Fábio de Almeida

**Análise comparativa de *Culex quinquefasciatus*
infectados e não infectados por *Wolbachia pipientis***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção de Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro

São Paulo
2008

Fábio de Almeida

**Análise comparativa de *Culex quinquefasciatus*
infectados e não infectados por *Wolbachia pipientis***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção de Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Alcira Tania
Bijovsky de Katzin

São Paulo
2008

Dedico este trabalho aos meus queridos
familiares (avós, pais e irmãos) os quais me
iluminaram os caminhos a seguir.

AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo a toda minha família pelo apoio, moral e financeiro, durante a realização do trabalho.

À Tania por me aceitar, para o desenvolvimento desse projeto, em seu laboratório e me ensinar muitas coisas não só em pesquisa como também amadurecimento em vida.

Agradeço também ao Dr. Eduardo Bracco (Zeca), por ceder iniciadores específicos do gene WSP, à bióloga Sumire por me ceder mosquitos coletados no Rio Pinheiros, ao Dr. Delsio Natal e Paulo Orbinati por me ajudarem na coleta de mosquitos no Rio Negrinho, ao Dr. Lincoln Suesdek Rocha e ao Ricardo por me ajudarem nas análises estatísticas e finalmente a Maria José da biblioteca por me ajudar na formatação do trabalho.

Um agradecimento especial aos meus colegas, ex-colegas, e amigos de laboratório Alexandre, André, Kendi, Larissa, Patrícia e Renato que me ajudaram muito com idéias, experimentos e pelas descontrações.

À todos do Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados (André, Bianca, Ceres, Daniela, Ediana, Fabiana, Fernanda, João, Lurdes, Neuzinha, Ricardo, Titã e especialmente à Dra. Margareth) pelas idéias e utilização de equipamentos em seu laboratório.

Gostaria de agradecer a Roberta pelo companherismo, grande apoio e incentivo.

À todos os professores e colegas do departamento que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

E ao apoio financeiro da CAPES.

“How can you be sitting there, telling me, that you care. When everytime I look around, the people suffer in suffering in everyway in everywhere”

(Bob Marley)

RESUMO

Almeida F. Análise comparativa de *Culex quinquefasciatus* infectados e não infectados por *Wolbachia pipientis* [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Wolbachia é uma bactéria intracelular obrigatória, de transmissão vertical, encontrada em tecidos reprodutivos de muitos artrópodes e nematóides. Ela manipula o ciclo reprodutivo de seus hospedeiros, induzindo partenogênese, feminização, morte de machos e incompatibilidade citoplasmática. No intuito de verificar a existência de alterações reprodutivas em mosquitos *Culex quinquefasciatus* infectados por *Wolbachia* (cepa B), tratamos com antibiótico uma colônia infectada e obtivemos uma colônia livre da infecção. Os mosquitos de nossas colônias apresentam o fenômeno de incompatibilidade citoplasmática. Paralelamente, a infecção causa redução do número de ovos e diminui a mortalidade de larvas e pupas, fazendo com que o número de adultos emergidos seja estatisticamente igual entre os animais infectados e não infectados. Além disso, observamos que mosquitos coletados na natureza, na cidade de São Paulo, Brasil, estão infectados pela mesma cepa da bactéria.

Palavras-chave: *Culex quinquefasciatus*; *Wolbachia pipientis*; Cloridrato de tetraciclina; Incompatibilidade citoplasmática; Alterações reprodutivas.

ABSTRACT

Almeida F. Comparative analysis of *Culex quinquefasciatus* infected and non-infected by *Wolbachia pipientis* [Master Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Wolbachia is an obligatory intracellular bacterium, maternally inherited, found in reproductive tissues of many arthropods and nematodes. It manipulates the reproductive behavior of their hosts, inducing parthenogenesis, feminization, male-killing and cytoplasmic incompatibility. In order to verify the existence of reproductive manipulation in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes infected with *Wolbachia* (B strain), an infected population was treated with antibiotic to obtain a *Wolbachia* free colony. The mosquitoes of our colonies present the cytoplasmic incompatibility phenomenon. In parallel, infection causes reduction in the number of eggs and decreases the mortality of larvae and pupae, making the number of emerged adults statistically equal between the infected and uninfected animals. Furthermore, we observed that wild mosquitoes collected in Sao Paulo city, Brazil, are infected by the same strain of bacteria.

Key words: *Culex quinquefasciatus*; *Wolbachia pipientis*; Tetracycline hydrochloride; Cytoplasmic incompatibility; Reproductive fitness.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	após alimentação com sangue
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
kDa	kiloDalton
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NA	não alimentado
pb	pares de base
PCR	polimerase chain reaction
Rnase	ribonuclease
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	tris-borato-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilenodiamina
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
U	unidade de enzima
UV	ultravioleta
Wc	<i>Wolbachia</i> colony
Wfc	<i>Wolbachia</i> free colony
WSP	<i>Wolbachia</i> surface protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP.....	26
Figura 2 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP.....	27
Figura 3 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP.....	27
Figura 4 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP.....	27
Figura 5 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP.....	28
Figura 6 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP.....	28
Figura 7 - Resultado do alinhamento (Blast 2 sequences) da sequência do gene WSP de <i>Wolbachia pipientis</i> presente em nossa colônia com a sequência AY462861, depositada no banco de dados do NCBI.....	29
Figura 8 - Fotomicrografia das espermatecas de uma fêmea infértil.....	31
Figura 9 - Eletroforese de extratos de ovário de mosquitos NA, 24 h e 48 h aa.....	32
Figura 10 - Fotomicrografias de ovários, 24 h aa.	33
Figura 11 - Imagem de microscopia eletrônica de ovário, 24 h aa.	34
Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de parte de folículos de um mosquito de cada uma das colônias (Wc e Wfc), 48 h aa.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média, desvio padrão e significância dos dados de aptidão analisados..... 30

Tabela 2 - Médias e desvios padrão da densitometria de bandas das eletroforeses
de extratos de ovários de mosquitos NA, 24 h aa e 48 h aa 32

Tabela 3 - Comparação da formação do exocórion de folículos ovarianos de mosquitos
48 h aa de ambas as colônias..... 35

Tabela 4 - Comparação do diâmetro de grânulos de vitelina de folículos ovarianos, de
mosquitos 48 h aa, entre as colônias, por microscopia de luz..... 35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 O mosquito	14
1.2 A bactéria	16
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.2 Microscopia	19
3.3 Extração de DNA	20
3.4 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	20
3.5 Sequenciamento	21
3.6 Quantificação de Proteínas	21
3.7 Análise Eletroforética	22
3.8 Tratamento da colônia	22
3.9 Obtenção das colônias 100% infectada (Wc, <i>Wolbachia</i> colony) e 100% livre de <i>Wolbachia</i> (Wfc, <i>Wolbachia</i> free colony)	23
3.10 Controle das Colônias	23
3.11 Aptidão Reprodutiva	23
3.12 Incompatibilidade Citoplasmática	24
3.13 Análise de Desenvolvimento Ovariano	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Tratamento da colônia	26
4.2 Obtenção das colônias 100% infectada (Wc, <i>Wolbachia</i> colony) e 100% livre de <i>Wolbachia</i> (Wfc, <i>Wolbachia</i> free colony)	27
4.3. Sequenciamento	28
4.4 Controle das colônias	29
4.5 Controle de populações de campo	29
4.6 Aptidão reprodutiva	29
4.7 Incompatibilidade citoplasmática	30
4.9 Análise eletroforética	31
4.9 Microscopia	33
4.10 Análise de desenvolvimento ovariano	34
5 DISCUSSÃO	36
5.1 Tratamento da colônia	36
5.2 Aspectos reprodutivos	37
5.3 Incompatibilidade citoplasmática	39
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 O mosquito

Pertencente à ordem Diptera, família Culicidae, o mosquito *Culex quinquefasciatus* é responsável pela transmissão de algumas doenças que acometem os seres humanos, como filaríase linfática e encefalite do Oeste do Nilo, além de outras arboviroses de importância veterinária, devido ao hábito hematofágico das fêmeas. A forma adulta, conhecida popularmente como pernilongo, apresenta coloração amarelo-amarronzada e hábitos noturnos. Sendo um mosquito domiciliar e altamente antropofílico, estes hábitos o tornam um grande incômodo noturno.

O ciclo de vida de *Cx. quinquefasciatus*, igual que o dos outros mosquitos, é holometábolo e ocorre parte em ambiente aquático e parte em ambiente terrestre. As fases juvenis ocorrem em ambiente aquático, sobretudo em águas poluídas, e as larvas se alimentam de detritos orgânicos e microrganismos. Durante esta fase, são acumuladas reservas de lipídeos e glicogênio que serão utilizadas na fase de pupa e no início da fase adulta (Timmermann e Briegel, 1999).

A forma adulta adquire capacidade de vôo e passa a se alimentar de néctar de flores, sumo de frutas e outros tecidos vegetais. Esta dieta é suficiente para manter a sobrevivência dos adultos, porém, ela é deficiente em outros nutrientes, como proteínas e lipídeos, necessários para o desenvolvimento da grande quantidade de ovos gerada a cada ciclo gonadotrófico. Por esta razão, a maioria das fêmeas complementa sua dieta com sangue.

A hematofagia exigiu uma série de modificações anatomo-fisiológicas e comportamentais do mosquito para possibilitar a localização, coleta e digestão do sangue (Romoser e Rothman, 1973).

Com a necessidade de ingerir sangue, os mosquitos se expõem a diferentes riscos. Eles podem ser abatidos pelo hospedeiro durante o repasto ou ser infectados por patógenos presentes no sangue ingerido. Também estão sujeitos às consequências do processo digestivo, tais como: o estresse mecânico gerado pela grande distensão do epitélio intestinal, a lesão mecânica do epitélio por cristais de heme, o estresse químico provocado por espécies reativas de oxigênio presentes no sangue e em seus produtos de digestão (Ryter e Tyrrel, 2000).

O aparelho reprodutor feminino dos mosquitos fica localizado dorso-lateralmente no abdômen e apresenta dois ovários que têm como unidade funcional os ovários. Nos ovários encontramos, além das células germinativas, os folículos primários e secundários que, por sua vez, são compostos pelas células auxiliadoras e o ovócito; tudo revestido por uma monocamada epitelial de células foliculares (Clements, 1992).

Nas células auxiliadoras, ou células nurse, existem cromossomos politênicos responsáveis, principalmente, pela síntese de RNA mensageiro e de ribossomos, que serão utilizados pelo ovócito. O ovócito, que dará origem ao ovo, é uma célula única que inicia sua diferenciação logo após a alimentação sangüínea, armazenando proteínas e lipídeos que serão utilizados pelo embrião. As células foliculares são células epiteliais dispostas em monocamada ao redor das células nurse e do ovócito, as separando do meio externo. Sua função principal, em mosquitos, é a síntese do córion, que é composto pelo endocóron e exocóron, formadores da casca do ovo (Clements, 1992).

A formação do endocóron se inicia, em *Cx. quinquefasciatus*, aproximadamente 12 h após a alimentação sangüínea (aa) e, aproximadamente 48 h aa, está completado. Neste mesmo tempo é iniciada a formação do exocóron que se completa aproximadamente 84 h aa (André F. Cardoso, 2008, comunicação pessoal¹).

A partir da ingestão de sangue é dado início ao processo vitelogênico. Os nutrientes do sangue são digeridos, atravessam a lâmina basal do intestino e chegam até a hemolinfa. Através desta, os nutrientes são transportados ao corpo gorduroso e lá se inicia a produção da vitelogenina, proteína majoritária na ovogênese. É sabido que, em mosquitos, o aumento do hormônio 20-hidroxiecdisona e a diminuição do hormônio juvenil são responsáveis pela indução do processo vitelogênico (Clements, 1992).

As vitelogeninas são fosfolipoproteínas glicosiladas oligoméricas, com massa molecular variando entre 200 e 600 kDa, sintetizadas inicialmente pelo corpo gorduroso como precursores que são clivados proteoliticamente em duas ou mais subunidades (Clements, 1992). Em *Aedes aegypti*, as subunidades são de aproximadamente 65 e 200 kDa (Raikhel, 1987a,b). Elas são internalizadas no ovócito e armazenadas em grânulos de vitelinas, até sua utilização para o desenvolvimento do embrião (Raikhel, 1987a).

¹ André Franco Cardoso, doutorando no Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo, 2008.

Algumas enzimas, responsáveis pela hidrólise da vitelina durante a embriogênese, também são produzidas pelo corpo gorduroso e internalizadas e armazenadas no ovócito. Em *Ae. aegypti*, foram descritas duas: uma carboxipeptidase de 48 kDa (Cho *et al.*, 1991; Deitsch e Raikhel, 1993) e um precursor de 44 kDa, muito semelhante a catepsina B (Cho *et al.*, 1999). Após a internalização, ambas pró-enzimas são armazenadas dentro dos grânulos de vitelina.

1.2 A bactéria

Wolbachia pipientis é uma α -proteobactéria que pertence à ordem Rickettsiales. Foi reportada pela primeira vez em tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens* por Hertig e Wolbach em 1924. Em homenagem a Wolbach, Hertig a denominou *Wolbachia pipientis* (Stouthamer *et al.*, 1999).

Como todas as bactérias do gênero *Rickettsia*, *Wolbachia* tem características morfológicas típicas: presença de membrana celular rodeada pela parede celular, cromatina dispersa, grande número de ribossomos e, ainda, uma terceira membrana provinda da membrana celular do hospedeiro, aspecto muito comum em endossimbiontes (Voronin *et al.*, 2004). São bactérias Gram-negativas (a parede celular é composta por uma única camada de proteoglicanas), intracelulares obrigatórias e encontradas principalmente nos tecidos reprodutivos de diversos hospedeiros (insetos, aracnídeos, crustáceos e nematóides), sendo transmitidas por herança materna (Werren, 1997). Existem seis cepas dentro deste grupo: A, B, C, D, E e F, sendo que somente as cepas A e B infectam mosquitos (Lo *et al.*, 2002).

A principal via de transmissão de *Wolbachia* ocorre verticalmente através das gerações, acarretando em importantes modificações reprodutivas em seus hospedeiros, incluindo: partenogênese, feminização, morte dos machos e incompatibilidade citoplasmática, o efeito mais comumente encontrado, mais bem estudado e o único descrito em mosquitos (Voronin *et al.*, 2004). Além disso, *Wolbachia* pode causar diferenças na fecundidade e fertilidade de algumas espécies (Min e Benzer, 1997; Dobson e Rattanadechakul, 2001).

Ghelelovitch (1952), apud Werren (1997, p.588)², observou em *Culex* a ocorrência de cruzamentos incompatíveis, onde pouca ou nenhuma prole nascia. Por desconfiar de se tratar

² Ghelelovitch, 1952 apud Werren, 1997, p.588.

de um fenômeno decorrente de herança citoplasmática, o denominou incompatibilidade citoplasmática. Posteriormente, Yen e Barr (1971) observaram que, pela eliminação das bactérias intracelulares com antibióticos, esse fenômeno não ocorria, associando assim o fenômeno à presença da bactéria.

A incompatibilidade citoplasmática ocorre em uma situação específica: quando machos infectados cruzam com fêmeas não infectadas observa-se grande diminuição ou ausência de viabilidade dos ovos. Isto traz uma vantagem às fêmeas infectadas, já que elas poderão cruzar tanto com um macho infectado como com um não infectado e seus ovos serão sempre viáveis. Sabe-se que densidades mais altas da bactéria aumentam o nível da incompatibilidade, ou seja, quanto mais bactérias nos tecidos reprodutivos dos hospedeiros, maior será a chance de inviabilidade dos ovos (Breeuwer e Werren, 1993). Além disso, a idade de algumas espécies de *Drosophila* tem influência direta no nível da incompatibilidade citoplasmática (Turelli e Hoffmann, 1995; Reynolds e Hoffmann, 2002) e também em *Aedes albopictus* (Kittayapong *et al.*, 2002). Porém, Duron e colaboradores (2007) observaram que em *Cx. pipiens* não há esta diferença.

Apesar de não se saber ao certo o mecanismo pelo qual ocorre a incompatibilidade citoplasmática, Poinot e colaboradores (2003) sugerem um modelo bioquímico, denominado por eles de chave-fechadura, que é o mais aceito até hoje: No citoplasma dos espermátócitos de um macho infectado, as bactérias estão presentes, porém, não são encontradas nos espermatozóides, já que são expulsas nos corpos residuais (Bressac e Rousset, 1993). Apesar disto, as bactérias produziram um fator protéico (fechadura) que se ligaria aos cromossomos dos espermatozóides. No caso do macho infectado cruzar com uma fêmea infectada, o fator protéico, presente nos cromossomos da fêmea (chave), removeria o fator protéico masculino (fechadura); isto acarretaria em segregação normal dos cromossomos. Porém, se o macho estiver infectado e a fêmea não, o fator protéico masculino (fechadura) não será removido, fazendo que ocorra uma segregação errônea dos cromossomos. Em um indivíduo diplóide, como os mosquitos, o embrião não se desenvolverá. Já em indivíduos haplóides haverá desenvolvimento do embrião, porém, haverá perda dos cromossomos paternos.

2 OBJETIVOS

Avaliar as eventuais alterações fisiológicas e reprodutivas em *Culex quinquefasciatus* infectados por *Wolbachia pipientis*. Para isto pretendemos:

- Tratar a colônia infectada para a obtenção de uma colônia livre de *Wolbachia*.
- Investigar possíveis diferenças no processo de vitelogênese entre as colônias.
- Estudar as eventuais diferenças de aptidão reprodutiva (fitness) entre as colônias.
- Comprovar a existência do fenômeno de incompatibilidade citoplasmática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Nossa colônia de mosquitos *Culex quinquefasciatus* (cepa PIN) foi iniciada em 1995, com cerca de 400 mosquitos capturados às margens do Rio Pinheiros, São Paulo. Em novembro de 2005 foi observada, por microscopia eletrônica de cortes de ovários, a presença de bactérias intracelulares em todos os tipos celulares do folículo ovariano. O diagnóstico de *Wolbachia* foi confirmado por reação de polimerase em cadeia (PCR) e seqüenciamento, que revelaram se tratar de *Wolbachia pipientis* da cepa B.

Os animais foram mantidos a 26 °C com umidade relativa de 65-75%. As larvas foram alimentadas com comida para peixes (Sera[®]Vipan, Heinsberg, Alemanha) e os adultos com provisão *ad libitum* de solução de sacarose a 10%. Quando necessário, as fêmeas foram alimentadas com sangue em camundongos BALB/c anestesiados com 0.3 mg/kg de cloridrato de xilazina (Calmium, Agner União) mais 30 µg/kg de acepromazina (Acepran, Univet S.A., São Paulo, Brasil).

Com o intuito de estabelecermos uma colônia naturalmente não infectada por *Wolbachia*, larvas e pupas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* foram coletadas em outubro/novembro de 2007 na cidade de São Paulo, às margens do Rio Pinheiros pela Gerência do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de São Paulo e, por nós, às margens do Rio Negrinho (afluente do Rio Tietê) no Parque Estadual do Tietê. Estes indivíduos foram mantidos em nosso insetário, até a fase adulta, quando uma amostra de 20 mosquitos de cada local foi submetida a PCR para o diagnóstico da bactéria.

3.2 Microscopia

Ovários de fêmeas adultas 48 h após a alimentação com sangue (aa) foram dissecados sob lupa estereoscópica e fixados com glutaraldeído 0,5% (v/v) e paraformaldeído 4% (p/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.2, por 90 min a temperatura ambiente. Os materiais foram pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% (p/v) em tampão cacodilato de sódio

0,1 M pH 7.2. Posteriormente, eles foram desidratados em uma série de concentrações crescentes de acetona até 100% e incluídos em resina acrílica Spurr.

Os cortes semifinos (em torno de 300 nm de espessura) foram corados com azul de toluidina e estudados em microscópio de luz. Os cortes ultrafinos (de aproximadamente 70 nm de espessura) foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 100CX).

3.3 Extração de DNA

Mosquitos adultos foram homogeneizados, individualmente ou em grupos de 5 indivíduos, utilizando pistilos apropriados para microtubos. A extração foi realizada utilizando protocolo padrão sendo empregado fenol-clorofórmio e precipitado com etanol, como descrito por Sambrook *et al.* (1989). O produto da extração foi aplicado em gel de agarose 1% e a eletroforese foi realizada com voltagem constante de 100 V por 1 h. O gel foi corado com brometo de etídeo e observado sob luz UV.

3.4 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Foram utilizados iniciadores específicos para o gene WSP, codificador da proteína de membrana de *Wolbachia* (Zhou *et al.*, 1998):

WSP 328F: 5' CCA GCA GAT ACT ATT GCG 3' para *Wolbachia* cepa A

WSP 183F: 5' GAA GAC TGC AGA TAC TGC 3' para *Wolbachia* cepa B

WSP 691R: 5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3' para ambas as cepas.

O produto de extração de DNA (0,8 µl), foi amplificado em solução de Tris HCl 75 mM pH 8.0, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM contendo 0,25 mM de cada iniciador, 1 mM de desoxirribonucleosídeo-trifosfato (dNTP's; Invitrogen) e 1 U de Taq polimerase (Invitrogen).

As amostras foram desnaturadas a 94 °C por 2 min e submetidas a 40 ciclos de replicação de 1 min a 94 °C com 1 min a 55 °C para o anelamento dos iniciadores e 1 min a 72 °C para a extensão da fita de DNA. Foi utilizado um aparelho automático para PCR (Biometra).

O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1% e a eletroforese foi realizada com voltagem constante de 100 V por 1 h. O gel foi corado com brometo de etídeo e observado sob luz UV.

3.5 Seqüenciamento

O produto da PCR foi submetido a reação de seqüenciamento utilizando Big Dye™ Terminator v 3.1 (Applied Biosystems) conforme as instruções do fabricante. Para cada reação foram utilizados 200 ng de DNA, em solução de Tris 50 mM pH 9.0, MgCl₂ 1 mM e, para extensão da fita, 4 mM dos mesmos iniciadores utilizados na PCR. As amostras foram desnaturadas a 96 °C por 2 min e submetidas a 35 ciclos de replicação de 45 seg a 96 °C, 30 seg a 55 °C para anelamento dos iniciadores e 4 min a 60 °C para extensão da fita de DNA. O produto da reação foi precipitado pela adição de 4 volumes de isopropanol 75% e incubado por 30 min a temperatura ambiente. O material foi submetido a 30 min de centrifugação a 1250 xg, o sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado como descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi seco por 1 min a 90 °C e ressuspendido em 1,3 µl de 5 Dye (Applied Biosystems). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (Long Ranger 50% Stock Solution, BMA), contendo uréia 6 M em tampão TBE 1X (tris-borato-EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetra Acético), a uma voltagem de 1680 V por 7 h, no seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram analisadas no programa DNASTar e alinhadas com o algoritmo Blastn do NCBI. Após confirmação de se tratar do gene WSP, a seqüência foi alinhada com o gene WSP de *Wolbachia* de *Cx. quinquefasciatus* (AY462861), depositado nesse mesmo banco de dados, utilizando o algoritmo Blast 2 sequences.

3.6 Quantificação de proteínas

Amostras de extratos de ovários, de fêmeas não alimentadas com sangue (NA) e 24 e 48 h aa, foram solubilizadas em PBS adicionado de coquetel de inibidores de proteases (leupeptina 50 µg/ml, pepstatina 5 µg/ml, quimostatina 5 µg/ml, antipaína 5 µg/ml e PMSF 5 µg/ml) e E-64 5 µM. A quantificação das amostras foi realizada utilizando-se o Kit Commassie Bio Rad para microensaios seguindo as recomendações do fabricante e utilizando

uma curva padrão de albumina sérica bovina. As amostras foram lidas em aparelho de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Multiskan EX (Labsystems).

3.7 Análise eletroforética

Extratos de ovários de mosquitos de ambas as colônias, NA, 24 e 48 h aa, foram solubilizados em tampão de amostra (Tris-HCl 62 mM, SDS 0,2% (p/v), DTT 50 mM, glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v)) e aplicados em gel descontínuo de poliacrilamida a 8%, contendo 0,1% de SDS (Laemmli, 1970). Os géis foram corados com Commassie brilliant blue R-250 a 0,2% (p/v) dissolvido em etanol, ácido acético e água (45:10:45, v/v/v) por 16 h, depois descorados com etanol, ácido acético e água (23:7:70, v/v/v) por 3 h. Foram escolhidas as 5 bandas mais evidentes para análise densitométrica comparativa, realizada com o programa Band Leader 3.0. A eletroforese, e sua análise densitométrica, foi realizada em triplicata.

3.8 Tratamento

Larvas: Após a eclosão, as larvas (L1 ou L4) foram transferidas para 6 caixas (aproximadamente 150 larvas em cada uma): 2 contendo 0,5 mg/ml (p/v) e 2 contendo 1 mg/ml (p/v) de cloridrato de tetraciclina (Boehringer Mannheim GmbH, Alemanha) em água tamponada (pH 7.0), além de outras duas sem tetraciclina. As larvas foram mantidas nestas condições durante 24 h (Dobson e Rattanadechakul, 2001).

Após o tratamento, as larvas foram transferidas para água sem tetraciclina até a fase de pupa e, nesta fase, foram contadas.

Adultos: Durante a primeira semana de vida, 300 mosquitos adultos, machos e fêmeas, foram mantidos normalmente com solução de sacarose a 10% (p/v). Na semana seguinte, foi oferecida a mesma solução adicionada de 1 mg/ml (p/v) de cloridrato de tetraciclina em água tamponada (pH 7.0) por mais uma semana (modificado de Dobson e Rattanadechakul, 2001).

Durante 3 dias após término do tratamento antibiótico, as fêmeas foram mantidas com 10% (p/v) de solução de sacarose e em seguida alimentadas com sangue. A prole destes mosquitos (geração F1) foi submetida a um novo tratamento, como descrito acima, e as

fêmeas também foram alimentadas com sangue. Depois da oviposição, 12 barcas, escolhidas aleatoriamente, foram colocadas em caixas individuais. Ao atingirem o estágio L3, um grupo de 10 larvas de cada caixa foi submetido a PCR para verificar a eficiência do tratamento. Aproximadamente 500 pupas, provindas das caixas cujas amostras foram negativas na PCR, foram selecionadas aleatoriamente para iniciar uma colônia livre de *Wolbachia*.

No intuito de verificar sua reprodutibilidade, os tratamentos das larvas e adultos foram repetidos utilizando os mesmos protocolos já descritos, porém, alguns aprimoramentos foram acrescentados no protocolo dos adultos: antes do tratamento, foi confirmado se as mães dos mosquitos a serem tratados estavam realmente infectadas; após o tratamento, verificou-se se por PCR se os animais estavam negativos, assim como a sua prole (geração F1).

3.9 Obtenção das colônias 100% infectada (Wc, *Wolbachia* colony) e 100% livre de *Wolbachia* (Wfc, *Wolbachia* free colony)

Para a obtenção destas colônias, 20 fêmeas da colônia infectada e 40 fêmeas da geração F23 da colônia tratada foram separadas para postura individual e, após a oviposição, foram submetidas a PCR utilizando o mesmo protocolo descrito acima. A prole das fêmeas, comprovadamente infectadas ou não por PCR, foi separada para a obtenção da colônia totalmente infectada, a Wc, e da colônia totalmente livre de bactérias, a Wfc.

Estas duas novas colônias foram utilizadas para a realização dos estudos comparativos.

3.10 Controle das colônias

PCRs de 3 grupos de cinco mosquitos cada, de ambas as colônias, foram realizadas de 3 em 3 semanas.

3.11 Aptidão reprodutiva

Trinta fêmeas adultas de cada colônia foram alimentadas em camundongos e separadas para postura individual. Este experimento foi realizado em dois períodos diferentes (outubro/06 e março/07), totalizando um número de 60 fêmeas de cada colônia.

Foram avaliados: o tempo de oviposição após o repasto (a cada 12 horas entre as 72 e as 120 h aa), o número de ovos contidos em cada barca (fecundidade), o número de adultos, machos e fêmeas, emergidos (viabilidade) e a mortalidade das larvas L4 e das pupas (mortalidade tardia).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o programa InStat 3. Os testes estatísticos utilizados foram Teste T e Mann-Whitney.

3.12 Incompatibilidade citoplasmática

O fenômeno foi testado separando os machos e as fêmeas no estágio de pupa. Os cruzamentos foram efetuados conforme a seguinte disposição:

Machos Wc X Fêmeas Wc
Machos Wc X Fêmeas Wfc
Machos Wfc X Fêmeas Wc
Machos Wfc X Fêmeas Wfc

No cruzamento entre machos infectados (Wc) e fêmeas não infectadas (Wfc), foram separados 3 fêmeas e 1 macho por gaiola em 5 gaiolas. Por falta de espaço, nos outros cruzamentos foram colocados 15 fêmeas e 5 machos em apenas uma gaiola. Foi avaliada a viabilidade dos ovos em cada cruzamento. As barcas foram analisadas em lupa estereoscópica (Leica Mz75) acoplada a câmera digital (Leica DFC320). As imagens coletadas foram utilizadas, com o programa Leica IM50 Image Manager, para quantificar o número de ovos.

Para confirmar a cópula, pesquisamos a presença de espermatozóides nas espermatecas das fêmeas que não produziram ovos ou que produziram ovos inviáveis. As espermatecas foram dissecadas em lupa estereoscópica (Leica MZ75), colocadas entre lâmina e lamínula e estudadas em microscópio de luz (Leica DMLB) com campo claro e aumento de 400X.

3.13 Análise do desenvolvimento ovariano

Cortes semifinos de ovários de 6 mosquitos de cada colônia, 48 h aa, foram analisados por microscopia de luz em aumento de 400X. Cortes meridionais de 7 folículos de cada ovário (a orientação foi estabelecida pela presença de células nurse em situação polar) foram utilizados para avaliar o estado de desenvolvimento do córion. A formação do endocórion foi considerada avançada quando não mais eram observadas placas individuais, a do exocórion foi considerada iniciada quando havia mais de 10 grânulos evidentes por campo, por folículo. A análise estatística do estado de desenvolvimento do córion foi realizada utilizando o programa InStat 3 e qui-quadrado como teste estatístico.

Além disso, utilizando o programa Metamorph 3.0, foi medido o diâmetro de 30 grânulos de vitelina de 3 folículos de cada ovário. Nos grânulos que não eram redondos, foi sempre escolhido o maior diâmetro. Em todas as medições, sempre foi escolhida a mesma região, equidistante das células nurse.

A análise estatística da medida do diâmetro dos grânulos foi realizada utilizando o programa InStat 3 e Mann-Whitney como teste estatístico.

Além disso, por microscopia eletrônica de transmissão, foram observadas também possíveis diferenças no núcleo, retículo endoplasmático, número de mitocôndrias, e número e tamanho das inclusões lipídicas nas células do folículo ovariano.

4 RESULTADOS

4.1 Tratamento da colônia

O tratamento das larvas L1 resultou em 100% de mortalidade com ambas as concentrações de cloridrato de tetraciclina testadas (0,5 e 1 mg/ml). Apenas algumas larvas L4 sobreviveram, mas não chegaram à fase adulta. Cabe assinalar aqui que, em concentrações maiores de antibiótico (5 mg/ml), Dobson e Rattanadechakul (2001) também relataram alta mortalidade em larvas de *Aedes albopictus* (Skuse).

Já o tratamento de adultos (1 mg/ml) foi efetivo logo após a primeira tentativa, já que a geração F2 se apresentou negativa na PCR (Figura 1), assim como todas as gerações derivadas dela. Foi com estes animais que iniciamos a colônia livre de bactérias (Wfc, descrita abaixo).

Figura 1 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP. 1 e 2: grupo de 5 mosquitos fêmeas (por poço) da geração F2 da colônia tratada; C+: controle positivo, *Aedes albopictus* infectados com a cepa B da bactéria; C- controle negativo, sem DNA; PM: peso molecular.

Para verificar a reprodutibilidade do protocolo empregado, os tratamentos de larvas e adultos foram repetidos com as modificações descritas em “Materiais e Métodos, 3.8 Tratamento” e obtiveram-se os mesmos resultados. As larvas não atingiram a fase adulta e, nos adultos, houve 100% de cura. Os dados apresentados a seguir são resultado desse segundo protocolo.

A figura 2 mostra que as mães dos mosquitos tratados estavam infectadas. Podemos observar que não houve amplificação nos poços 7 e 13, isto ocorreu porque houve perda do DNA, fato confirmado pela eletroforese do DNA genômico. As progênes desses animais foram descartadas.

Figura 2 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP. 1 a 19: um mosquito fêmea, da colônia Wc, por poço; C+: controle positivo, *Ae. albopictus* infectados com a cepa B da bactéria; C-: controle negativo, sem DNA.

Após a primeira semana de tratamento, todas as fêmeas e suas respectivas proles (F1) ainda permaneciam positivas na PCR (Figura 3), porém, após mais uma semana de tratamento, 4 das 10 fêmeas da geração F1, que se alimentaram, se apresentaram negativos para o gene WSP, assim como toda a progênie de uma delas (M4), já que as outras fêmeas não ovipuseram ou seus ovos foram inviáveis (Figura 4).

Figura 3 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP. M1 a M9: um mosquito fêmea (após o primeiro tratamento) por poço; P1 a P9: grupo de três mosquitos fêmeas da geração F1; C+: controle positivo, *Cx. quinquefasciatus* infectados com a cepa B da bactéria; C-: controle negativo, sem DNA.

Figura 4 - Gel de agarose 1% da PCR com iniciadores específicos para o gene WSP. M1 a M10: um mosquito fêmea da geração F1 (após o segundo tratamento) por poço; P1 a P10: um mosquito fêmea (F2), prole do mosquito M4, por poço; C+: controle positivo, *Cx. quinquefasciatus* infectados com a cepa B da bactéria; C-: controle negativo, sem DNA.

4.2 Obtenção das colônias 100% livre de *Wolbachia* (Wfc, *Wolbachia* free colony) e 100% infectada (Wc, *Wolbachia* colony)

A figura 5 mostra o resultado da PCR realizada em 40 fêmeas da geração F23 dos mosquitos inicialmente tratados, após terem realizado postura individual. Os mosquitos nascidos das fêmeas negativas na PCR foram utilizados para iniciar uma nova colônia, a Wfc, sendo eliminada a anterior (não infectada). Apesar de apresentar duas bandas de tamanho diferente ao do gene WSP (500 pb), a prole correspondente à fêmea do poço 8 foi descartada.


```

Query 193 GTTAACGTTTATTACGATATAGCGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTT 252
          |||
Sbjct 266 GTTAACGTTTATTACGATATAGCGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTT 325

Query 253 GGTGTTGGTGCAGCATATATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAA 312
          |||
Sbjct 326 GGTGTTGGTGCAGCATATATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAA 385

Query 313 GGATTTGGTTTTGCTTATCAAGCAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAATC 372
          |||
Sbjct 386 GGATTTGGTTTTGCTTATCAAGCAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCAGAAATC 445

Query 373 AAACCTCTTGCTGGTGCTCGTTATTTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTTAATAAAGAAGCA 432
          |||
Sbjct 446 AAACCTCTTGCTGGTGCTCGTTATTTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTTAATAAAGAAGCA 505

Query 433 GTATCAGCTACTAAAGAGATCAATGTCCTTTACAGCGCTGTTGGTGCAAGC 485
          |||
Sbjct 506 GTATCAGCTACTAAAGAGATCAATGTCCTTTACAGCGCTGTTGGTGCAAGC 558

```

Figura 7 - Resultado do alinhamento (Blast 2 sequences) da sequência do gene WSP de *Wolbachia pipientis* presente em nossa colônia com a sequência AY462861, depositada no banco de dados do NCBI.

4.4 Controle das colônias

As PCRs realizadas de 3 em 3 semanas nunca identificaram a presença da bactéria nos mosquitos da colônia Wfc. Por outro lado, a colônia Wc sempre se mostrou positiva. O mesmo foi observado, por microscopia eletrônica, em todos os cortes de ovário realizados.

4.5 Controle de populações de campo

A PCR das amostras de mosquitos coletados na natureza mostrou que todos eles estavam infectados por *Wolbachia* da cepa B.

4.6 Aptidão reprodutiva

Foram analisados os seguintes parâmetros nas fêmeas de ambas as colônias: tempo de oviposição após a alimentação sangüínea (aa); quantidade de ovos contidos nas barcas depositadas por cada fêmea (fecundidade); número de machos e fêmeas emergidos (fertilidade); número de indivíduos (L4 e pupas) mortos antes da fase adulta (morte tardia). Com estes últimos dados foi calculada a viabilidade (número de adultos/número de ovos).

De todas as fêmeas alimentadas (60 de cada colônia), 51 de cada uma ovipuseram; os ovos de 5 barcas da colônia Wfc não eclodiram e o mesmo aconteceu com os ovos de 6 barcas da colônia Wc.

Como o mesmo número de fêmeas (9) de ambas as colônias não ovipuseram, elas foram eliminadas das análises. Nas análises estatísticas, as barcas cujos ovos não eclodiram foram desconsideradas nos cálculos de fertilidade.

Foram calculados a média, o desvio padrão e a significância de todos os dados obtidos. Foi realizado o Teste T para as amostras que passaram no teste de normalidade e, para as que não passaram, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Tabela 1).

Tabela 1 - Média, desvio padrão e significância dos dados de aptidão analisados.

	Mt (h)	Mo	Mm	Mf	Mv (%)
Wfc	89,22±10,56	193,84±28,63	46,84±32,40	46,90±29,38	47,79±26,89
Wc	87,29±8,34	179,64±29,38	45,02±29,83	43,55±26,63	48,05±25,59
Significância	0,5	0,015	0,77	0,55	0,96
Teste	MW	T	T	T	T
	Mmotar	mortar (%)	Mmopre	morpre (%)	Mv-tar (%)
Wfc	38,93±34,92	19,11±13,89	64,98±49,28	34,98±27,78	58,44±28,62
Wc	25,58±20,63	16,46±10,31	68,51±51,89	39,36±29,62	56,63±29,46
Significância	0,029	0,074	0,730	0,444	0,753
Teste	T	T	T	MW	T

MW: Mann Whitney; T: Teste T. Mt (h): média do tempo de oviposição em horas; Mo: média absoluta do número de ovos; Mm: média absoluta de machos emergidos; Mf: média absoluta de fêmeas emergidas; Mv: média da viabilidade em porcentagem; Mmotar: média absoluta do número de mortes tardias, mortar: mortalidade tardia em porcentagem; Mmopre: média absoluta de mortes precoces; morpre: mortalidade precoce em porcentagem; Mv-tar: média da viabilidade sem os mortos tardios.

Pelos testes estatísticos, as fêmeas da colônia Wfc produziram maior quantidade de ovos ($p = 0,015$) mas sua progênie apresentou mais mortes tardias ($p = 0,029$).

4.7 Incompatibilidade citoplasmática

Nossos dados confirmaram os descritos na literatura para este mesmo modelo (O'Neill e Paterson, 1992; Sinkins *et al.*, 2005) já que o cruzamento entre os machos Wc e as fêmeas Wfc não gerou nenhuma prole. Das 24 fêmeas que se alimentaram com sangue, 2 morreram antes do tempo de oviposição e 10 ovipuseram. As espermatecas destas 10 fêmeas foram analisadas e em 8 foram observados espermatozóides, o que confirmou a existência de cópula (Figura 8). Nos outros cruzamentos a viabilidade foi normal.

Figura 8 - Fotomicrografia das espermatecas (asteriscos) de uma fêmea infértil. As setas indicam a presença de espermatozóides. 400 X.

4.8 Análise eletroforética

A figura 9 mostra que não há diferenças qualitativas no padrão de bandas dos extratos de ovário de fêmeas das colônias Wc e Wfc. Todavia, a eletroforese sugere haver alguma diferença quantitativa em algumas das bandas (Figura 9). Para confirmar essa diferença, foi realizada análise densitométrica de algumas das bandas com o programa *BandLeader* 3.0 (Tabela 2).

Este experimento foi realizado em triplicata, utilizando extratos de ovário de mosquitos NA, 24 h e 48 h aa.

Figura 9 - Eletroforese de extratos de ovário de mosquitos NA, 24 h e 48 h aa. Foram utilizados 10 µg de proteína total em cada canaleta. As setas indicam as bandas submetidas à análise densitométrica. 1: subunidade maior da vitelina (aproximadamente 200 kDa), 2: proteína de aproximadamente 130 kDa, 3: subunidade menor da vitelina (aproximadamente 85 kDa), 4: proteína de aproximadamente 43 kDa e 5: proteína(s) de aproximadamente 20-18 kDa.

Como podemos observar na tabela 2 não houve diferenças significativas na densitometria das bandas entre as colônias.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão da densitometria de bandas das eletroforeses de extratos de ovários de mosquitos NA, 24 h aa e 48 h aa.

	NA WfC	NA WC	24 h aa WfC	24 h aa WC	48 h aa WfC	48 h aa WC
1	16,19±8,34	15,83±8,62	58,07±13,03	56,41±13,03	78,31±25,83	76,38±24,32
2	22,03±13,92	21,58±11,85	15,33±5,96	13,17±7,73	17,81±7,42	17,13±5,85
3	20,99±14,32	19,22±12,69	35,15±15,65	32,25±16,07	52,57±12,77	53,08±13,26
4	15,41±3,41	13,93±2,59	12,51±6,69	9,20±5,37	14,04±2,90	14,41±1,88
5	15,81±11,03	15,70±10,45	17,66±14,89	12,08±12,79	28,98±19,47	27,41±17,76

WfC: colônia livre da *Wolbachia*, WC: colônia infectada, 1: subunidade maior da vitelina, 2: proteína de aproximadamente 130 kDa, 3: subunidade menor da vitelina, 4: proteína de aproximadamente 43 kDa e 5: proteína(s) de aproximadamente 20-18 kDa.

4.9 Microscopia

A figura 10 mostra a organização celular de um ovaríolo 24 h aa.

Figura 10 - Fotomicrografias de ovaríolos, 24 h aa. **A**- O epitélio folicular (setas) rodeia o conjunto formado pelo ovócito (OV) e as células nurse (CN) N: núcleos. Asterisco: grânulos de vitelina. 400 X. **B**- Maior aumento destacando, no espaço folicular, as vesículas formadoras do endocóron (setas). CF: células foliculares. CN: célula nurse. OV: ovócito. N: núcleos. V: grânulos de vitelina. 1000 X.

Em todos os materiais da colônia Wc foi sempre observada, por microscopia eletrônica, a presença das bactérias em todos os tipos celulares do folículo ovariano (Figura 11): células foliculares (monocamada de células epiteliais que circunda o ovaríolo), responsáveis pela síntese do córion, células nurse, responsáveis pela síntese de ribossomos e mRNAs para o ovócito e ovócito, célula única, armazenadora de proteínas e lipídeos, que dará origem ao ovo. Este fato nunca foi observado nas amostras de mosquitos da colônia Wfc.

Figura 11 - Imagem de microscopia eletrônica de ovário, 24 h aa. OV: ovócito, CF: célula folicular, CN: célula nurse, L: inclusão lipídica, N: núcleos, setas: *Wolbachia*. 6300 X.

4.10 Análise do desenvolvimento ovariano

Às 48 h aa, os ovários de animais da colônia Wc apresentaram o endocórion já fundido formando uma estrutura única, assim como também a presença de numerosas vesículas na face apical das células foliculares, sugerindo o início da formação do exocórion (Figura 12 A). Pelo contrário, nos ovários dos mosquitos da colônia Wfc, as placas formadoras do endocórion ainda se apresentavam nitidamente individuais e não se observaram as vesículas precursoras do exocórion (Figura 12 B). Além disso, houve diferença no diâmetro dos grânulos de vitelo que, aparentemente, estão maiores no mosquito da colônia Wc (Figura 12 A). Nenhuma outra diferença morfológica foi observada nas estruturas do ovário.

Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de parte de folículos de um mosquito de cada uma das colônias (Wc e Wfc), 48 h aa. **A:** Wc - as setas apontam o endocóron, as cabeças de seta, o exocóron. Asterisco: grânulos de vitelina. 1500 X. **B:** Wfc - as setas apontam o endocóron. Asterisco: grânulos de vitelina. 1500 X.

A análise estatística com o programa InStat 3 e o teste de qui-quadrado confirmou a diferença no desenvolvimento do exocóron (valor de significância $<0,0084$; tabela 3).

Tabela 3 - Comparação da formação do exocóron de folículos ovarianos de mosquitos 48 h aa de ambas as colônias.

	Wfc	Wc
Nº de fêmeas analisadas	6	6
Nº de folículos analisados	42	42
Nº de folículos que haviam iniciado a formação do exocóron	12	25
Significância	$<0,0084$	

A tabela 4 mostra a comparação do diâmetro dos grânulos de vitelina de folículos ovarianos das colônias Wc e Wfc, utilizando o programa InStat 3 e o teste estatístico de Mann-Whitney. O valor de significância ($<0,0001$) confirma que o tamanho dos grânulos é maior nos ovócitos dos animais infectados por *Wolbachia*.

Tabela 4 - Comparação do diâmetro de grânulos de vitelina de folículos ovarianos, de mosquitos 48 h aa, entre as colônias, por microscopia de luz.

	Wfc	Wc
Nº de grânulos medidos	540	540
Diâmetro médio (μm)	$4,45 \pm 1,27$	$5,02 \pm 1,42$
Significância	$<0,0001$	

5 DISCUSSÃO

5.1 Tratamento da colônia

Até onde nós sabemos, a primeira descrição de alteração reprodutiva em mosquitos, incompatibilidade citoplasmática, foi feita por Ghelelovitch (1952), apud Werren (1997)³. Em 1973, Yen e Barr, suspeitando que *Wolbachia* pudesse estar envolvida na produção deste fenômeno em *Culex pipiens*, realizaram o tratamento de larvas com vários antibióticos. Estes autores relatam que o único eficiente foi a tetraciclina, já que a microscopia das gônadas das pupas mostrou que elas estavam livres da bactéria. O cruzamento entre os adultos emergidos daquelas larvas com adultos não tratados, confirmou que *Wolbachia* era responsável pela incompatibilidade citoplasmática.

Desde então, várias descrições foram realizadas de tratamento com tetraciclina em larvas de diferentes mosquitos, todas elas apresentando alta mortalidade (Awahmukalah e Brooks, 1983; Suenaga, 1992; Dobson e Rattanadechakul, 2001) e, pelo menos no caso de Dobson e Rattanadechakul (2001), com bastante pouca eficiência já que, após duas gerações, a bactéria foi detectada novamente. Em nossas mãos, o tratamento das larvas também resultou em 100% de mortalidade.

Yen e Barr (1973) adicionaram leveduras, como suplemento alimentar, à solução de cloridrato de tetraciclina onde as larvas se desenvolviam. Segundo eles, essa adição foi essencial para o crescimento larval, já que o crescimento de microorganismos presentes nesta solução foi suprimido por efeito do antibiótico. Awahmukalah e Brooks (1985) também trataram os mosquitos em solução de cloridrato de tetraciclina e não conseguiram realizar a cura em larvas de *Cx. pipiens pipiens* devido ao fato desses animais depositarem poucos ovos viáveis. Estes autores adicionaram leveduras à solução, o que favoreceu o crescimento de *Pseudomonas* spp. e micélios de fungos, provocando inviabilidade de 100%. Estes autores também discutem que, no trato digestivo desses mosquitos podem ser encontradas espécies de rickettsiae, além de outras bactérias simbiotes, que poderiam ser mortas pelo antibiótico, causando falha no amadurecimento dos ovários e inviabilizando os ovos. Como estes autores também observaram que o tratamento com cloridrato de tetraciclina causava menor impacto

³ Ghelelovitch, 1952 apud Werren, 1997, p.588.

em larvas de estágio mais avançado, também testamos o tratamento de larvas L4, porém continuamos a observar 100% de mortalidade.

Devido a esses fatos e ao sucesso que obtivemos com o tratamento dos adultos, nós não testamos a adição de suplemento alimentar.

Dobson e Rattanadechakul (2001) preconizam a maior eficácia do tratamento dos adultos. Eles conseguiram “curar” parte dos adultos de *Ae. albopictus* superinfectados com as cepas A e B da *Wolbachia*. Depois de vários cruzamentos entre animais livres de infecção, eles conseguiram produzir uma colônia “limpa”.

Estes autores iniciaram o tratamento dos adultos logo após a emergência e ofereceram alimentação sangüínea logo ao final do tratamento. Testamos esse método, porém, os mosquitos que realizaram o repasto, depositavam ovos inviáveis. Sabendo que o intestino dos mosquitos de nossa colônia só amadurece morfológicamente por volta do quinto dia após a emergência, consideramos como possível que o tratamento antibiótico precoce estivesse modificando a flora presente no trato digestivo, ainda com características larvais (Awahmukalah e Brooks, 1985), assim alterando a digestão do sangue e, como consequência, o processo vitelogenético. Contornamos esse problema iniciando o tratamento somente 7 dias após a emergência e, após o tratamento, deixando os animais por mais 3 dias com solução de sacarose, antes do oferecimento de sangue.

Após estas alterações observamos que a geração F1 se apresentou positiva na PCR mas, após seu tratamento, o teste foi negativo na geração F2, fato que foi acompanhado até a F23, a partir da qual começamos a Wfc.

5.2 Aspectos Reprodutivos

A literatura descreve várias vantagens e desvantagens que os animais infectados com *Wolbachia* sp. teriam sobre seus congêneres livres de infecção (Iturbe-Ormaetxe e O'Neill, 2007). Contudo, os resultados publicados com diferentes insetos são bastante controversos. Dobson e colaboradores (2004) relatam aumento de fecundidade e fertilidade em *Ae. albopictus* infectados. Dois anos depois, Islam e Dobson (2006) descrevem, neste mesmo modelo, uma maior sobrevivência nos estágios juvenis da colônia infectada, mas uma queda na longevidade das fêmeas adultas da mesma colônia.

Cinco cepas de *Drosophila melanogaster* infectadas foram comparadas com seus congêneres não infectados após tratamento, em relação a fecundidade, viabilidade e longevidade e os resultados também foram bastante aleatórios já que uma das cepas não apresentou diferenças entre a infectada e a “curada”, em duas outras cepas só foi observado aumento da longevidade ou da fecundidade nos animais infectados, uma quarta cepa teve menor sobrevivência dos animais infectados e, na última, houve um aumento da fecundidade e da longevidade, mas caiu a viabilidade (Fry *et al.*, 2004).

Estudos realizados em *Liposcelis tricolor* mostraram aumento de fecundidade e longevidade nos animais infectados sem concluir sobre as possíveis causas (Dong *et al.*, 2007).

Apesar de não significativo, nossos estudos sugerem um aumento da viabilidade nos mosquitos da colônia Wc, já que, apesar de terem produzido uma menor quantidade de ovos, o número de adultos emergidos foi semelhante em ambas as colônias.

O fato de os mosquitos da colônia Wc produzirem uma quantidade menor de ovos pode estar relacionado ao consumo de nutrientes pelas bactérias, como foi descrito em mosquitos infectados com diferentes patógenos. Lima e colaboradores (2003) descrevem que a infecção por *Wuchereria bancrofti* em mosquitos *Cx. quinquefasciatus* causa redução no número médio de ovos depositados. O mesmo é relatado por Styer e colaboradores (2007) em mosquitos *Culex tarsalis* infectados com Vírus do Oeste do Nilo e estes autores relacionam o fato ao consumo de nutrientes pelo agente infeccioso ou pela resposta imune causada por ele em seus hospedeiros.

Nossos experimentos de aptidão reprodutiva indicam que o tempo de oviposição após a alimentação sangüínea não diferiu entre as duas colônias. Porém, o estudo morfológico de desenvolvimento ovariano mostrou uma diferença significativa no amadurecimento dos ovários da colônia Wc, o que sugere desenvolvimento mais rápido do ovo, fato que poderia estar relacionado com a redução no número de ovos desta colônia. Não conhecemos estudos comparativos do desenvolvimento ovariano em animais infectados ou não.

Não achamos diferenças qualitativas nem quantitativas significativas na análise eletroforética de extratos de ovários das colônias Wfc e Wc. Das bandas presentes na eletroforese reconhecemos apenas duas delas, as subunidades maior e menor da vitelina

(André F. Cardoso, 2008, comunicação pessoal⁴). Ahmed e colaboradores (2001) observaram, por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), uma menor quantidade de vitelina nos ovários de *Anopheles gambiae* infectados por *Plasmodium yoelli nigeriensis*, o que reduziu o número de ovos e sua viabilidade. Eles relacionam este fato com a queda, nos mosquitos infectados, da quantidade de mRNA responsável pela transcrição da vitelogenina. Nosso método de quantificação protéica, apesar de semi-quantitativo, não apontou essa diferença, assim, não podemos relacionar a menor quantidade de ovos produzidos com a maior viabilidade observadas nos mosquitos da colônia Wc.

Segundo Braig e colaboradores (1998), que purificaram *Wolbachia* de ovos de *Drosophila*, a proteína WSP (codificada pelo gene WSP), tem um tamanho de 28 kDa, medido por eletroforese em gel de poliacrilamida. Em nossas eletroforeses de extratos de ovário, não encontramos nenhuma banda com este tamanho e outras com tamanhos pouco diferentes revelaram-se com a mesma intensidade, assim, não pudemos relacionar alguma proteína com a presença da bactéria.

5.3 Incompatibilidade citoplasmática

Stouthamer e colaboradores (1999) sugeriram que a incompatibilidade citoplasmática poderia ser utilizada como controle populacional de mosquitos: a soltura de machos infectados na natureza para que eles cruzassem com fêmeas não infectadas produziria uma queda populacional. Dean e Dobson (2004) também propuseram que manipulações na infecção por *Wolbachia* poderiam suprimir ou diminuir a população de vetores de importância médica.

O resultado da PCR realizada com os mosquitos coletados na natureza mostrou que todas as amostras de ambos os locais estavam infectadas com a cepa B de *Wolbachia*. Cabe aqui ressaltar que os mosquitos do Rio Pinheiros sob grande pressão de inseticidas, aplicados regularmente pela prefeitura, o que induz uma grande seleção, diferentemente dos mosquitos do Parque Ecológico, onde é proibido o uso de inseticidas, o que faz do local um grande criadouro de mosquitos que chegam a 6 mosquitos *Culex sp.* por metro quadrado (Gabriel Z.

⁴ André Franco Cardoso, doutorando no Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo, 2008.

Laporta, comunicação pessoal)⁵. Ou seja, no caso da cidade de São Paulo, a soltura de machos infectados, como proposto por Stouthamer (1999), provavelmente, só aumentaria a população destes mosquitos.

⁵ Gabriel Zorelo Laporta, Mestre em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2008.

6 CONCLUSÃO

O tratamento dos adultos de nossa colônia de *Culex quinquefasciatus* foi eficaz e conseguimos iniciar uma colônia 100% livre da infecção (Wfc). Já o das larvas foi ineficiente, apresentando mortalidade de 100%.

Os mosquitos infectados (colônia Wc) depositam menor quantidade de ovos, porém, estes são mais viáveis, o que faz com que o número de adultos emergidos seja estatisticamente igual.

A análise microscópica dos ovários indica um amadurecimento mais tardio nos mosquitos da colônia Wfc.

Não observamos diferenças qualitativas nem quantitativas na composição protéica dos ovário de mosquitos de ambas as colônias.

Confirmamos a existência do fenômeno de incompatibilidade citoplasmática em nossa colônia.

Estudo preliminar mostrou que todos os mosquitos coletados em diferentes locais da cidade de São Paulo estão infectados com *Wolbachia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Ahmed AM, Maingon R, Romans P, Hurd H. Effects of malaria infection on vitellogenesis in *Anopheles gambiae* during two gonotrophic cycles. *Insect Mol Biol*. 2001;10:347-56.

Awahmukalah DS, Brooks MA. Search for a sensitive stage for aposymbiosis induction in *Culex pipiens pipiens* by antibiotic treatment of immature stages. *J Invertebr Pathol*. 1985;45:54-9.

Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol*. 1998;180:2373-8.

Breeuwer JA, Werren JH. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics*. 1993;135:565-74.

Bressac C, Rousset F. The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: DAPI-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. *J Invertebr Pathol*. 1993;61:226-30.

Cho WL, Deitsch KW, Raikhel AS. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:10821-4.

Cho WL, Tsao SM, Hays AR, Walter R, Chen JS, Snigirevskaya ES, Raikhel AS. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J Biol Chem*. 1999;274:13311-21.

Clements AN. The biology of mosquitoes. Development, nutrition, and reproduction. New York and London: Chapman and Hall; 1992. v.1.

Deitsch KW, Raikhel AS. Cloning and analysis of the locus for mosquito vitellogenic carboxypeptidase. *Insect Mol Biol*. 1993;2:205-13.

*

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Dobson SL, Rattanadechakul W. A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2001;38:844-9.

Dobson SL, Rattanadechakul W, Marsland EJ. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. Heredity. 2004;93:135-42.

Dong P, Wang JJ, Hu F, Jia FX. Influence of wolbachia infection on the fitness of the stored-product pest *Liposcelis tricolor* (Psocoptera: Liposcelididae). J Econ Entomol. 2007;100:1476-81.

Duron O, Fort P, Weill M. Influence of aging on cytoplasmic incompatibility, sperm modification and *Wolbachia* density in *Culex pipiens* mosquitoes. Heredity. 2007;98:368-74.

Fry AJ, Palmer MR, Rand DM. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. Heredity. 2004;93:379-89.

Islam MS, Dobson SL. *Wolbachia* effects on *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) immature survivorship and development. J Med Entomol. 2006;43:689-95.

Iturbe-Ormaetxe I, O'Neill SL. Wolbachia-host interactions: connecting phenotype to genotype. Curr Opin Microbiol. 2007;10:221-4.

Kittayapong P, Mongkalangoon P, Baimai V, O'Neill SL. Host age effect and expression of cytoplasmic incompatibility in field populations of Wolbachia-superinfected *Aedes albopictus*. Heredity. 2002;88:270-4.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5.

Lima CA, Almeida WR, Hurd H, Albuquerque CM. Reproductive aspects of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98:217-22.

Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C. How many *Wolbachia* supergroups exist? Mol Biol Evol. 2002;19:341-6.

Min KT, Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:10792-6.

O'Neill SL, Paterson HE. Crossing type variability associated with cytoplasmic incompatibility in Australian populations of the mosquito *Culex quinquefasciatus* Say. Med Vet Entomol. 1992;6:209-16.

Poinsot D, Charlat S, Mercot H. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. Bioessays. 2003;25:259-65.

Raikhel AS. Monoclonal antibodies as probes for processing of the mosquito yolk protein; a high-resolution immunolocalization of secretory and accumulative pathways. Tissue Cell. 1987a;19:515-29.

Raikhel AS. The cell biology of mosquito vitellogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987b;82 Suppl 3:93-101.

Reynolds KT, Hoffmann AA. Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. Genet Res. 2002;80:79-87.

Romoser WS, Rothman ME. Presence of a Peritrophic Membrane in Pupal Mosquitos (Diptera-Culicidae). J Med Entomol. 1973;10:312-314.

Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. Free Radic Biol Med. 2000;28:289-309.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning : a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. v.2.

Sinkins SP, Walker T, Lynd AR, Steven AR, Makepeace BL, Godfray HC, Parkhill J. *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. Nature. 2005;436:257-60.

Stouthamer R, Breeuwer JA, Hurst GD. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annu Rev Entomol. 1999;53:71-102.

Timmermann SE, Briegel H. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. J Insect Physiol. 1999;45:461-470.

Turelli M, Hoffmann AA. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. Genetics. 1995;140:1319-38.

Voronin DA, Dudkina NV, Kiseleva EV. A new form of symbiotic bacteria *Wolbachia* found in the endoplasmic reticulum of early embryos of *Drosophila melanogaster*. Dokl Biol Sci. 2004;396:227-229.

Werren JH. Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomol. 1997;42:587-609.

Yen JH, Barr AR. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. Nature. 1971;232:657-8.

Yen JH, Barr AR. The Etiological Agent of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens*. J Invertebr Pathol. 1973;22:242-50.

Zhou WG, Rousset F, O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. Proc R Soc Lond, B, Biol Sci. 1998;265:509-515.