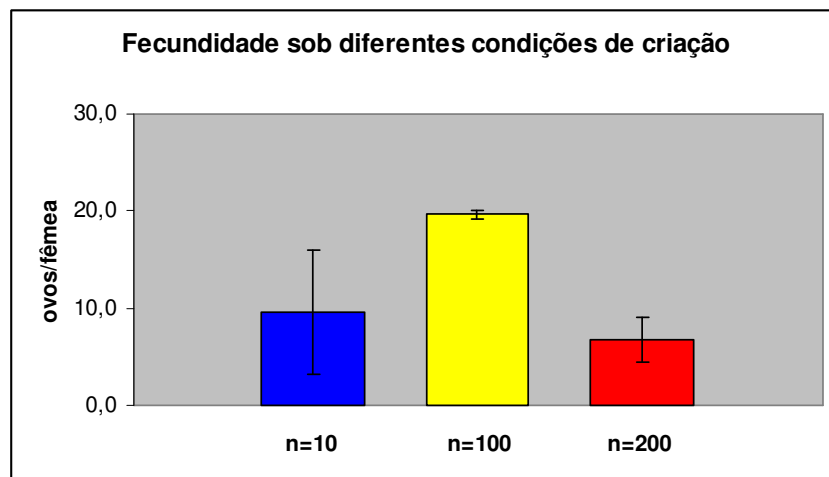


Figura 22. Fecundidade média das fêmeas crescidas nas três diferentes condições de densidade larval de criadouros (n=10, n=100 e n=200).

4.5.6. Disponibilidade de alimento

Os resultados dos diferentes regimes alimentares sobre o desenvolvimento dos mosquitos com *Wolbachia* estão resumidos na **tabela 5**, e nas **figuras 23 e 24**.

A **tabela 5** traz os dados referentes à formação de pupa e emergência de adultos quanto ao sexo nos diferentes regimes alimentares oferecidos às larvas (abundância nutritiva e restrição nutritiva). Notar que o regime de jejum não se encontra nessa tabela uma vez a produção de pupas foi zero para uma repetição e uma única para as outras duas repetições. Dessas pupas emergiram 1 macho e 1 fêmea.

Tabela 5. Quantidade de formação de pupas, emergência de adultos e frequência sexual referente às larvas submetidas a diferentes regimes alimentares.

	% formação de pupa	% emergência de adultos	% machos	% fêmeas
Abundância	92,6% ± 5,81	68% ± 1,18	47,1 ± 5,31	52,9% ± 5,31
Restrição	86% ± 11,31	94,1% ± 3,35	53,3 ± 11,59	46,7% ± 11,59

Podemos notar pela tabela que não houve alta mortalidade de larvas sob restrição calórica, pelo contrário, as pupas foram mais viáveis, resultando em maior porcentagem de emergência de adultos, do que aquelas produzidas diante do excesso de alimento. Nesse experimento também não observamos desvio sexual.

A **figura 23** traz as curvas de sobrevivências das formas adultas que resultaram dos três tratamentos de alimentação e das larvas em jejum. Essas curvas foram obtidas através do método *Kaplan-Meier* e o teste *Log-Rank*. O tempo médio de vida para cada condição foi de (machos/fêmeas): 36,7 dias ±

7,95/ 53,6 dias \pm 5,69 (restrição nutritiva); e 26,7 dias \pm 1,43/ 42,4 dias \pm 7 (abundância nutritiva). As larvas em jejum tiveram um tempo médio de vida de 17,9 dias \pm 1,99.

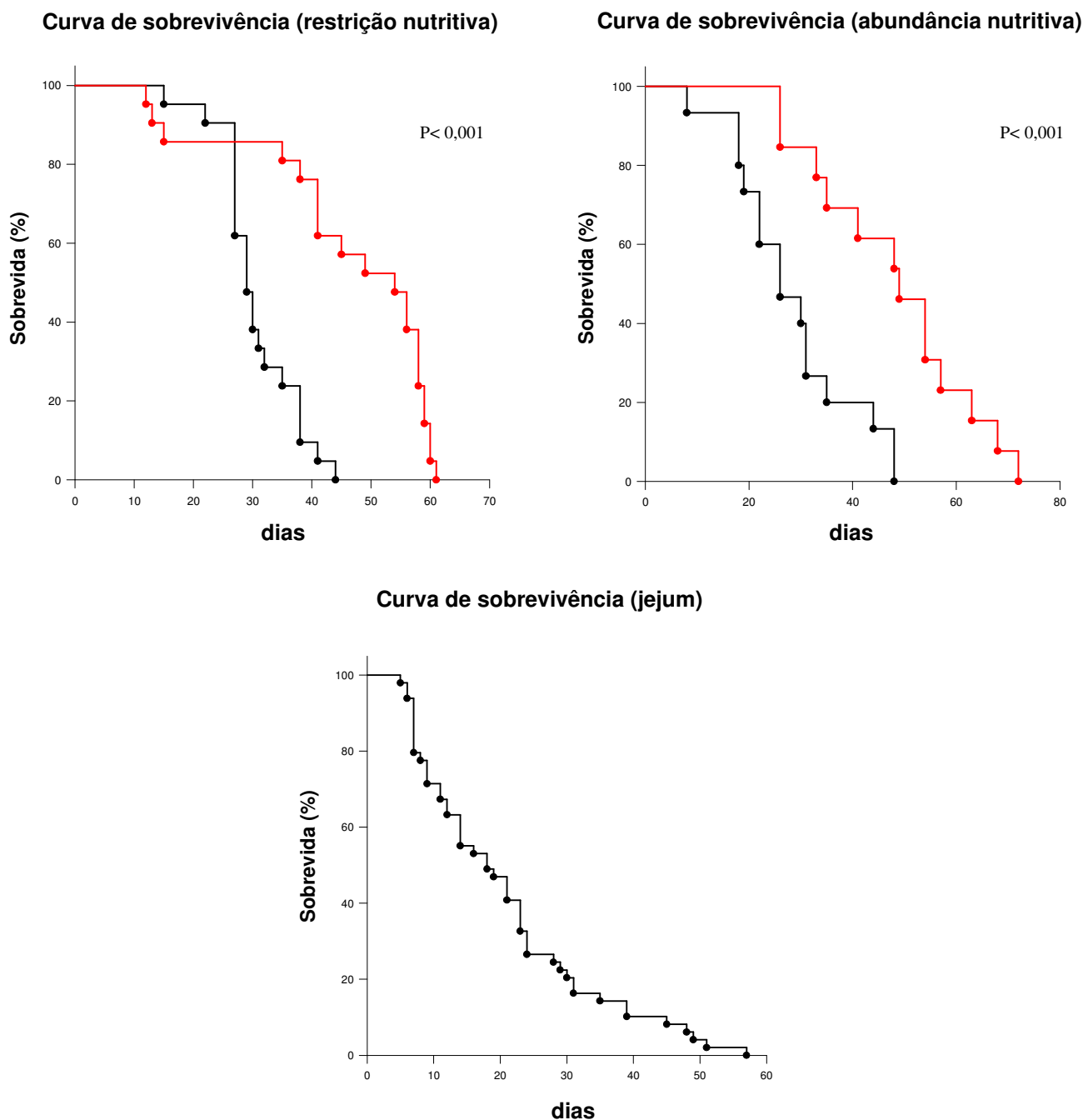


Figura 23. Curvas de sobrevivências de adultos, machos (em preto) e fêmeas (em vermelho), em função do tempo, segundo regime alimentar: restrição nutritiva e abundância nutritiva, e a curva de sobrevivência das larvas sob jejum.

Podemos claramente observar pelas curvas que os indivíduos adultos femininos novamente sobreviveram mais do que os machos, independentemente, nesse caso, do regime alimentar. Além disso, os tempos médio de vida mostram que os adultos (tanto os machos quanto as fêmeas) vivem mais quando alimentados com restrição calórica. A única desvantagem, se assim podemos dizer, observada pela restrição nutritiva dessas larvas foi o tamanho reduzido dos adultos resultantes.

A **figura 24** mostra que apesar de sobreviverem menos, as fêmeas mantidas diante de abundância alimentar são 2 vezes mais fecundas do que aquelas que cresceram sob restrição calórica. Os desvios padrões, nesses casos, foram muito semelhantes.

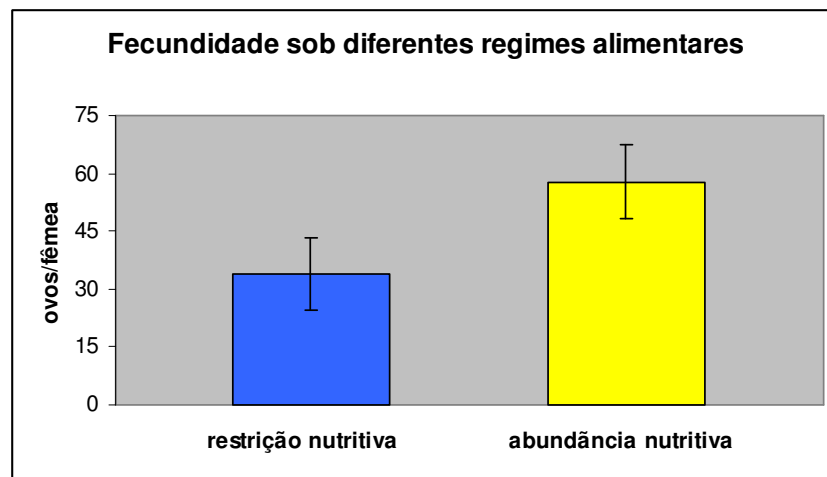


Figura 24. Fecundidade média das fêmeas mantidas sob os diferentes regimes alimentares (restrição nutritiva e abundância nutritiva).

4.6. Associação da bactéria *Wolbachia* com bacteriófagos WO e correlação com os níveis de incompatibilidade citoplasmática.

Foi detectada a associação entre o bacteriófago WO e a bactéria *Wolbachia* em todas as situações em que a bactéria estava presente nos testes de cruzamentos, como mostra a **tabela 6**. A tabela em questão mostra os 10 experimentos realizados, os quais foram aleatoriamente compostos por mosquitos da colônia, exceto pelos pares 9 e 10 cujas fêmeas foram selecionadas da colônia tratada (geração 8).

Tabela 6. Cruzamentos para avaliação da incompatibilidade citoplasmática diante das diferentes linhagens de *Wolbachia* e sua correlação com o bacteriófago WO.

Casal	Wolb		WO		Número de ovos	Larvas	% eclosão	Machos	Fêmeas
	♂	♀	♂	♀					
1	AB	A	+	+	44	3	7	1	2
2	A	A	+	+	60	30	50	13	15
3	A	A	+	+	64	36	56	15	11
4	AB	AB	+	+	49	32	65	19	13
5	AB	AB	+	+	59	57	96	23	34
6	AB	AB	+	+	40	25	62,5	7	12
7	AB	AB	+	+	59	40	68	20	15
8	AB	AB	+	+	38	35	92	22	10
9	A	-	+	-	41	4	9	2	2
10	AB	-	+	-	45	10	2	1	1

Os cruzamentos que resultaram em menor quantidade de eclosão foram os referente aos casais 1, 9 e 10, nessas três situações podemos observar a ocorrência de incompatibilidade citoplasmática, pois a prole foi drasticamente reduzida quando a fêmea não apresentou a bactéria (9 e 10), e quando a fêmea não possuía as mesmas linhagens de *Wolbachia* que o macho (incompatibilidade bidirecional). Por outro lado, os cruzamentos que resultaram nas maiores quantidades de produção de prole foram os dos casais 5 e 8 com 96 e 92% de

taxa de eclosão, respectivamente. É interessante destacar que nos casos de compatibilidade (casais 2 a 9), as maiores taxas de eclosão de ovos observadas foram quando as fêmeas estavam infectadas com ambas as linhagens de *Wolbachia*. Os pares 4, 6 e 7 (igualmente superinfectados) também apresentaram formação de prole, porém a taxa de eclosão ficou reduzida em relação aos outros cruzamentos dos casais 5 e 8 (65%, 62,5% e 68%, respectivamente). Isso pode ter ocorrido devido a diferenças nas densidades das linhagens envolvidas. Os casais restantes (2 e 3) tiveram, em média, a prole reduzida à metade, nesses, todos os membros constituintes dos casais apresentaram a linhagem A, evidenciando a ocorrência de uma incompatibilidade bidirecional de baixa penetrância, por um número reduzido da densidade bacteriana nas fêmeas.

4.7. Quantificação do bacteriófago associado à bactéria ao longo dos estágios de vida do mosquito hospedeiro

A diluição de DNA que se mostrou mais efetiva para os experimentos de PCR quantitativo em tempo real foi de 1:1 e as eficiências calculadas dos ONTs utilizados foi de 2,08 para o *Aeg S7* (endógeno) e 2,09 para o *WO ORF7*, estando muito próximo do valor ideal de 2,0.

O resultado dessa análise está apresentado na **figura 25**, o referencial para avaliação dessa quantificação é a forma de ovo, ou seja, podemos observar que em relação à forma embrionária do mosquito as larvas L1 possuem 10 vezes menos bacteriófago, as larvas L2 100 vezes menos, as larvas L3 e L4 1000 vezes menos, enquanto nas formas adultas há um aumento que nas fêmeas chega a 5 vezes.

Como o fago em questão está associado especificamente à bactéria *Wolbachia*, e considerando que esteja em ciclo lisogênico uma vez que esses mosquitos em questão não estavam sob condições ambientais adversas, podemos extrapolar o perfil observado para as densidades da bactéria em relação às células dos mosquitos nas suas diferentes formas evolutivas de vida.

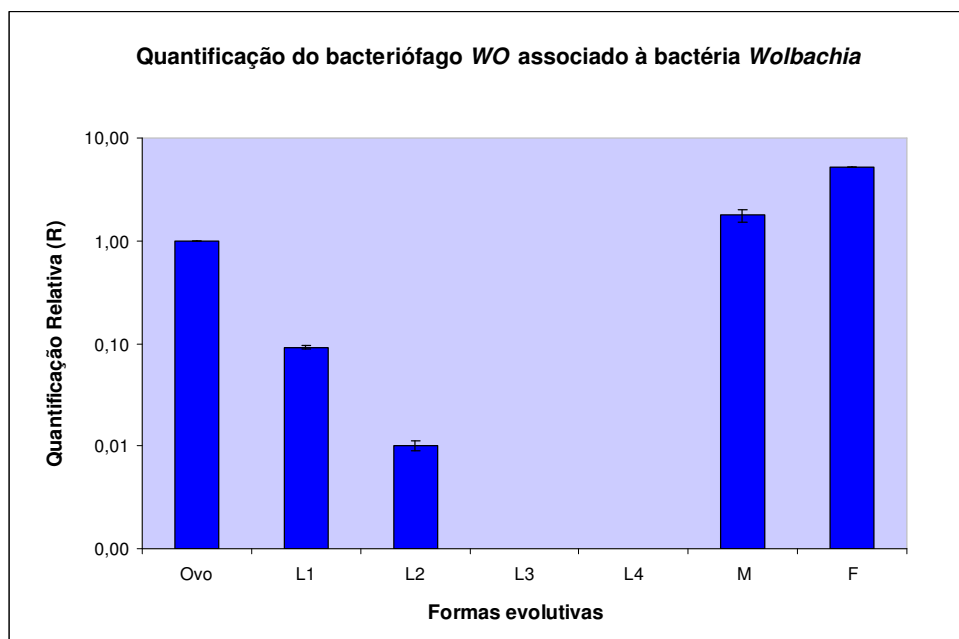


Figura 25. Quantificação relativa do bacteriófago *WO* nas diferentes formas evolutivas de *A. albopictus* expressa em escala logarítmica determinada através do *PCR* em tempo real.

4.8. Relação entre condição infectada e DNA mitocondrial dos mosquitos

A **figura 26** mostra a amplificação do fragmento do gene mitocondrial *ND4* (em torno de 400pb), um total de 10 fêmeas e 10 machos (ambos infectados e não-infectados) foi analisado quanto à similaridade das seqüências obtidas a partir desses fragmentos.

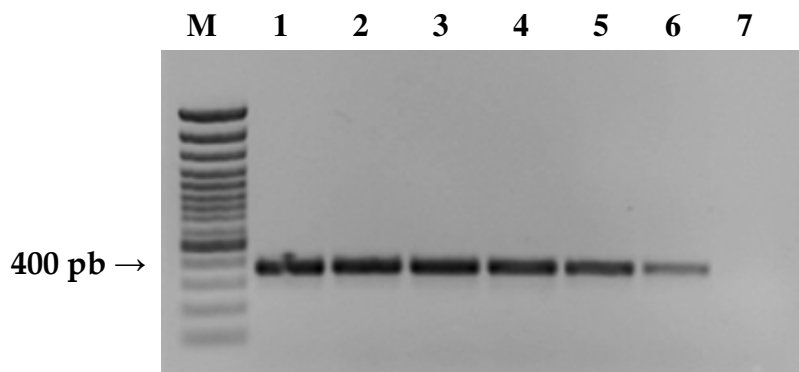


Figura 26. Reação de *PCR* do fragmento *ND4* de mosquitos infectados e não-infectados por *Wolbachia*. (M) Padrão de peso molecular (100pb), colunas de 1 a 5 correspondem ao produto da amplificação de *ND4*, (6) controle positivo e (4) controle negativo da reação.

As seqüências obtidas através do sequenciamento automático das amostras para esse fragmento foram alinhadas e comparadas em suas bases nucleotídicas. Nenhuma diferença foi observada entre indivíduos com *Wolbachia* e indivíduos sem a bactéria, evidenciando que o marcador utilizado não foi adequado para nosso propósito.

5. Discussão

Nossos resultados mostram uma frequência total de infecção de *Wolbachia* de 45,7% na população natural do mosquito vetor *Aedes albopictus* do município de Botucatu. Como podemos notar pela **tabela 2**, a distribuição dessa infecção variou nas três distintas ocasiões de coleta (60%, 27% e 40%), sugerindo que a taxa de transmissão natural de *Wolbachia* nessa população não seja tão alta como a prevalência de 100% de infecção encontrada por Kittayapong e colaboradores (2002) em uma população de *A. albopictus* da Tailândia. Falhas na transmissão da bactéria para prole foram mostradas por Hoffmann e Turelli (1997) em *Drosophila simulans* como resposta a condições ambientais que afetam o desenvolvimento larval e resultam na diminuição da infecção na prole. Em *A. albopictus* foi demonstrada acentuada diminuição da densidade bacteriana sob condição superpopulosa de criação (Sinkins & Dutton, 2004), fato esse que também pode ser uma contribuição para diminuição da eficiência da transmissão maternal de *Wolbachia* em *Aedes* em seu ambiente natural.

Por outro lado, uma alta frequência de superinfecção com as duas diferentes linhagens de *Wolbachia* (A e B) foi encontrada em nosso estudo, 84,4% em relação a simples infecção que foi de 15,6%. Esse quadro também foi observado no trabalho de Kittayapong, e por outros pesquisadores (Tsai et al., 2004), que têm sugerido que a condição superinfectada esteja presente nas populações do mosquito a um considerável tempo e que ambas as linhagens estejam perto da fixação, ainda mais se aliarmos o fato de que a superinfecção por si só, através do fenômeno da incompatibilidade citoplasmática, tenha uma vantagem em relação às simples infecções. Isso pôde ser constatado em nossos resultados uma vez que a linhagem A só esteve presente na primeira coleta e

desapareceu nas subseqüentes. Inclusive, em seu trabalho com quantificação linhagem-específica de *Wolbachia*, citado aqui no parágrafo anterior, Sinkins e Dutton mostraram que a linhagem A é mais sensível a influência de condições externas. Outra possível explanação seria a presença de antibióticos naturais no hábitat desses mosquitos que estariam reduzindo a densidade bacteriana, e conseqüentemente, a transmissão da infecção por *Wolbachia*, alternando os tipos das infecções encontradas nesses hospedeiros (Stevens & Wicklow, 1992).

Outro importante ponto a se destacar é em relação ao estudo da prevalência de infecção pela bactéria *Wolbachia* em populações naturais de hospedeiro via reação de *PCR* que deve ser obrigatoriamente necessária com a aplicação do *semi-nested PCR*, pois como apontamos no item 4.2 dos resultados, falsos negativos podem ocorrer e levar a uma interpretação errônea, nesse caso, a falsa sugestão de feminização uma vez que as fêmeas seriam encontradas com maior taxa de infecção, por exemplo. No trabalho já referido de Sinkins e Dutton, o aumento da sensibilidade de detecção por *semi-nested PCR* também foi observado e comentado.

Foi determinado pelo nosso estudo, também por *PCR* do fragmento de *wsp*, o tropismo da bactéria *Wolbachia* exclusivamente pelos tecidos reprodutivos dos mosquitos machos e fêmeas de *A. albopictus* (**figura 15**). O tropismo da bactéria por tecidos somáticos e reprodutivos foi avaliado por Dobson e colaboradores (1999) em vários insetos, inclusive em *A. albopictus* (Houston), que apresentou, diferentemente do nosso caso, um padrão disseminado da infecção pelos músculos, intestinos, túbulos de Malpighi, ovários e testículos. Por outro lado, Sinkins e colaboradores (1995b) também

detectaram a presença da bactéria exclusivamente em ovários e testículos de *A. albopictus*, populações de Koh Samui e Mauritius, em níveis muito baixos. Assim, nós sugerimos que na população de Botucatu as bactérias presentes estejam em níveis baixos tais que sua disseminação pelo resto do organismo do mosquito não seja possível ou detectada. Os baixos níveis de *Wolbachia* podem ser explicados pela hipótese de que a infecção da bactéria em nossos mosquitos seja recente, uma vez que a detecção da bactéria foi de apenas 45,7%.

A colonização dos mosquitos *A. albopictus* infectados pela bactéria *Wolbachia*, apesar do longo tempo requerido, cerca de seis meses até o início de sua utilização, foi efetivada com sucesso. Por outro lado, a obtenção da colônia livre de infecção por *Wolbachia* ainda não foi possível e os ensaios biológicos referentes a esses mosquitos não foram concluídos. Porém, algumas observações foram feitas a respeito da biologia dos *A. albopictus* que não é tão detalhada na literatura em contraste do que se observa para espécie *A. aegypti*.

Assim como no nosso caso, Dobson e Rattanadechakul (2001) tiveram alta mortalidade das larvas tratadas com antibiótico e a concentração por eles usada foi ainda maior, 0,5% (p/v). O tratamento por aquecimento também não surtiu bons resultados e a melhor opção foi administrar antibiótico, tetraciclina, a uma concentração final de 0,1% na solução açucarada para os adultos, como realizado para esse trabalho. O oferecimento diário da solução contendo o antibiótico inviabilizava o desenvolvimento dos embriões provavelmente por ser uma superdose e eliminar bactérias da flora natural desses insetos.

Apesar de não finalizarmos os experimentos biológicos para os mosquitos sem *Wolbachia*, conseguimos observar pela **figura 17** que os

mosquitos em tratamento com antibiótico mostraram um perfil diferente de emergência de adultos quanto ao sexo, comparado com a colônia infectada, como mostrou a **figura 17**. No gráfico da figura 16, podemos claramente observar um pico anterior de emergência de machos seguido por outro de emergência de fêmeas que não é encontrado em *A. albopictus* infectado com *Wolbachia*. Um fato interessante é que para *A. aegypti*, espécie ainda não encontrada infectada pela bactéria, também se pode notar a emergência dos adultos masculinos antes dos femininos (Rees, 1901; Gordon, 1922), fazendo-nos acreditar que a mudança deste comportamento possa estar relacionada à presença da *Wolbachia*. Isso pode ocorrer pela diminuição do tempo de desenvolvimento larval das fêmeas. Talvez, para *Wolbachia* seja mais interessante que muitas fêmeas hospedeiras já estejam à espera do macho no ambiente para cópula, uma vez que mediante a incompatibilidade citoplasmática a condição do hospedeiro feminino seja determinante para o sucesso dos cruzamentos.

Ainda que inconclusivos, os demais ensaios biológicos geraram informações a respeito da biologia dos mosquitos *A. albopictus* com a infecção por *Wolbachia*. A **figura 16** mostra que nesses mosquitos não há desvio sexual na produção dos adultos, como era o esperado uma vez que *Wolbachia* não é cogitada como agente de feminização em *A. albopictus*. Como podemos observar na **figura 19**, pelas curvas de sobrevivência dos adultos machos e fêmeas criados a condições ideais de criação (28°C; 80% de umidade; e alimentação padrão de insetário), as fêmeas apresentaram um tempo médio de vida duas vezes maior do que os machos ($P < 0,001$). Dobson e colaboradores (2004) mostraram que fêmeas de *A. albopictus* com simples ou dupla infecção por

Wolbachia viviam significativamente mais do que as fêmeas não-tratadas. Os resultados do experimento de longevidade larval mostraram que o tempo médio de vida para as larvas foi de 6 dias \pm 0,9, assim como por Kamimura e colaboradores (2002). O alto desvio padrão encontrado para a média das taxas de eclosão (52,5% \pm 12,6) reflete os possíveis cruzamentos incompatíveis na colônia de mosquitos, uma vez que a mesma foi estabelecida a partir dos mosquitos coletados, infectados simples ou duplamente pelas linhagens de *Wolbachia*. A fecundidade média das fêmeas de *A. albopictus* foi obtida pela análise da **figura 20**, pudemos observar 4 picos discrepantes na figura (5, 12, 13 e 18), esses pontos correspondem à segunda oviposição dessas fêmeas, sugerindo sua eficiência em relação à primeira postura.

Quanto à influência das diferentes temperaturas sob a longevidade larval, podemos ver pela **tabela 3** que a temperatura de criação é inversamente proporcional ao tempo de desenvolvimento larval, assim como foi mostrado por Kamimura e colegas (2002). As larvas crescidas a 15°C viveram cerca de um mês até a fase pupal e originaram apenas adultos machos, diferentemente para as outras temperaturas que produziram machos e fêmeas em proporções próximas de 1:1, evidenciando uma maior sensibilidade das larvas femininas a essa adversidade em relação à masculina. Este resultado pode estar relacionado com uma maior densidade de bactérias nas fêmeas em comparação com os machos.

Quanto à influência de diferentes condições populacionais de larvas em criadouro (baixa, média e alta), podemos ver na **tabela 4** que a formação de adultos é mais prejudicada quando as larvas são criadas à condição de maior

densidade. Como a competição por espaço e comida nessa condição deve ser maior e uma vez que a fase pupal é a única na qual o mosquito não se alimenta talvez as pupas resultantes da condição populosa de criadouro não consigam obter um estoque energético suficiente para que a emersão dos adultos ocorra com sucesso. Pela curva de sobrevivência dos adultos resultantes das diferentes condições de criação apresentada na **figura 21** podemos notar que as fêmeas continuam tendo uma sobrevivência maior em relação aos machos. Então podemos concluir que a densidade populacional de larvas não interfere na sobrevivência dos adultos. Porém, a fecundidade dessas fêmeas ficou reduzida quando as larvas não foram criadas a condição média de densidade (**figura 22**), possivelmente pela falta de nutrientes da condição densa e pela competição pelos poucos machos da condição menos populosa.

Quanto à influência dos diferentes regimes alimentares, a **tabela 5** mostra que sob restrição calórica quase todas as pupas emergem em adultos, além de garantir um tempo médio de vida maior para os adultos, principalmente para fêmeas (**figura 23**). Davies e colaboradores (2005) também demonstraram, em mosca da fruta (*Ceratitis capitata*) que a restrição calórica prolonga o tempo de vida desses insetos. Sob o regime de jejum, as larvas viveram um tempo médio de 17,9 dias \pm 1,99, e em duas repetições uma pupa foi formada com a emersão de adultos. Sugerimos que este quadro só foi possível graças ao canibalismo exercido pelas larvas devido à ausência de alimentos. O fenômeno de canibalismo larval em mosquitos também foi demonstrado por Koenraadt e colaboradores (2003), em *Anopheles gambiae*. Apesar de encurtar o tempo de vida

dos adultos, a alimentação altamente calórica na fase larval aumentou em duas vezes à fecundidade dessas fêmeas (**figura 24**).

Os testes de cruzamentos realizados com 10 diferentes casais formados aleatoriamente, ilustraram muito bem o quadro do fenômeno da I.C. observado em *A. albopictus*. Desde que não foi possível a realização do cruzamento com parentais curados da infecção por *Wolbachia*, podemos usar como parâmetro a taxa de eclosão de 50% em *A. aegypti* (dados não publicados) que não se encontra infectado por *Wolbachia*. A taxa de eclosão referente à postura das fêmeas superinfectadas pelas duas linhagens de *Wolbachia* variou de 65 a 96% como mostra a **tabela 6**, mostrando que as fêmeas infectadas com as duas linhagens de *Wolbachia* possuem uma vantagem nesse sentido. O trabalho de Dobson e colegas (2004), assim como nossos resultados, também mostraram que cruzamentos compatíveis de fêmeas superinfectadas resultavam em maior taxa de eclosão, em comparação com o cruzamento de fêmeas não infectadas. Contudo, os pesquisadores também observaram maior produção de ovos por essas fêmeas, quadro esse que não foi constatado para nossas amostras, cuja média foi de 49 ovos/fêmea \pm 9 e 62 ovos/fêmeas das fêmeas com simples infecção. Além disso, nossas análises detectaram a associação entre o bacteriófago *WO* e a bactéria *Wolbachia* em todos os casos no qual a bactéria estava presente, fato que deverá receber maior atenção em um futuro estudo mais aprofundado a respeito das variações da incompatibilidade citoplasmática correlacionadas a esses dois microrganismos associados, como mostraram recentemente Bordenstein e colaboradores (2006). Chauvatcharin e colegas

(2006) também detectaram a associação entre *Wolbachia* e bacteriófago WO em diversas espécies de mosquito, inclusive em *Aedes albopictus*.

O perfil de infecção do bacteriófago WO e, por extrapolação, da bactéria *Wolbachia* nas diferentes formas evolutivas de vida de um hospedeiro está demonstrado na **figura 25**. O experimento realizado pela quantificação relativa do fago em relação às células do hospedeiro, por PCR quantitativo em tempo, mostrou que depois da eclosão há uma progressiva queda em escala logarítmica da densidade da bactéria que só volta a crescer nos adultos, sendo maior nas fêmeas. O número maior de bactéria nas fêmeas em relação aos machos era de se esperar uma vez que a *Wolbachia* infecta o interior das células dos tecidos reprodutivos desses insetos (**figura 15**), onde há mais citoplasma em óvulo do que em espermatozóide. Por outro lado, a densidade diminuída nas larvas pode ser explicada pela substituição do tecido embrionário pelo tecido somático conforme se dá o desenvolvimento larval. As gônadas destinadas aos adultos começam a se desenvolver de maneira lenta nas primeiras fases larvais, acelerando suas mitoses só no 4º estágio larval (Clements, 1983). Quanto aos ovos, Frydman e colaboradores (2006) mostraram que a bactéria *Wolbachia* possui um tropismo por um nicho de células-tronco. Quando injetada no abdômen de fêmeas de *Drosophila melanogaster*, a bactéria atravessa uma série de barreiras celulares até atingir a linhagem germinativa das fêmeas. A próxima etapa deste experimento será a confirmação desses achados pela avaliação direta das densidades relativas de *Wolbachia* através do uso de oligonucleotídeos específicos da bactéria no PCR quantitativo em tempo real.

Por fim, nossa última análise, por sequenciamento do fragmento do gene mitocondrial *ND4*, de indivíduos coletados com e sem a infecção de *Wolbachia* não demonstrou divergência entre esses genomas. Estudos relacionando variação no mtDNA dentro e entre diferentes populações de *A. albopictus* infectados por *Wolbachia* mostram realmente um baixo nível de diversidade mitocondrial em relação à nuclear (Armbruster et al., 2003). Talvez, o marcador *ND4* não seja o mais apropriado para esse tipo de análise, de *A. albopictus* infectado por *Wolbachia*.

6. Conclusões

Os mosquitos *Aedes albopictus* do município de Botucatu estão infectados pela bactéria endossimbionte *Wolbachia* num total de 45,7% dos mosquitos coletados e analisados. A superinfecção pelas linhagens *wAlbA* e *wAlbB* demonstrou predominância em relação a simples infecção por *wAlbA*.

A bactéria *Wolbachia* nesses mosquitos apresentou tropismo exclusivo pelo tecido reprodutivo.

Wolbachia não causa desvio na proporção sexual de *A. albopictus*, porém há indícios de que esteja relacionada com picos femininos anteriores de emergência dos adultos em relação aos machos.

As diferentes temperaturas de criação estão inversamente relacionadas ao tempo de desenvolvimento das formas imaturas dos mosquitos. A condição mais adversa para as larvas foi a de 15°C, enquanto a mais favorável foi de 28°C.

A condição superpopulosa de criação reduziu o número final de adultos emergidos, resultado da competição por espaço e comida dessas larvas. As fêmeas mantidas em densidade média (ideal) são mais fecundas.

A restrição calórica aumenta o tempo de sobrevivência dos mosquitos. Por outro lado, as fêmeas mais fecundas foram as que receberam uma dieta abundante. Sob jejum, as larvas exercem canibalismo para conseguir sobreviver.

A condição superinfectada das fêmeas de *A. albopictus* por *Wolbachia*, além de garantir a esperada compatibilidade de cruzamento com qualquer parceiro, mostrou maior produção de prole em relação a outros cruzamentos compatíveis.

O bacteriófago *WO* específico de *Wolbachia* também está presente nos mosquitos da nossa colônia. As densidades dos fagos e, por extrapolação, das bactérias são reduzidas drasticamente nas larvas, depois retornam aos níveis altos em adultos, principalmente nas fêmeas.

7. Referências Bibliográficas

ARMBRUSTER, P., DAMSKY, W.E., GIORDANO, R., BIRUNGI, J., MUNSTERMANN, L.E. CONN, J.E., 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(3)**: 356-360.

BAZZOCCHI, C., JAMNOGLUK, W., O' NEILL, S., ANDERSON, T., GENCHI, C., BANDI, C., 2000. *wsp* gene sequences from the *Wolbachia* of filarial nematodeos. *Curr Microbiol*, **41**: 96-100.

BEARD, C.B., O'NEILL, S.L., TESH, R.B., RICHARDS, F.F., AKSOY, S., 1993. Modification of arthropod vector competence via symbionts bacteria. *Parasitology Today*, **9**: 179-183.

BENDER, W., SPIERER, P., HOGNESS, D.S., 1983. Chromosome walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy loci* and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol*, **168**: 17-33.

BORDENSTEIN, S. R., MARSHALL, M. L., FRY, A. J., KIM, U., WERNEGREEN, J. J., 2006. The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. *Plos Pathogens*, **2 (5)** 384-393.

BORDENSTEIN, S. R., 2003. Symbiosis and the origin of species. In: Bourtzis K, Miller TM, editors. *Insect symbiosis*. New York: CRC Press. pp. 217-246.

BOURTZIS, K., BRAIG, H.R., KARR, T.L., 2003. Cytoplasmic incompatibility. In: Bourtzis, K., Miller, T.A. (Eds.), *Insect Simbiosis*. DRP Press, Boca Raton, 217-246.

BRAIG, H.R., ZHOU, W., DOBSON, S., O'NEILL, S.L., 1998. Clonning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. *J Bacteriol*, **180**: 2373-2378.

BREEUWER, J. A. A., STOUTHAMER, R., BURNS, D. A., PELLETIER, D. A., WEISBURG, W. G., WERREN, J. H., 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol Biol*, **1**: 25-36.

BREEUWER, J. A. A., WERREN, J. H., 1993. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics*, **135**: 565-574.

CASIRAGHI, M., 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, **122**: 93-103.

CHAUVATCHARIN, N., AHANTARIG, A., BAIMAI, V., KITTAYAPONG, P., 2006. Bacteriophage WO-B and *Wolbachia* in natural mosquito hosts: infection incidence, transmission mode and relative density. *Mol Ecol*, **15**: 2451-2461.

CLEMENTS, A.N., 1963. The physiology of mosquitoes. *International Series of Monographs on pure and applied biology*. The Macmillan Company, NY, **393pp**.

COLE, S.T., EIGLMEIER, K., PARKHILL, J., JAMES, K.D., THOMSON, N.R., WHEELER, P.R., HONORE, N., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., MUNGALL, K., BASHAM, D., BROWN, D., CHILLINGWORTH, T., CONNOR, R., DAVIES, R.M., DEVLIN, K., DUTHOY, S., FELTWELL, T., FRASER, A., HAMLIM, N., HOLROYD, S., HORNSBY, T., JAGELS, K., LACROIX, C., MACLEAN, J., MOULE, S., MURPHY, L., OLIVER, K., QUAIL, M.A., RAJANDREAM, M.A., RUTHERFORD, K.M., RUTTER, S., SEEGER, K., SIMON, S., SIMMONDS, M., SKELTON, J., SQUARES, R., SQUARES, S., STEVENS, K., TAYLOR, K., WHITEHEAD, S., WOODWARD, J.R., BARRELL, B.G., 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, **409 (6823)**: 1007-1011.

CONSOLI, R.A.G.B., LOURENÇO, R.O., 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz.

DAVIES, S., KATTEL, R., BHATIA, B., PETHERWICK, A., CHAPMAN, T., 2005. The effect of diet, sex and mating status on longevity in Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*), Diptera: Tephritidae).

DOBSON, S.L., RATTANADECHAKUL, W., MARSLAND, E.J., 2004. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity*, **93**: 135-142.

DOBSON, S.L., RATTANADECHAKUL, W., 2001. A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, **38(6)**: 844-849.

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 and Mol Biol*, **29**: 153-160.

DUMLER, S.J., BARBET, A.F., BEKKER, C.P.J., DASCH, GA, PALMER GH et al., 2001. 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* *Intl J System Evol Microbiol*, **51**: 2145-2165.

FEDER, M.E., KARR, T.L., YANG, W., HOEKSTRA, J.M., JAMES, A.C., 1999. Interaction of *Drosophila* and its endosymbiont *Wolbachia*: Natural heat shock and the overcoming of sexual incompatibility. *Am Zool*, **39**: 363-373.

FORATTINI, O.P., 2002. *Culicidologia Médica*, vol.02. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, **411 - 415**.

FORATTINI, O.P., 1986. Identificação de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev Saúde Pública*, **20**: 244-245.

FRYDMAN, H.M., LI, J.N., ROBSON, D.N., WIESCHAUS, E., 2006. Somatic stem cell niche tropism in *Wolabchia*. *Nature*, **441**: 509-512.

GHELELOVITCH, S., 1952. Sur le déterminisme génétique de la stérilité dans le croisement entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *C R Acad Sci Paris*, **24**: 2386-2388.

GOMES, A.C., BITENCOURT, M.D., NATAL, D., PINTO, L.S., MUCCI, L.F., DE PAULA, M.D., 1999. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. *Rev Saúde Pública*, **33**: 95-97.

GORDON, R.M., 1922. Notes on the bionomics of *Stegomyia calopus* in Brazil. *Am Trop Med Parasit*, **16**:425-439.

HERTIG, M., WOLBACH, S., 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J Med Res*, **44**: 329-374.

HOERAUF, A., MAND, S., ADJEI, O., FLEISCHAR, B., BUTTNER, D.H., (2001). Depletion of *Wolbachia* endobacteria in *Onchocherca volvulus* by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. *Lancet*, **352**: 1415-1416.

HOFFMANN, A.A., TURELLI, M., 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. *Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod Reproduction*, **42-80**.

HOFFMANN, A.A., TURELLI, M., SIMMONS, G.M., 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution*, **40**: 692-701.

HUIGENS, M.E., STOUTHAMER, R., 2003. Parthenogenesis associated with *Wolbachia*. In: Bourtzis, K., Miller, T.A. (Eds.), *Insect Symbiosis*. DRP Press, Boca Raton, **247-266**.

HURST, G.D.D., JIGGINS, F.M., MAJERUS, M.E.N., 2003. Inherited microorganisms that selectively kill male hosts: the hidden players of insect evolution? In: Bourtzis, K., Miller, T.A. (Eds.), *Insect Symbiosis*. DRP Press, Boca Raton, **177-198**.

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**.

JIGGINS, F. M., HURST, G. D., MAJERUS, M. E., 2000. Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex role reversal in its butterfly hosts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **267**: **69-73**

KAMBHAMPATI, S., RAI, S.K., BURGUN, S.J., 1993. Unidirectional cytoplasmic incompatibility in the mosquito, *Aedes albopictus*. *Evolution*, **47**:**673-677**.

KAMIMURA, K., MATSUSE, I.T., TAKAHASHI, H., KOMUKAI, J., FUKUDA, T., SUZUKI, K., ARATANI, M., SHIRAI, Y., MOGI, A., 2002. Effect of temperature on the development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Med Entomol Zool*, **53(1)**: **53-58**.

KITTAYAPONG, P., BAIAMAI, V., O'NEILL, S.L., 2002. Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg*, **66(1)**: **108-111**.

KOENRAADT, C.J., TAKKEN, W., 2003. Cannibalism and predation among larvae of the *Anopheles gambiae* complex. *Med Vet Entomol*, **17(1)**: **61-66**.

- KNUDSEN, A.B., 1995. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. *Parassitologia Roma*, **37 (2-3): 91-97**.
- LAVEN, H., 1951. Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution*, **5: 370-375**.
- LEGRAND, J.J., LEGRAND-HAMELIN, E., JUCHAULT, P., 1987. Sex determination in Crustacea. *Biol Rev*, **62: 439-470**.
- LO, N., CASIRAGHI, M., SALATI, E., BAZZOCCHI, C., BANDI, C., 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol*, **19:341-346**.
- LOXDALE, H.D., LUSHAI, G., 1998. Molecular markers in entomology (review). *Bulletin of Entomological Research*, **88: 577-600**.
- MAJERUS, M.E.N., 2003. A new dimension to sex wars: microbes that benefit female hosts. *Microbiology Today*, **30: 68-70**.
- MCGARRY, H.F., EGERTON, G.L., TAYLOR, M.J., 2004. Population dynamics of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol*, **135: 57-67**.
- MILLER, B.R., BALLINGER, M.E., 1988. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced in Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Trans R Soc Trop Med and Hyg*, **82: 476-477**.
- O'NEILL, S. L., GIORDANO, R., COLBERT, A. M. E., KARR, T. L., ROBERTSON, H. M., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natn Acad Sci USA*, **89: 2699-2702**.

OTSUKA, Y., TAKAOKA, H., 1997. Elimination of *Wolbachia pipientis* from *Aedes albopictus*. *Med Ent Zool*, **48**: 257-260.

PFAFFL, M. W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nuc Ac Res*, **29**: 2003-2007.

POINSOT, D., CHARLAT, S., MERÇOT, H., 2003. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with facts. *BioEssays*, **25 (3)**: 259-265.

REED, K.M., WERREN, J.H., Induction of paternal genome loss by the paternal-se-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. *Mol Reprod Dev*, **40(4)**: 408-418.

REES, D.C., 1901. Malaria: its parasitology, with a description of methods of demonstrating the organisms in man and animals. *Practitioner (new series)*, **13**: 271-300.

RIGAUD, T., 1997. Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts. In: O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., Warren, J.H. (Eds), *Influential passengers*. Oxford University Press, Oxford.

RIGAUD, T., JUCHAULT, P., MOCQUARD, J. P., 1997. The evolution of sex determination in isopod crustaceans. *Bioessays*, **19**: 409-416.

ROUSSET, F., BOUCHON, D., PINTUREAU, B., JUCHAULT, P., SOLIGNAC, M., 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc R Soc Lond B*, **250**: 91-987. Referências Bibliográficas

SINKINS, S. P., DUTTON, S.T., 2004. Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Ins Mol Biol*, **13(3)**: 317-322.

SINKINS, S. P., BRAIG, H. R., O'NEILL, S. L., 1995a. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **261**: 325-330.

SINKINS, S. P., BRAIG, H. R., O'NEILL, S. L., 1995a. *Wolbachia pipiensis*: bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes albopictus*. *Exp Parasit*, **81**: 284-291.

STEVENS, L., WICKLOW, D.T., 1992. Multispecies interactions affect cytoplasmic incompatibility in *Tribolium* flour beetles. *Am Nat*, **140**: 642-653.

STOUTHAMER, R., BREEUWER, J.A.J. & HURST, G.D.D. 1999. *Wolbachia pipiensis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol*, **53**: 71-102.

STOUTHAMER, R., KAZMER, D.J., 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, **73**: 317-327.

STOUTHAMER, R., BREEUWER, J.A.J., LUCK, R. F., WERREN, J. H., 1993. Molecular identification associated with parthenogenesis. *Nature, Lond*, **361**: 66-68.

TAGAMI, Y., MIURA, K., 2004. Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of Lepidoptera. *Insect Mol Biol*, **13(4)**: 359-364.

TAYLOR, M.J., HOERAUF, A., (2001). A new approach to the treatment of filariasis. *Curr Opin Infect Dis*, **14(6)**:727-731.

TRAM, U., SULLIVAN, W., 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science*, **296**: 1124-1126.

TSAI, K.H., LIEN, J.C., HUANG, C.G., WU, W.J., CHEN, W.J., 2004. Molecular (sub) grouping of the endosymbiont *Wolbachia* infection among mosquitoes of Taiwan. *J Med Entomol*, **41(4)**: 677-683.

WERREN, J.H., WINDSOR, D.N., 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc R Soc Lond B Bio Sci*, **267**: 1277-1285.

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

WERREN, J.H., WINDSOR, D.W., GUO, L., 1995a. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods. *Proc R Soc London Ser B*, **262**: 147-204.

WERREN, J.H., ZHANG, W., GUO, L., 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc London*, **261**: 55-71.

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., DAUGHERTHY, 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'NEIL, 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 (3)**: 327-341.

YEN, J.H., BARR, A.R., 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature*, **232**: 657-658.

ZHOU, W., ROUSSET, F., O'NEILL, S., 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc London B*, **265**: 509-515.