

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



Mecanismos de transmissão vertical e horizontal do endossimbionte *Wolbachia*

Vitor Gouveia Faria

**MESTRADO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA E DO
DESENVOLVIMENTO**

2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



Mecanismos de transmissão vertical e horizontal do endossimbionte *Wolbachia*

Vitor Gouveia Faria

Dissertação de mestrado orientada por:

Doutor Élio Sucena

**MESTRADO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA E DO
DESENVOLVIMENTO**

2009

Abstract

Bacteria from the genus *Wolbachia* are endosymbiotic intracellular organisms, present in several animals, establishing parasitic relationships with arthropods and mutualistic associations with numerous filarial nematodes. As their vertical transmission is exclusively maternal, *Wolbachia* promotes reproductive changes on its hosts, increasing the fitness of the infected females and consequently their frequency of transmission. Therefore, *Wolbachia* severely contribute for evolutionary mechanisms, such as sexual selection and speciation.

Additionally, *Wolbachia*'s and its hosts' phylogeny are not concordant, suggesting the occurrence of vertical transmission events as well as sporadic phenomena of horizontal transmission as a possible scenario. However, the ecological mechanisms responsible for this transmission between the several hosts are still unknown. In this work, we looked at ingestion as a possible transmissible natural vector between different species of the genus *Drosophila*. For that, several experiments of cannibalism were conducted, between infected and non-infected hosts, from different species and stages. In the respective analyses of the tested individuals' progeny, we did not find any *Wolbachia* infections.

As the experimental design above described would not be enough to explain the process behind the transmission (only confirming the ecological mechanism), we have also performed a complementary approach in parallel, where a "step by step" perspective of the supposed horizontal transmission by ingestion was put into priority. As so, a new technique of *in vivo* and *ex vivo* microscopy imaging was developed, allowing for a follow-up of bacteria viability and its interaction dynamics with the host.

It was recently shown that, once inside the new host's hemolymph, *Wolbachia* can establish itself in the ovaries and pass to the next generation. As so, we investigated Malpighi tubes as a hypothetical region of connection between ingestion and ovaries access. *Wolbachia* was found inside the tubule cells of the individuals that had ingested the bacteria. This fact leads us to the possibility of the bacteria as having passed by exocytosis to the hemolymph. However, *Wolbachia* would only be viable if it survived the several mechanisms of host defence. We then performed *in vitro* immunity assays and verified that *Wolbachia* is indeed phagocitized and killed by hemocytes, a relevant result for the study of this bacteria escape strategy to the host's immune response.

Key Words – *Wolbachia*, Endosymbiosis, Horizontal Transmission, Ingestion, *Drosophila*, Vertical Transmission, Malpighian Tubules, Immunity, Coevolution.

Resumo

As bactérias do género *Wolbachia* são endossimbiontes intracelulares de muitas espécies de animais, estabelecendo relações de parasitismo com artrópodes e de mutualismo com vários nemátodes filariais. Como a sua transmissão é exclusivamente materna, *Wolbachia* promove modificações reprodutivas nos seus hospedeiros, aumentando a *fitness* das fêmeas infectadas e, por consequência, a sua frequência de transmissão. Assim *Wolbachia* pode contribuir de forma severa para processos evolutivos de selecção sexual e especiação.

Adicionalmente, a filogenia de *Wolbachia* não é concordante com a dos seus hospedeiros, o que indicia fenómenos esporádicos de transmissão horizontal deste endossimbionte. Porém os mecanismos ecológicos responsáveis por esta passagem entre os diversos hospedeiros são ainda uma incógnita. Aqui olhámos para a ingestão como um possível vector natural de transmissão em diferentes espécies do Género *Drosophila*. Para isso, foram realizadas diversas experiências de canibalismo entre hospedeiros infectados e não infectados, de diferentes estádios e espécies. Nas respectivas análises da progenia dos indivíduos testados não foram encontradas quaisquer infecções por *Wolbachia*.

Como o delineamento acima descrito não seria suficiente para explicar qual o processo fisiológico por detrás da transmissão (apenas confirmaria o mecanismo ecológico), paralelamente foi realizada uma abordagem complementar, onde foi priorizada uma perspectiva “passo a passo” da eventual transmissão horizontal por ingestão. Para tal foi desenvolvida uma nova técnica de imagiologia *in vivo* e *ex vivo*, possibilitando assim seguir a viabilidade da bactéria e sua dinâmica de interacção com o hospedeiro.

Recentemente foi mostrado que uma vez na hemolinfa do novo hospedeiro, *Wolbachia* consegue se estabelecer nos ovários e passar para a próxima geração. Assim, investigámos os túbulos de Malpighi como hipotética zona de ligação entre a ingestão e o acesso aos ovários. Foi encontrada *Wolbachia* dentro das células dos túbulos de indivíduos que ingeriram a bactéria. Este facto nos remete para a possibilidade da posterior passagem da bactéria para a hemolinfa por exocitose. Porém, *Wolbachia* só será viável se conseguir sobreviver aos inúmeros mecanismos de defesa do organismo. Realizámos então ensaios de imunidade *in vitro* e verificámos que *Wolbachia* é fagocitada e morta pelos hemócitos, um relevante dado para o estudo da estratégia de fuga desta bactéria a resposta imune do novo hospedeiro.

Palavras-chave – *Wolbachia*, endossimbiose, Transferência Horizontal, Ingestão, *Drosophila*, Transmissão Vertical, Túbulos de Malpighi, Imunidade, Coevolução.

Índice

Abstract	3
Resumo	4
Índice	5
Índice de Figuras	7
Abreviações	7
Agradecimentos	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. SIMBIOSE	9
1.1.1. ENDOSSIMBIOSE BACTERIANA	10
1.1.1.1. MECANISMOS DE PERPETUAÇÃO	10
1.1.1.2. ENDOSSIMBIONTES EM INSECTOS	12
1.2. <i>DROSOPHILA</i> COMO ORGANISMO MODELO	13
1.3. <i>WOLBACHIA PIPIENTIS</i>	14
1.3.1. TRANSMISSÃO VERTICAL	15
1.3.2. TRANSMISSÃO HORIZONTAL	17
1.3.2.1. INGESTÃO	20
1.4. O TÚBULO DE MALPIGHI EM <i>DROSOPHILA</i>	21
1.4.1. MORFOLOGIA E FISIOLOGIA	21
1.4.2. IMUNIDADE AUTÓNOMA	22
1.5. IMUNIDADE EM <i>DROSOPHILA</i> EM RESPOSTA A INFECÇÕES NATURAIS	23
2. OBJECTIVO DO PROJECTO	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	26
3.1.1. Populações	26
3.1.2. Manutenção	26
3.1.3. Dissecção de tecidos	26
3.2. Preparação de DNA genómico	26
3.3. Quantificação de ácidos nucleicos	26
3.4. Polymerase chain reaction (PCR)	27
3.5. Eletroforese em gel de agarose	27
3.6. Sequenciação de DNA	27

3.7. Extracção de <i>Wolbachia</i>	27
3.8. Microinjecção	28
3.9. Ensaios de Ingestão	28
3.10. Marcação fluorescente de <i>Wolbachia</i>	28
3.11. Imagiologia dos túbulos de Malpighi	29
3.11.1. Microscopia Multifotão	29
3.11.1.1. Fluorescência <i>in vivo</i>	29
3.11.1.2. Fluorescência <i>ex vivo</i>	29
4. RESULTADOS	30
4.1. PRESENÇA OU AUSÊNCIA BACTERIANA NAS POPULAÇÕES E SUB-POPULAÇÕES	30
4.2. NÃO ENCONTRADA PASSAGEM POR INGESTÃO, EM LABORATÓRIO, EM PROGENIA DE INDIVÍDUOS DE <i>DROSOPHILA</i> QUE INGERIRAM <i>WOLBACHIA</i>	31
4.3. EFICÁCIA DO MÉTODO DE IMAGIOLOGIA PARA VISUALIZAÇÃO DE <i>WOLBACHIA</i>	33
4.4. TÚBULO DE MALPIGHI PODEM SER UMA ZONA DE PASSAGEM PARA <i>WOLBACHIA</i> APÓS INGESTÃO	34
4.4.1. CONFIRMAÇÃO DE <i>WOLBACHIA</i> NOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE MOSCAS INFECTADAS	34
4.4.2. <i>WOLBACHIA</i> É ENCONTRADA VIVA NOS TÚBULOS DE MALPIGHI APÓS INGESTÃO	34
4.5. ACTIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNITÁRIO POR <i>WOLBACHIA</i>	35
4.6. SUMÁRIO	36
5. DISCUSSÃO	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Representação das relações simbióticas na natureza	9
Figura 1.2 – Transmissão horizontal esporádica de bactérias endossimbiontes facultativas	11
Figura 1.3 – Dinâmica e localização de <i>Wolbachia</i> na oogénese de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
Figura 1.4 – Transmissão de <i>Wolbachia</i> por transferência de hemolinfa infectada	19
Figura 1.5 – Principais caminhos de infecção bacteriana em insectos	20
Figura 1.6 – Características do túbulo de Malpighi	22
Figura 1.7 – Resposta imune em <i>Drosophila</i>	24
Figura 4.1 – Análise bacteriana para a fundação das populações de <i>Drosophila</i>	30
Figura 4.2 – Ausência de progenia infectada após ingestão de <i>Wolbachia</i>	32
Figura 4.3 – Dinâmica e localização de <i>Wolbachia</i> na oogénese de <i>Drosophila melanogaster</i>	33
Figura 4.4 – Presença de <i>Wolbachia</i> nos túbulo de Malpighi das populações infectadas	34
Figura 4.5 – Presença de <i>Wolbachia</i> dentro das células do túbulo de Malpighi após ingestão .	35
Figura 4.6 – <i>Wolbachia</i> é fagocitada e morta pelos hemócitos	36
Figura 5.1 – Modelo hipotético de transmissão horizontal de <i>Wolbachia</i> , após ingestão, via túbulo de Malpighi	41
Figura 5.2 – Representação esquemática da interacção de <i>Wolbachia</i> com o sistema imunitário de <i>Drosophila</i>	42

Abreviações

TET	Populações tratadas com o antibiótico tetraciclina (sem <i>Wolbachia</i>)
WOL	Populações infectadas com <i>Wolbachia</i>
GFP	Green Fluorescent Protein
DNA	Deoxyribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate buffered saline
TBE	Solução tampão Tris/Borate/EDTA
EtBr	Ethidium bromide
PGRP	Peptidoglycan recognition proteins
AMP	Antimicrobial peptides
ROS	Reactive oxygen species

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao meu tutor e camarada Élio Sucena,
Não apenas pelo suporte e orientação, mas também pela sensibilidade e amizade.

Agradeço a todos que comigo partilharam a bancada,
Não apenas a pedra, mas também as horas e as ideias.
Obrigado por tudo Alex, Barbara, Alexis e Catarina.

Obrigado Kadu, por toda a ajuda.
Da força à técnica.

Obrigado Luís, pelo apoio.

Obrigado aos meus amigos
Cohort ímpar de futuro incerto.
É uma honra o prazer da nossa alegria.

Com especial amor, agradeço a família
Por tudo, sempre e tanto.

Finalmente,
Agradeço ao meu unicórnio azul, que sempre regressou das suas jornadas.

1. INTRODUÇÃO

1.1. SIMBIOSE

Simbiose é a terminologia genérica para classificar as interações biológicas estáveis entre organismos de espécies diferentes, conferindo vantagem ou desvantagem a pelo menos um dos interactuantes¹ (Figura 1.1). Diversas relações simbióticas estão presentes no nosso planeta, onde esta dinâmica de interações contribuem intensamente na evolução das espécies e na sua ecologia²⁻³. Tanto intra como inter Reinos, relações permanentes ou esporádicas entre organismos de espécies distintas podem ser encontradas em inúmeros habitats e ambientes, estando a co-evolução entre espécies intimamente ligada a taxa de evolução e fenómenos de especiação⁴. Muitas destas relações baseiam-se numa interacção de contacto entre os

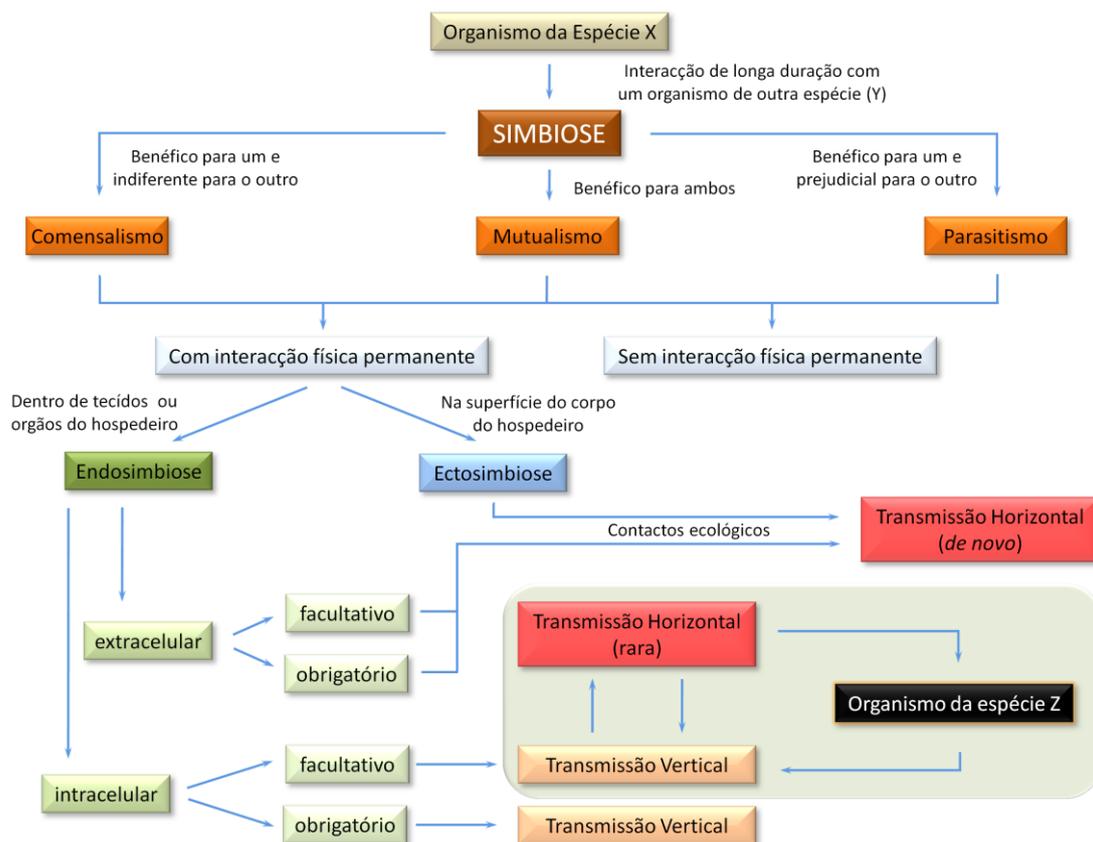


Figura 1.1. – Representação das relações simbióticas na natureza. Quando dois organismos de espécies diferentes se relacionam de forma estável na natureza estamos perante uma relação simbiótica. Estas podem apresentar várias combinações de *outputs* entre os interactuantes, com ou sem interacções físicas permanentes. Tanto a ectossimbiose como a endossimbiose extracelular são mantidas indirectamente, ou seja, por transmissão horizontal intraespecífica, onde a simbiose é realizada *de novo* nas gerações vindouras através de íntimos contactos ecológicos. Na endossimbiose intracelular temos uma transmissão vertical, materna e/ou paterna, dos endossimbiontes obrigatórios, parceiros *sine qua non* para o desenvolvimento e reprodução dos hospedeiros. Aqui, os parceiros apresentam uma estreita co-evolução, sendo a diversificação dos endossimbiontes concordantes com a diversificação das linhagens hospedeiras. Já os endossimbiontes facultativos, ou seja, não essenciais para os hospedeiros, apesar de serem também transmitidos por transmissão vertical apresentam raras transmissões horizontais dentro e entre espécies hospedeiras.

organismos, sendo um dos parceiros endossimbionte ou ectossimbionte². Ao contrário dos ectossimbiontes que se estabelecem na superfície do corpo do seu hospedeiro, os endossimbiontes se alojam no interior de tecidos ou órgãos dos hospedeiros, intra ou extracelularmente². Essas associações perduram através das gerações através da transmissão vertical (materna e/ou paterna), ou seja, directamente⁴ (por exemplo endobactérias⁵ em fungos, ou diversos endossimbiontes em invertebrados⁶); ou uma transmissão horizontal, indirecta, onde as associações são realizadas *de novo*⁴ (como a nodulação radicular⁷ ou a micorrização⁸). A endossimbiose pode ainda ser obrigatória ou facultativa (para um, para ambos ou para nenhum), de acordo com a necessidade da presença do endossimbionte para o organismo completar o seu ciclo de vida⁴.

1.1.1. ENDOSSIMBIOSE BACTERINA

Cada vez mais as descobertas científicas têm confirmado a simbiose como um motor evolutivo tremendamente eficaz. Num planeta onde a vida abunda e diversas populações de variadas espécies coabitam nos mesmos habitats, é inevitável que relações ecológicas próximas se estabeleçam e alterem as pressões selectivas que estes organismos sofriam até então. Em especial, as bactérias endossimbiontes intracelulares têm vindo a ser descobertas e estudadas. Estas relações endossimbióticas podem ser encontradas em todos os Reinos do Domínio Eucarya, com maior ou menor frequência, sendo provável que muitas ainda estejam por descobrir, assim como todo o potencial de modificações fenotípicas que podem causar. Adicionalmente, por poderem apresentar relações promíscuas com diversos hospedeiros intra e interespecíficos, estas bactérias apresentam um enorme potencial de bifurcação dos caminhos evolutivos das populações que as albergam.

1.1.1.1. MECANISMOS DE PERPETUAÇÃO

Muitas são as bactérias que completam o seu ciclo de vida dentro de células eucarióticas, sendo este grupo totalmente polifilético e com uma enorme gama de consequências para os seus hospedeiros⁹. Como já referido, algumas são transmitidas verticalmente, pelos progenitores, e outras horizontalmente, através de reassociações frequentes ou raras. Porém, estes dois tipos de transmissões estão ligadas ao longo da evolução, pois em muitos casos não há concordância entre a filogenia das bactérias e a dos seus hospedeiros, indicando histórias evolutivas cruzadas¹⁰⁻¹¹. Por um lado, o modo de transmissão vertical tem consequências evolutivas muito importantes pois, como prediz a teoria evolutiva, as simbioses mutualistas evoluem a partir de relações parasíticas através da

redução da virulência¹². Da mesma maneira, simbiontes patogénicos ou mutualistas podem ser transmitidos horizontalmente, porém apenas os mutualistas ou menos virulentos serão seleccionados para a transmissão vertical¹³.

Tendo em conta o historial de relações entre estes dois tipos de transmissões, em um meio onde habitam vários organismos infectados e não infectados com bactérias herdáveis, há sempre a possibilidade de íntimos contactos ecológicos que promovam a transmissão horizontal dos endossimbiontes¹⁴⁻¹⁵. Todavia, actualmente estes mecanismos de transmissão não são ainda bem conhecidos, sendo os vectores parasitas e parasitóides duas fortes possibilidades de transmissão. Pelo lado da bactéria, outro interessante ponto se levanta, pois após o *bottleneck* da transmissão horizontal para outra espécie, ocorre outra redução no tamanho populacional da bactéria aquando da transmissão vertical (pois só serão transmitidas à progenia aquelas que se encontram presentes no estágio unicelular)¹⁶. Estes *bottlenecks* têm também importantes consequências na ecologia da bactéria simbiote¹⁶.

Estas endobactérias que mudaram de organismo e de espécie, sofrendo uma forte selecção para permanência no hospedeiro¹⁴, podem ser agora transmitidas verticalmente. E caso tenham trazido da espécie anterior um mecanismo de manipulação reprodutiva (ainda funcional no novo organismo) este pode levar também a uma rápida especiação (Figura 1.2).

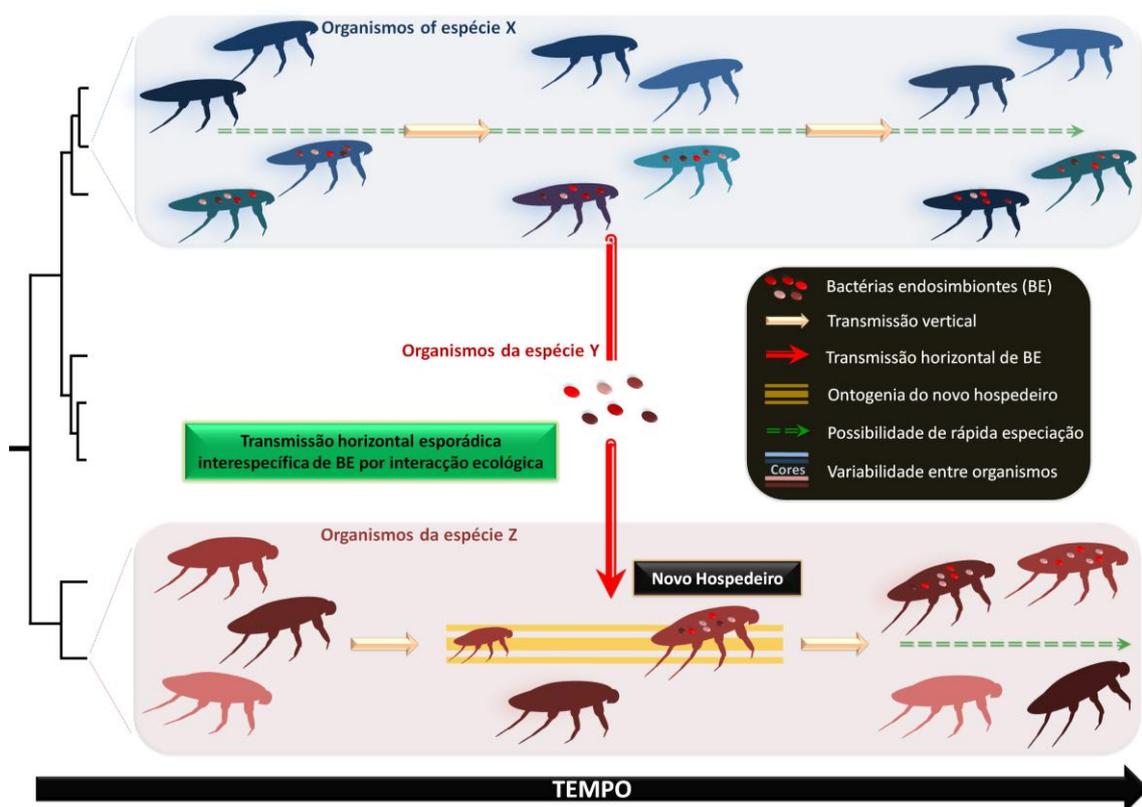


Figura 1.2. – Transmissão horizontal esporádica de bactérias endossimbiontes facultativas.

Ao longo das gerações podemos encontrar indivíduos infectados e não infectados na população da espécie “X” que herdaram as bactérias endossimbiontes (BE) - espécie “Y” - por transmissão vertical (materna e/ou paterna). Num determinado momento, por alguma interacção ecológica de íntimo contacto interespecífico, há a passagem das BE para um novo organismo de uma nova espécie. Esta transmissão pode ser dada, teoricamente, em qualquer momento da ontogenia do organismo da espécie “Z” (no entanto só poderá transmitir verticalmente caso aconteça antes do fim da idade de reprodução). Há então uma combinação entre variabilidade do hospedeiro e variabilidade da população bacteriana transmitida. O novo hospedeiro estará sujeito a uma nova pressão selectiva e propagará a bactéria (por transmissão vertical) de acordo com a sua nova *fitness*. A bactéria, caso traga um mecanismo viável de manipulação da transmissão sexuada (que pode ter sido gerado ao longo da co-evolução com outro hospedeiro mas que utiliza um mecanismo conservado) pode induzir modificações reprodutivas no seu novo hospedeiro, levando a uma rápida especiação.

1.1.1.2. ENDOSSIMBIONTES EM INSECTOS

Os insectos constituem o grupo de animais mais diversificado do nosso planeta e, provavelmente, aquele com mais endossimbiontes⁶. Podemos encontrar bactérias intracelulares herdáveis em várias linhagens de insectos. Algumas se apresentam como obrigatórias para o hospedeiro, resultado de uma estreita co-evolução com a linhagem hospedeira e, consecutivamente, uma diversificação correspondente¹⁷. Normalmente estes endossimbiontes, também denominados primários, alojam-se dentro de órgãos especiais (designado bacterioma) e produzem nutrientes indispensáveis para o hospedeiro¹⁸. Ao longo da co-evolução estas bactérias reduzem ao máximo o seu tamanho e o seu genoma, não sendo registado transmissão horizontal destes simbiontes para outros hospedeiros, pois dependem inteiramente do mecanismo hospedeiro para a sua transmissão (por exemplo *Buchnera aphidicola*, *Nardonella* sp, *Wigglesworthia* sp, entre outras) (para revisão⁶).

Por outro lado, temos as endobactérias facultativas (ou secundárias). Estas bactérias encontram-se presentes em várias células de diversos tecidos hospedeiros, podendo infectar organismos que já possuam endobactérias obrigatórias⁶. Estas bactérias para além de serem transmitidas verticalmente, são transmitidas horizontalmente dentro e entre espécies hospedeiras, mostrando uma curta história evolutiva com a corrente linhagem de hospedeiros⁶. Algumas destas espécies aumentam a *fitness* dos hospedeiros aumentando a protecção contra stresses ou inimigos naturais (*Regiella insecticola*). Outras manipulam directamente a reprodução aumentando a descendência da linhagem de hospedeiros (*Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Sodalis*, *Cardinium*) (para revisão⁶). Porém estas duas categorias de bactérias facultativas não são exclusivas, onde algumas espécies de endossimbiontes alteram o fenótipo e podem causar especiação por manipulações reprodutivas¹⁹. Aqui nós olhamos para o endossimbionte *Wolbachia* tentando entender quais as características da sua dinâmica de interacção com os seus hospedeiros, nomeadamente *D. melanogaster*, que permitem a sua transmissão horizontal para outros organismos.

1.2. *DROSOPHILA* COMO ORGANISMO MODELO

Drosophila é um género pertencente a família Drosophilidae composto por pequenas moscas que são designadas de forma genérica de “fruit flies” (ou mosca do vinagre). Este género integra mais de 1500 espécies, apresentando grandes diferenças de aparência, comportamento e habitat de reprodução. Em particular, uma espécie de *Drosophila*, *D. melanogaster*, tem sido usada de forma massiva em investigação no campo da genética e é um organismo modelo muito recorrente na Biologia do desenvolvimento. Consecutivamente, aproveitando os conhecimentos e ferramentas gerados ao longo de décadas, estudos de fisiologia, evolução e imunidade têm se baseado também em *Drosophila melanogaster*.

Drosophila tem sido alvo de estudos científicos desde o início do século XX, onde ao longo das décadas diversos marcadores genéticos foram descritos. Este facto, associado ao total acesso ao seu genoma sequenciado e ao desenvolvimento de inúmeras ferramentas transgênicas de fácil utilização, fazem de *Drosophila* um poderoso sistema modelo para estudos integrativos²⁰. Adicionalmente, *Drosophila* tem um tempo de geração curto e é fácil e pouco dispendioso manter efectivos populacionais numerosos, sem comprometer a capacidade genética da população. Assim, inúmeras razões fazem de *Drosophila* um organismo modelo com particular significado biológico²⁰.

As ferramentas genéticas em *Drosophila* evoluíram ainda mais com o desenvolvimento do sistema GAL4/UAS (upstream activation sequence)²¹. Este sistema é composto por um gene repórter (o factor de transcrição GAL4) que, em condições normais, é completamente inerte no genoma de *Drosophila*. Todavia este é capaz de promover a transcrição dos transgenes sob o controlo do promotor UAS. Portanto, através da clonagem de um gene de interesse a jusante do promotor UAS, a sua expressão pode ser activada em células onde está presente o factor de transcrição GAL4. Usando esta construção, foi possível desenvolver linhas de moscas GAL4 para transcrição em qualquer tecido ou células de interesse e, como resultado, uma surpreendente variedade de linhas GAL4 estão agora disponíveis para uso. As vantagens deste sistema são extensas, confirmando o estatuto de *Drosophila* como um organismo modelo muito poderoso.

Embora durante anos *Drosophila* não tenha sido um organismo para estudos de interacção ecológica, a utilização das ferramentas geradas associado aos diversos interactuantes naturais desta espécie, fazem desta um excelente hospedeiro para relações endossimbióticas, confirmando *Drosophila* como um modelo muito útil também para estudos ecológicos. Aqui utilizámos diferentes espécies do subgrupo melanogaster, principalmente

D.melanogaster, como hospedeiro modelo para tentar perceber como se processa a transmissão horizontal da bactéria *Wolbachia* intra e interespécies.

1.3. WOLBACHIA PIPIENTIS

As α -proteobactérias do Género *Wolbachia* são Gram-negativas e habitam intracelularmente numa grande variedade de animais, nomeadamente em artrópodes e nemátodes²². Esta bactéria partilha com as demais espécies da Ordem Rickettsiales a característica da endossimbiose celular, normalmente parasítica ou patogénica, causadora de variadas doenças nos seus hospedeiros²²; foi descrita pela primeira vez nos tecidos reprodutores do mosquito *Culex pipiens*, nomenclatura que originou o epíteto específico da bactéria (*pipientis*)²³. Apesar de, formalmente, o Género *Wolbachia* possuir apenas uma espécie, *Wolbachia pipientis*, esta é subdividida em vários clades, sendo a divergência entre as linhagens parasitas, dos artrópodes, e as mutualistas, encontradas nos nemátodes filariais, semelhante à observada entre espécies de outros Géneros de bactérias²⁴.

Sendo considerada uma “Rickettsia-like”, *Wolbachia* está relacionada com as bactérias endossimbiontes que deram origem às mitocôndrias. Várias características as aproximam, nomeadamente a transmissão exclusivamente materna²², a localização em várias células de diversos tecidos hospedeiros, estarem rodeados por membranas lipídicas²⁵ e terem fortes influências metabólicas, mas também a utilização de componentes do citoesqueleto celular para migração para zonas preferenciais no citoplasma²⁶ e a transferência dos seus genes para o genoma nuclear do hospedeiro²⁷. Estas semelhanças remetem para uma possível visualização, em tempo real, do processo simbiótico da formação de organelos, principalmente evidenciada pela coevolução mutualista existente entre os nemátodes filariais e respectivos clades de *Wolbachia*.

A endossimbiose obrigatória confere uma dependência total do hospedeiro por parte da bactéria e, apesar dos nemátodes filariais sobreviverem sem *Wolbachia*, há um decréscimo substancial da sua *fitness* se a eliminarmos do seu organismo, afectando a viabilidade da embriogénese, a fertilidade das fêmeas e a sobrevivência dos adultos²⁸. Assim, vários estudos têm sido realizados na tentativa da utilização desta bactéria como intermediária no tratamento de graves doenças que afectam os humanos e os seus animais domésticos²⁹. Casos clássicos são a elefantíase, a cegueira do rio e a dirofilariose, patologias transmitidas por nemátodes filariais parasitas dos humanos que, por sua vez, são hospedeiros de *Wolbachia*³⁰. Abre-se,

então, um importante campo de estudo e de tratamento destas doenças através da utilização de antibióticos e da consecutiva eliminação da bactéria²⁹.

Pelo lado dos artrópodes, novos estudos têm mostrado que a relação da bactéria endossimbionte *Wolbachia* com estes seus hospedeiros não é tão taxativa como se poderia prever. Esta sempre foi classificada como parasita nestes hospedeiros porém os testes de *fitness* entre populações com e sem o endossimbionte sempre foram realizados em condições laboratoriais, ou seja, com pressões selectivas muito diferentes daquelas que comandaram a co-evolução. Esta visão menos taxativa tem também despontado para outras interações endossimbióticas³¹. Assim, vários estudos têm vindo a provar que, em certos desafios do seu habitat natural, *Wolbachia* pode conferir grandes vantagens aos seus hospedeiros, como protecção contra vírus³² ou a melhor capacidade de absorção de nutrientes³³.

1.3.1 TRANSMISSÃO VERTICAL

Apesar de várias linhagens de artrópodes albergarem estirpes de *Wolbachia*, (como himenópteros, crustáceos e aracnídeos), as relações mais estudadas são com hospedeiros da Ordem Diptera, mais propriamente dos Géneros *Drosophila* e *Culex*.

As bactérias pertencentes aos clades parasitas de artrópodes são normalmente transmitidas verticalmente, de mães para filhas (não sobrevivendo à espermatogénese devido à quantidade diminuta de citoplasma do espermatozóide³⁴), promovendo diversas manipulações reprodutoras. Estas manipulações aumentam a *fitness* das fêmeas infectadas e, conseqüentemente, a sua própria *fitness*, como consequência de um aumento da sua transmissão²². Entre as alterações na reprodução dos hospedeiros incluem-se a indução de incompatibilidade citoplasmática entre indivíduos que não possuem o mesmo estado de infecção (incompatibilidade oócito-espermatozóide), a indução de partenogénese em fêmeas haplóides e feminização ou morte de machos infectados (para revisão³⁵). *Wolbachia* pode assim contribuir de forma drástica para processos evolutivos como os de selecção sexual e especiação³⁶ e, ainda, influenciar abruptamente os mecanismos de determinação sexual³⁷. Como a relação destas bactérias com os artrópodes é normalmente parasítica, há reversão das manipulações quando tratados com antibióticos, sem efeitos nocivos para os hospedeiros³⁷.

Embora seja encontrada no tecido somático dos seus hospedeiros, *Wolbachia* localiza-se maioritariamente nos tecidos reprodutores³⁸. Em *Drosophila melanogaster*, estas bactérias estão inicialmente distribuídas uniformemente, em todas as partes da linha germinal feminina. Porém, durante os estádios intermédios da oogénese, esta exhibe uma localização posterior, concentrando-se assim no futuro oócito e ancorando-se a factores do hospedeiro²⁶ (Figura

1.3). Nesta fase, é visível uma concentração bacteriana distinta entre o córtex anterior e o núcleo do oócito, onde muitas bactérias aparecem em contacto com o envelope nuclear. É também nestes estágios que ocorre um período de replicação no ciclo de vida da *Wolbachia*²⁶. Ferree e colaboradores demonstraram que os filamentos de microtúbulos, bem como certos motores moleculares (como a dineína e a dinactina) são requisitados para a localização subcelular das bactérias, sugerindo que *Wolbachia* utiliza o citoesqueleto e o sistema de transporte intracelular do hospedeiro para migrar e assegurar a sua transmissão para a próxima geração²⁶ (Figura 1.3). Esta dependência dos microtúbulos é, também, latente na embriogénese, onde *Wolbachia* é transportada dentro do ovo através de motores moleculares, nomeadamente cinesina-1³⁹. Assim, a bactéria migra para o polo posterior dos ovos em maturação, assegurando a sua integração nas células reprodutoras (células polares) que aí se formarão durante a embriogénese³⁹.

No momento de replicação da célula hospedeira, dá-se a desintegração do invólucro nuclear e um conseqüente livre contacto entre *Wolbachia* e os cromossomas metafásicos (ambos ligados aos microtúbulos) potenciando assim o frequente fenómeno de transferência horizontal de genes de *Wolbachia* para o hospedeiro²⁷. Este fenómeno é relativamente comum em bactérias intracelulares com um estilo de vida maioritariamente obrigatório. Várias espécies foram já descritas como possuidoras de porções génicas de *Wolbachia* no seu genoma, sendo *Drosophila ananassae* um exemplo de um caso extremo, pois esta apresenta

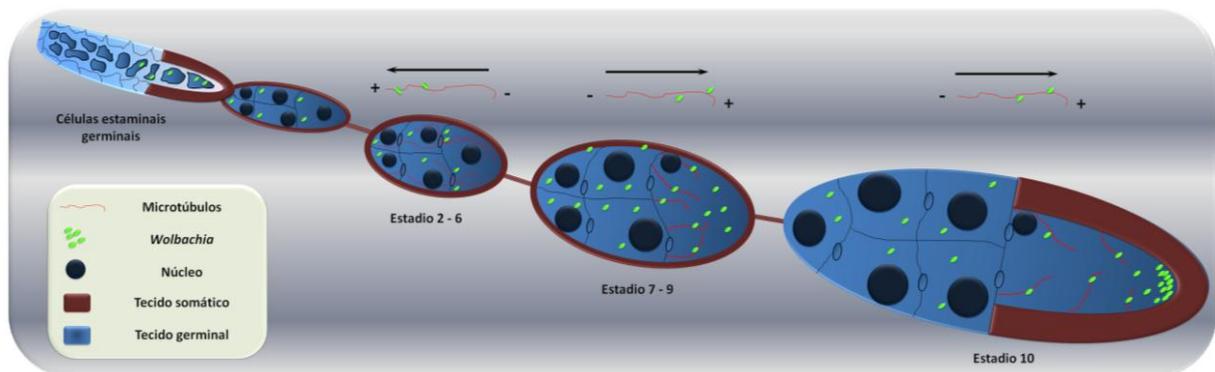


Figura 1.3 – Dinâmica e localização de *Wolbachia* na oogénese de *Drosophila melanogaster*.

Representação esquemática de um ovariolo e diferentes fases da oogénese. O polo posterior se encontra representado sempre à direita, sendo a célula na sua extremidade aquela que dará origem ao embrião (e as demais células nutritivas). A azul escuro vemos o tecido germinal e a castanho o tecido somático. *Wolbachia* está presente nas células germinais estaminais. Ao longo da oogénese é transportada dentro do oócito por motores moleculares associados ao microtúbulos, sempre em direcção à polaridade positiva. Assim, na oogénese precoce (estádio 2-6) *Wolbachia* se localiza na parte anterior do oócito. No estágio 6 o oócito sofre uma inversão de polaridade culminando na completa reorganização da rede de microtúbulos no estágio 7. Assim, nos estádios de 7 a 9 *Wolbachia* apresenta uma localização aparentemente homogénea e dispersa. Porém, na oogénese tardia, *Wolbachia* concentra-se na córtex posterior do oócito, localização está que garante a presença da bactéria nas células polares aquando da sua formação, na embriogénese precoce. Figura adaptada da ref. 26.

uma cópia completa do genoma de *Wolbachia* no seu material genético²⁷.

Outros fenómenos de interacção têm ainda sido descritos e estudados, tentando explicar os mecanismos que regem a dinâmica de infecção e transmissão de *Wolbachia* de uma forma mais completa. Alguns estudos recentes têm tentado estabelecer uma relação válida entre a passagem para a simbiose parasítica (característica derivada dos clades dos artrópodes, visto o ancestral-comum ser mutualista) e a aquisição da relação com um bacteriófago temperado denominado WO-B⁴⁰. Assim, um modelo explicativo foi proposto, baseando-se na densidade de bacteriófagos que condicionariam a densidade de *Wolbachia*, tendo como consequência directa o grau de gravidade da incompatibilidade citoplasmática imposta aos hospedeiros⁴⁰. Outra explicação para a organização da infecção e do controlo populacional bacteriano, baseia-se na comunicação por *quorum-sensing* por parte de *Wolbachia*⁴¹.

Apesar de a sua localização já ter sido descrita nos tecidos reprodutores e no próprio embrião, são ainda amplamente desconhecidas as linhagens celulares somáticas que são infectadas por *Wolbachia* em cada fase do ciclo de vida do hospedeiro. É também uma incógnita qual a localização das bactérias no momento da metamorfose e se deste fenómeno resulta um *bottleneck* bacteriano.

Assim, *Wolbachia pipientis* é um excelente organismo modelo para estudos de evolução pois, como já referido, está intimamente relacionada com diversos fenómenos biológicos e localizada numa rede de relações simbióticas e de interacções inter-espécies e inter-reinos. As suas implicações na determinação sexual, especiação, coevolução endossimbiótica, relação imunológica e estabilidade genómica abrem novas e relevantes perguntas sobre áreas basilares da Biologia.

1.3.2 TRANSMISSÃO HORIZONTAL

Como já referido, *Wolbachia* infecta grande parte das espécies de artrópodes, sendo os insectos os mais recorrentes, onde 20 a 80% das espécies desta Classe são parasitadas pela bactéria²². Esta presença tão dispersa é atribuída a inúmeros casos de transmissão horizontal da bactéria ao longo do tempo¹⁵. Como os insectos correspondem a 85% dos animais existentes, *Wolbachia* transforma-se assim num dos endossimbiontes mais recorrentes no nosso planeta. As diversas manipulações reprodutoras conduzidas por *Wolbachia*, associadas à fenómenos de transmissão horizontal, são fortes candidatos para contribuir para a biodiversidade dos insectos, uma vez que podem levar sistematicamente, em linhagens distintas, a especiações por isolamento reprodutor³⁶.

Estes fenômenos de transmissão horizontal do endossimbionte *Wolbachia* parecem ser frequentes ao longo da coevolução com seus hospedeiros, pois podem ser encontradas estirpes da bactéria, filogeneticamente próximas, em hospedeiros muito afastados. Assim, ao contrário das mitocôndrias ou das bactérias endossimbiontes obrigatórias para o hospedeiro, a filogenia molecular de *Wolbachia* não é concordante com a dos seus hospedeiros⁴². Foi então sugerido que himenópteros parasitóides de outras espécies sejam um veículo viável de infecção por transmissão horizontal de *Wolbachia*⁴³; no entanto, este mecanismo não seria suficiente para explicar a dispersão de estirpes próximas de *Wolbachia* em organismos filogeneticamente tão afastados. Isto porque ao se confirmar este mecanismo de transmissão, este estará restrito a apenas algumas espécies. Assim, os possíveis mecanismos ecológicos responsáveis pela mudança de hospedeiro, por parte das bactérias, são ainda uma incógnita, sendo esta resposta essencial para a compreensão da capacidade de infecção e dispersão de *Wolbachia*.

Alguns estudos já tinham demonstrado que é possível estabelecer uma infecção com *Wolbachia* num novo hospedeiro de *Drosophila* através da microinjeção da hemolinfa com bactéria em embriões⁴⁴. Porém, a investigação dos mecanismos de transmissão horizontal ganhou um novo fôlego quando, em 2006, Frydman e colaboradores demonstraram que uma vez microinjectada hemolinfa de uma mosca infectada em moscas adultas sem bactérias, estas eram transmitidas verticalmente pelos novos hospedeiros⁴⁵ (Figura 1.4). Os autores apresentaram então um modelo de tropismo de *Wolbachia* em direção aos ovários de *D. melanogaster*, culminando numa infecção estável para a descendência hospedeira⁴⁵. Para tal *Wolbachia* tem que atravessar a camada peritonal do ovário e também o epitélio muscular que cobre os ovários. Adicionalmente, e ainda neste mesmo trabalho, ao monitorizarem o método de transferência artificial por microinjeção, Frydman e colaboradores verificaram que as bactérias apresentam uma entrada polarizada numa zona específica dos ovários, infectando preferencialmente o nicho de células estaminais somáticas⁴⁵. Posteriormente, ao longo da oogénese, *Wolbachia* estabelece a colonização dos oócitos aí gerados (Figura 1.3) perpetuando-se, assim, nos futuros embriões. São necessário 15 dias para a *Wolbachia* apareça na descendência da fêmea hospedeira, sendo este o tempo que a bactéria demora a se estabelecer no ovário e progredir na linha germinal ao longo da oogénese⁴⁵.

Com estas observações, para além do contributo para a compreensão do ciclo de vida da bactéria, foi também aberta uma importante porta para a investigação do mecanismo que possibilita a viabilidade da transmissão horizontal de *Wolbachia* para outros hospedeiros. No entanto, levanta-se a questão de quais as fases de ciclo de vida do hospedeiro com capacidade

para acolher uma transmissão horizontal, sendo fundamental conciliar a procura dos mecanismos ecológicos com as várias fases do desenvolvimento do hospedeiro.

Outro factor que trouxe novas possibilidades para a explicação desta transmissão horizontal endossimbiótica foi a observação da viabilidade da bactéria, fora da sua célula hospedeira durante alguns dias, possibilitando uma possível passagem entre células diferentes⁴⁶. Assim, torna-se fundamental perceber se a transmissão horizontal da bactéria ocorre neste possível período de vida livre ou por células hospedeiras da bactéria que mudam de organismo hospedeiro.

Torna-se, então, premente investigar os mecanismos ecológicos causadores das transmissões horizontais de *Wolbachia*, assim como a frequência com que podem ocorrer na natureza. Será indispensável conciliar estes dados com o estudo da base genética para que este fenómeno se revele um importante avanço para a compreensão desta coevolução simbiótica e da sua dinâmica de interacção.

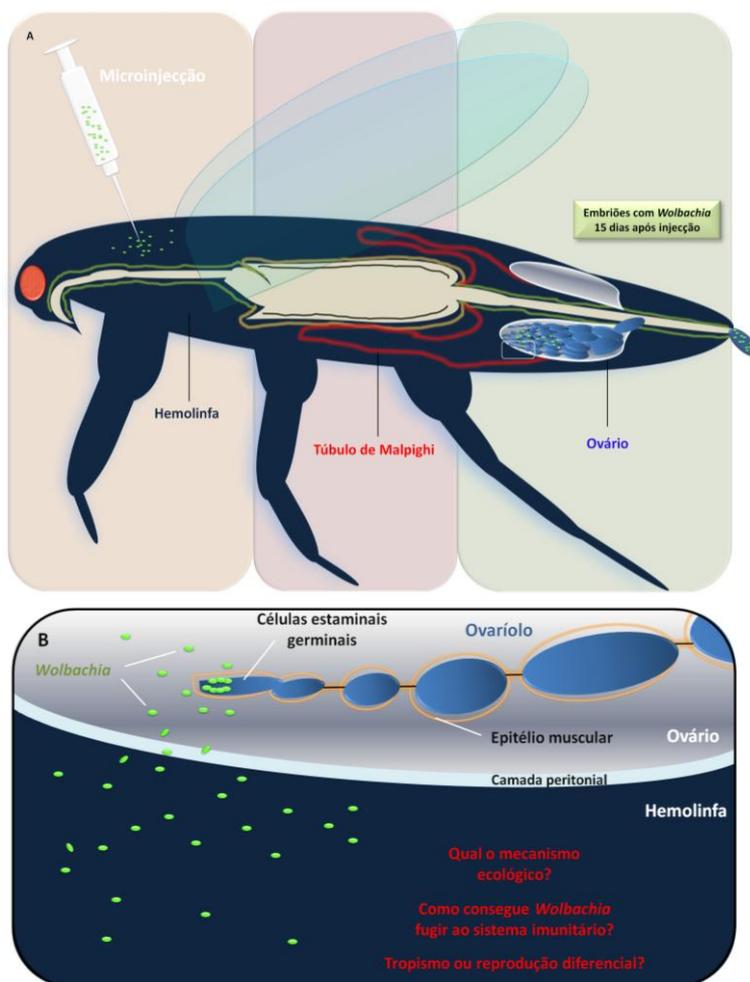


Figura 1.4 – Transmissão de *Wolbachia* por transferência de hemolinfa.

(A) Frydman e colaboradores demonstraram que após a microinjecção de hemolinfa infectada em fêmeas sem a bactéria, *Wolbachia* consegue se estabelecer nos tecidos germinais da nova mosca hospedeira, sendo assim transmitida para as próximas gerações. 15 dias após a transferência de hemolinfa, vários embriões já apresentam a bactéria no seu interior. (B) Representação ampliada da zona de contacto do ovário com a hemolinfa. Para se estabelecer, *Wolbachia* atravessa a camada peritonal do ovário e também o epitélio muscular que envolve todo o ovariolo. *Wolbachia* coloniza então o *pool* de células estaminais germinais que se encontram na extremidade do ovariolo. A partir deste momento, *Wolbachia* utiliza o mesmo procedimento mecanístico para a movimentação e a localização durante a oogénese (Figura 1.3). No entanto, muitas questões estão por responder, todas elas ligadas ao mecanismo ecológico que permite a entrada de *Wolbachia* no novo hospedeiro (na natureza), assim como a sua posterior sobrevivência e reprodução.

1.3.2.1 Ingestão

O sistema digestivo é uma importante interface entre o hospedeiro e o meio ambiente, sendo uma recorrente porta de entrada para agentes patogénicos. O sistema digestivo dos insectos é um tubo contínuo da boca até ao ânus. O canal alimentar é dividido em 3 regiões: a proximal, a média e a distal. A proximal e a distal são de origem ectodérmica, sendo por isso revestidos de cutícula, que é contínua a partir do exterior do corpo. O intestino médio é de origem endodérmica e não é forrado por cutícula; ele compreende uma camada epidérmica que é revestida por uma membrana peritrófica na superfície do lúmen (Figura 1.5). A membrana peritrófica forma uma barreira entre a camada epitelial e o lúmen do intestino, que contém o bolo alimentar. Os microrganismos ingeridos são transferidos passivamente junto com a comida através da boca para a parte posterior da parte proximal, e depois transportados por peristaltismo até o intestino médio (para revisão¹⁴).

Poucas são as bactérias que conseguem persistir em grande número no tracto digestivo dos insectos. É assumido na generalidade que a maioria das bactérias ingeridas são eliminadas

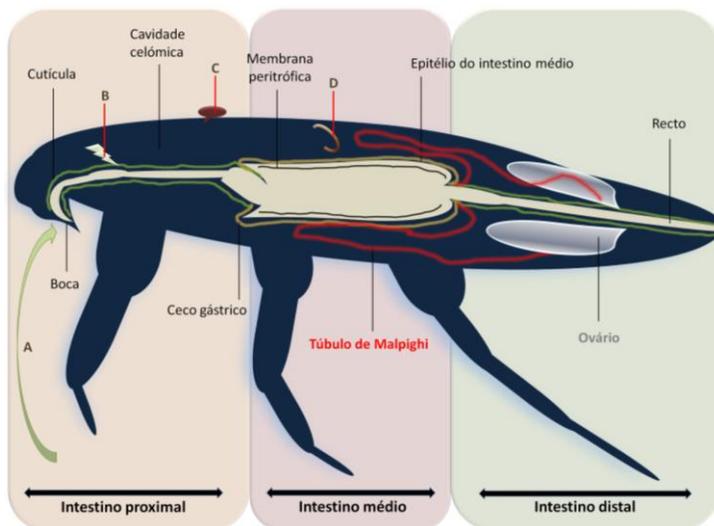


Figura 1.5. – Principais caminhos de infecção bacteriana em insectos. As diferentes barreiras físicas que conferem protecção contra infecção são mostradas no insecto modelo. (A) Ingestão – As diferentes partes do tubo digestivo dos insectos são mostradas assim como os túbulos de malpighi e os ovários. A parte proximal e distal do intestino são revestidas por cutícula, enquanto o epitélio do intestino médio é protegido das bactérias ingeridas pela membrana peritrófica. (B) Ferimento – a entrada directa de bactérias para a cavidade celômica do insecto (e consecutivamente para hemolinfa) pode ocorrer após lesão da cutícula. (C) Vectores parasitas – alguns parasitas que se alimentam da hemolinfa dos insectos (como por exemplo ácaros) podem ser um meio de passagem de bactérias entre hospedeiros. (D) Entrada assistida – Algumas bactérias podem ser conduzidas para dentro do corpo do insecto por nemátodes. Figura adaptada da ref. 14.

pelelo sistema imunitário, por peristaltismo ou por outros mecanismos desconhecidos. No entanto, algumas bactérias asseguram a sua sobrevivência e através da passagem do tracto digestivo do seus hospedeiros para outro órgão, como as glândulas salivares ou a cavidade das patas⁴⁷. Porém, no nosso ponto de vista, os túbulos de Malpighi também são fortes candidatos a uma zona de fuga e proliferação bacteriana, não só pela sua ligação directa ao sistema digestivo mas também por outras inúmeras características singulares. Este fenómeno poderia servir de passo intermédio para a posterior colonização os ovários.

1.4. O TÚBULO DE MALPIGHI EM *DROSOPHILA*

Os túbulos de Malpighi têm sido intensamente estudados ao longo dos anos, não só pela sua morfologia mas também pelas funções que desempenham na fisiologia do organismo. Este tecido se tornou num modelo para estudos epiteliais em animais, não só para crescimento e posição celular, mas também para sinalização, transporte e resposta imunitária.

1.4.1. MORFOLOGIA E FISIOLOGIA

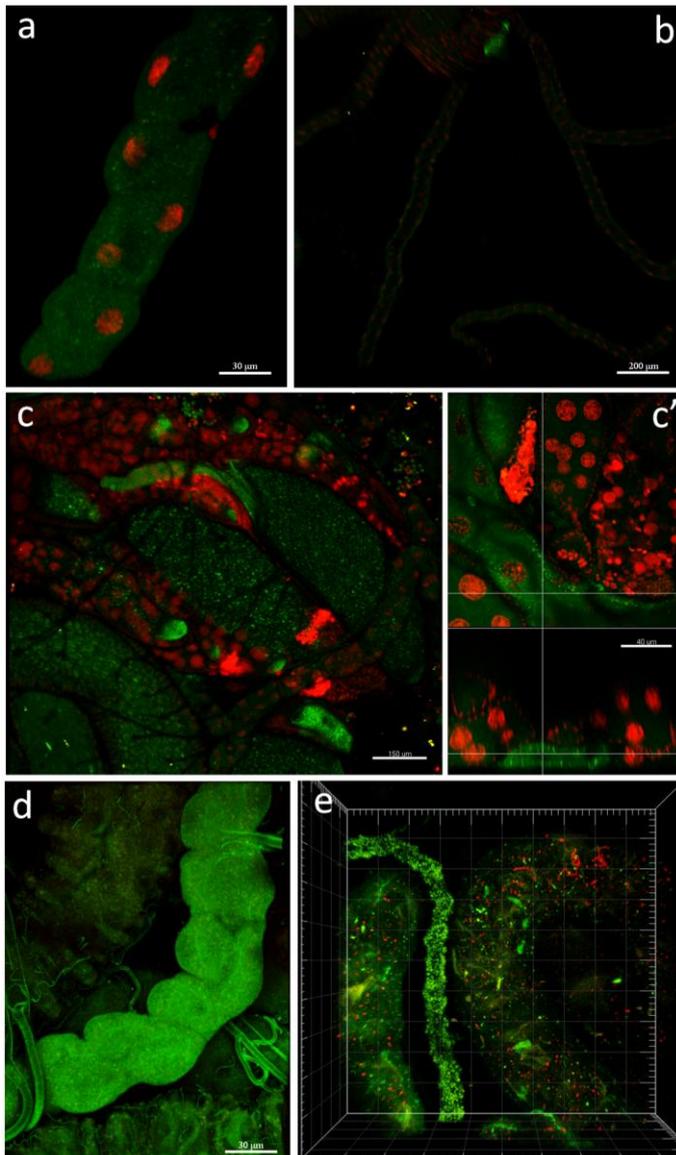
O túbulo de Malpighi dos insectos é estrutura simples, composta por aproximadamente 150 células epiteliais que se organizam numa estrutura tubular (Figura 1.6a). Cada túbulo apresenta uma extremidade directamente ligada ao sistema digestivo, enquanto a outra extremidade é fechada e está em contacto com a hemolinfa. Cada mosca apresenta dois pares de túbulos (no entanto há uma grande variação do número de túbulos em outros insectos, normalmente em múltiplos de 2, podendo chegar a centenas). Estes dois pares contribuem igualmente para a função deste tecido, sendo um de localização anterior e outro posterior, apesar de estarem ligados a mesma zona do intestino (entre a intercessão do intestino médio com o intestino distal). Os túbulos são formados na embriogénese e permanecem ao longo de todo o ciclo de vida de *Drosophila*, ao contrário da maioria dos tecidos, que é destruída ou substituída ao longo da metamorfose (Figura 1.6b).

Vários estudos têm demonstrado que os túbulos de Malpighi são responsáveis por muitos processos dentro da mosca, incluindo o transporte de fluidos, a osmorregulação, a desintoxicação e também a homeostasia iónica⁴⁸. Estas actividades fisiológicas estão directamente ligadas com a constante actividade de endocitose e exocitose das células do túbulo (Figura 1.6e), que podem também promover, devido as suas características, a internalização e posterior libertação de bactérias. Para cumprir estas funções de manutenção de homeostasia do organismo, os 4 túbulos são projectados ao longo da cavidade celómica, sendo recorrente que partes dos túbulos da região posterior do corpo estejam fisicamente em contacto com os ovários das fêmeas adultas (Figura 1.6c, c'). Ainda outra interessante característica, que é explorada no tópico a seguir, é o facto dos túbulos poderem apresentar uma resposta imunitária autónoma, ou seja, independente da resposta epitelial do sistema digestivo e também do corpo gordo⁴⁹, podendo se tornar, teoricamente, num “santuário imunológico” (Figura 1.6d). Assim, ao olharmos de uma forma integrada para todas estas particularidades dos túbulos de Malpighi, vários factores indiciam este tecido como um bom candidato a uma possível zona de passagem de *Wolbachia* para os ovários após ingestão.

1.4.2. IMUNIDADE AUTÓNOMA

A morfologia dos túbulos de Malpighi aponta para a susceptibilidade deste tecido a colonizações bacteriana, pois não só está ligado ao sistema digestivo mas também devido à sua potencial localização em qualquer zona da cavidade celômica. Por causa do grau de exposição ao meio ambiente, os túbulos podem ser um alvo preferencial de ataque por bactérias que entram no organismo utilizando diversas estratégias (Figura 1.5). Assim, os túbulos se apresentam como um tecido de resposta imune de grande importância. Estudos recentes têm mostrado que os túbulos constituem um sistema de resposta imunitária autónoma, sendo capazes de identificar uma infecção bacteriana e promover uma resposta imune independente do resto do corpo⁴⁹.

Como *Wolbachia* só conseguirá passar horizontalmente caso ultrapasse as defesas imunitárias do hospedeiro, torna-se premente compreender como esta bactéria interage com a



resposta imune de *Drosophila*, não só nos túbulos de Malpighi, mas também no resto do corpo, com especial atenção para o sistema digestivo e hemolinfa.

Figura 1.6. – Características do túbulo de Malpighi.

Várias particularidades fazem deste tecido um bom candidato a zona de passagem de *Wolbachia* entre o sistema digestivo (após ingestão) e a hemolinfa: para além de estarem directamente ligados ao sistema digestivo, são constituídos por apenas uma camada de células organizadas de forma tubular (a), não são destruídos ao longo da metamorfose (b), estão em íntimo contacto com os ovários (c e c'), apresentam uma resposta imunitária autónoma (d) e as endocitoses e exocitoses são fenómenos muito recorrentes (e). | As imagens foram realizadas em *D. melanogaster* utilizando microscopia 2-photon. (a) túbulo extraído de larva tubulinaGFP-histonaRFP - *ex vivo*. (b) túbulo extraído de pupa tubulinaGFP-histonaRFP - *ex vivo*. (c e c') proximidade de túbulo e ovário após cirurgia abdominal de fêmea adulta - *in vivo*. (d) MT e intestino com diferentes níveis de expressão de dipterocina (larva com expressão endógena) - *in vivo*. (e) endocitose activa de corante no túbulo após ingestão do marcador fluorescente BaClight - *in vivo*.

1.5. IMUNIDADE EM *DROSOPHILA* EM RESPOSTA A INFECÇÕES NATURAIS

Para combater as infecções que estão sujeitos na natureza, os insectos desenvolveram múltiplos mecanismos de defesa inata. Estes têm sido estudados e descritos em *D. melanogaster*, que como já referido, é o organismo modelo para estudos de imunidade em invertebrados.

As bactérias que são introduzidas no corpo pelo acto da ingestão serão confrontadas com o sistema imunitário de *Drosophila* (Figura 1.7). Ainda no sistema digestivo, é desencadeada a resposta imune local, com produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de péptidos anti-microbianos (AMPs). Esta produção de AMPs, como por exemplo dipterina e cecropina, é mediada pela via de sinalização Imd (do factor nuclear kB) através da identificação de peptidoglicanos de bactérias Gram⁻ por proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRPs). Assim, estas duas respostas, ROS e AMPs, constituem a linha da frente da defesa de *Drosophila* contra infecções orais após ingestão de bactérias.

As bactérias que conseguem transpor a camada epitelial e migrar para a hemolinfa terão que enfrentar a principal resposta imune de *Drosophila*, a resposta sistémica. Esta consiste na produção de AMPs e outros factores imunes por parte das células do corpo gordo, na activação da resposta celular por parte dos hemócitos e também pela activação da cascata de melanização. As células do corpo gordo podem activar, através do reconhecimento de peptidoglicanos presentes na hemolinfa, não só a via Imd, como também a via Toll⁵⁰. Isto porque *Drosophila* consegue reconhecer formas específicas de peptidoglicanos (pois possui diferentes PGRPs) conseguindo diferenciar assim as bactérias Gram⁻ das Gram⁺. A via Toll é maioritariamente activada pelas Gram⁺ e por fungos, induzindo a síntese de diversos péptidos (como por exemplo a drosomicina). O reconhecimento dos agentes patogénicos leva também, para além da activação dos hemócitos que procederão a fagocitose e a degradação das bactérias detectadas, a activação da cascata de melanização e consecutiva produção de nódulos melânicos (para revisão⁵⁰).

Algumas bactérias patogénicas desenvolveram estratégias para neutralizar a resposta imune e assim se estabelecer no interior dos hospedeiros. As duas principais formas de escapar ao sistema imunitário são, por um lado, a não detecção do invasor por parte das células que desencadearão a resposta (por exemplo *Spiroplasma*⁵¹) ou, por outro lado, a supressão da resposta imune (caso da bactéria *X. hematofila*⁵²). Olhando para o nosso caso de estudo, muito pouco se sabe sobre a relação entre *Wolbachia* e o sistema imunitário de *Drosophila*. Apesar de já ter sido descrito que a presença de *Wolbachia* em linhagem

infectadas não altera a resposta do hospedeiro a novas infecções⁵³, ainda é totalmente desconhecido o mecanismo utilizado pela bactéria para fugir ao sistema imunitário na transmissão horizontal. É certo que ao longo da transmissão vertical, *Wolbachia* se encontra intracelularmente, protegida das defesas do hospedeiro. No entanto, e tendo em mente a experiência de microinjecção de Frydman e colaboradores (Figura 1.4), nada se sabe sobre a estratégia de resistência desenvolvida por *Wolbachia* para ultrapassar a resposta imunitária do novo hospedeiro a partir do momento que se encontra livre na hemolinfa.

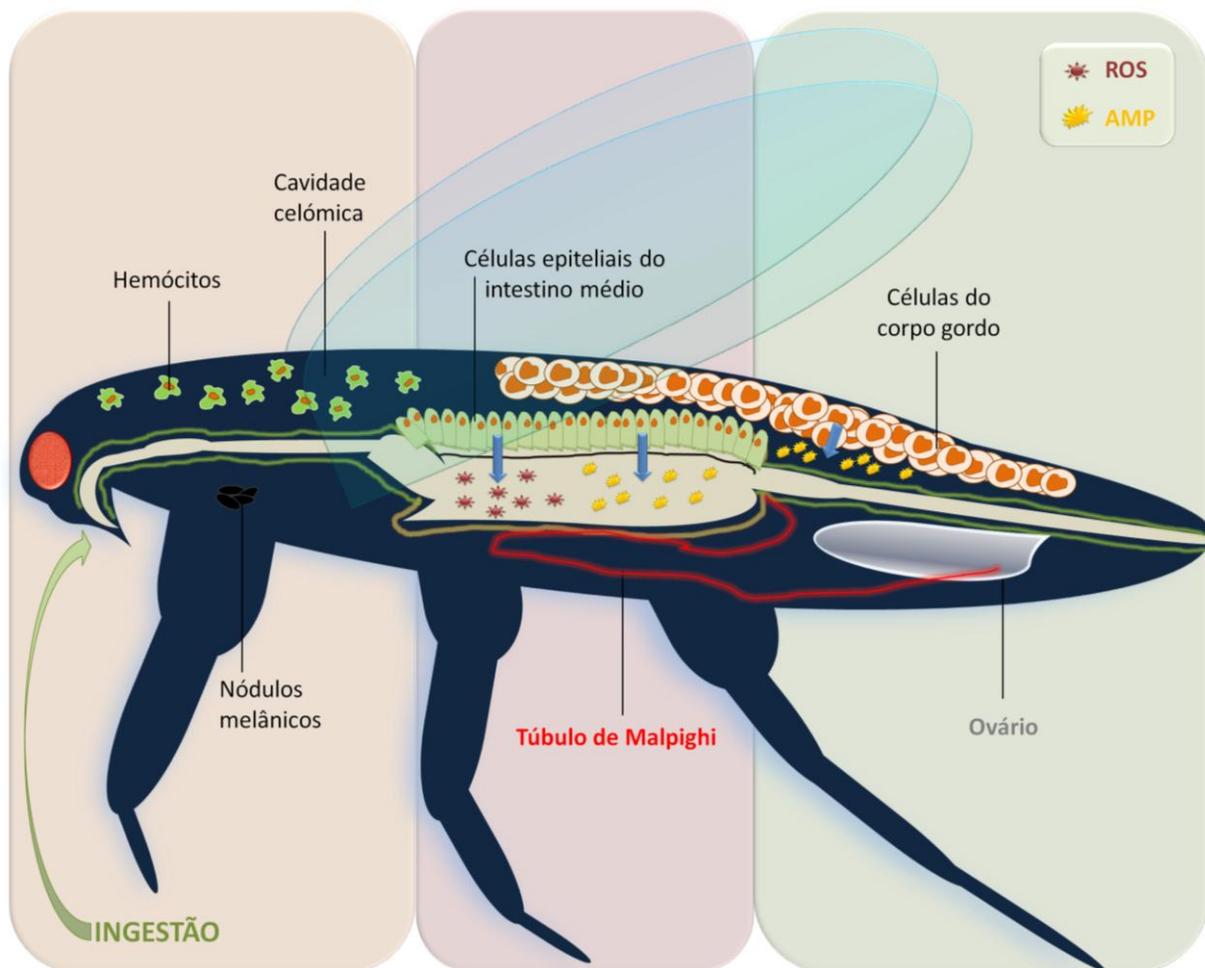


Figura 1.7 – Resposta imune em *Drosophila*. Após a ingestão, as bactérias localizadas no sistema digestivo potenciam uma resposta imune local, com produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de péptidos anti-microbianos (AMP). As bactérias que conseguirem resistir ao stress oxidativo persistirão no intestino e activarão a produção de AMPs pelo tecido epitelial. Caso alguma bactéria consiga transitar do sistema digestivo ou túbulo de Malpighi para a hemolinfa, então provavelmente activará a resposta imune sistémica, que consiste na produção de AMPs por parte do corpo gordo e a activação de hemócitos que procederão a fagocitose das bactérias. Caso a passagem para a hemolinfa ocorra por lesão dos tecidos, haverá melanização da zona afectada por activação de uma castata proteolítica e consecutiva formação de nódulos melânicos. É ainda amplamente desconhecido qual a estratégia utilizada por *Wolbachia* para sobreviver ao sistema imunitário de *Drosophila* no momento da transmissão horizontal. Figura adaptada da ref.50.

2. OBJECTIVOS DO PROJECTO

O principal objectivo deste trabalho foi iniciar a busca pelos mecanismos ecológicos responsáveis pela transferência horizontal do endossimbionte *Wolbachia* em hospedeiros de diferentes espécies do género *Drosophila*. Foi dada especial ênfase a ingestão como possível mecanismo ecológico de transmissão e sua respectiva eficiência de infecção.

Uma vez que estudos de transmissão por análise de progenia apenas nos revelaria o “como” da transmissão, mas não o “quando” nem o “porque”, era fundamental desenvolver paralelamente uma técnica de visualização que acompanhasse passo a passo, em tempo real, a dinâmica de interacção entre *Wolbachia* e o hospedeiro *Drosophila*. Esta permitiria acompanhar a viabilidade bacteriana após ingestão e sua relação com os túbulos de Malpighi, órgão este escolhido como zona candidata para o estabelecimento e posterior passagem para hemolinfa por parte da bactéria. Ao longo do estudo procurou-se encontrar o momento de passagem da bactéria promovida pela endocitose e exocitose no túbulo de Malpighi. Porém, como *Wolbachia* só se estabelece de forma viável num novo hospedeiro ultrapassando suas defesas, tivemos também como objectivo o acompanhamento da integração desta bactéria com a resposta imunitária de *Drosophila*, procurando novos indícios que ajudassem a revelar o mecanismo utilizado pela bactéria para contornar o sistema imunitário do hospedeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Drosophila melanogaster*

3.1.1. Populações

Para a realização deste protocolo experimental, foram utilizadas duas espécies do Género *Drosophila* (*D.melanogaster* e *D.simulans*), ambas pertencentes ao sub-grupo *melanogaster*. Duas populações de cada espécie foram estabelecidas: uma com indivíduos infectados pelo endossimbionte *Wolbachia pipientis* e outra tratada com antibiótico (tetraciclina) para total eliminação das bactérias nos integrantes da população. Para evitar falsos positivos e falsos negativos, foram geradas subpopulações originadas por 20 fêmeas que, após originarem a sua descendência, foram sacrificadas e analisadas para confirmação da presença da bactéria pelo método acima referido. Assim, foi possível confirmar a presença ou ausência da bactéria nas populações utilizadas. As populações foram também controladas para a presença de *Spiroplasma* em particular mas também de procariontes em geral.

3.1.2. Manutenção

As seis populações iniciais (mel^+/mel^- ; sim^+/sim^- ; yak^+/yak^-) foram mantidas em caixas populacionais com um efectivo compreendido entre 2000 e 3000 indivíduos. As subpopulações derivadas destas seis populações foram mantidas em garrafas com um efectivo médio de 500 indivíduos. Todas as populações foram mantidas em ciclos diurnos/nocturnos de 12 horas, à temperatura constante de 25 °C, nível de humidade relativa padrão e gerações populacionais não sobreponíveis.

3.1.3. Dissecção de tecidos

Para a dissecção das amostras de ovários, intestinos e túbulos de Malpighi, larvas do terceiro estágio ou moscas adultas foram anestesiadas em gelo e dissecadas em PBS.

3.2. Preparação de DNA genómico

Para a preparação de DNA genómico as moscas adultas ou as larvas foram anestesiadas e separadas em tubos eppendorf de 1.5mL. De seguida foi utilizado o *kit* de extracção de DNA para tecidos biológicos NucleoSpin (de acordo com as recomendações do fornecedor). As amostras de DNA colectadas foram armazenadas a -20 °C.

3.3. Quantificação de ácidos nucleicos

As concentrações de ácidos nucleicos foram quantificadas usando um NanoDrop (de acordo com as recomendações do produtor) sendo registadas em ng/ μ l.

3.4. Polymerase chain reaction (PCR)

A confirmação dos respectivos estados de infecção das populações ou indivíduos foi realizada por PCR através da amplificação de um gene codificante para uma proteína membrana específica de *Wolbachia* (*wsp*) e para diferentes porções do gene 16S para *Spiroplasma* e para bactérias de uma forma genérica. Para as reacções de PCR foi utilizado o *kit* de amplificação de DNA (Fermentas). Cada reacção continha 1µl da amostra de DNA a ser testada ou 1µl de dH₂O para o controlo negativo da PCR. Cada reacção teve um volume final de 20µl. Os ciclos típicos para a PCR usando *Taq* DNA polimerase consistiram em: 1 ciclo - desnaturação inicial, 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos - desnaturação, 94 °C por 30 segundos, annealing - 50 °C 45 segundos, alongamento - 72 °C por 30 segundos; 1 ciclo de extensão final - 72 °C por 5 minutos.

3.5. Eletroforese em gel de agarose

As amplificações foram posteriormente separadas por electroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE 1X contendo 0.1µg/ml de EtBr. Para a visualização da corrida dos produtos da PCR foi utilizado 6x loading dye. O tamanho das bandas foi comparado com 1kb ladder (Invitrogen).

3.6. Sequenciação de DNA

A sequenciação automática foi realizada através de reacção de cadeia simples com um mix de PCR contendo dideoxinucleótidos fluorescentes, templates (1µg) and primer (3.2pmol). Tanto a corrida das amostras em gel de agarose com detecção dos nucleótidos por sequenciador automático, como a preparação informática para posterior análise, foram realizadas pelo serviço de sequenciação do Instituto Gulbenkian de Ciência.

3.7. Extração de *Wolbachia*

As bactérias *Wolbachia* foram extraídas através de embriões infectados de *Drosophila* por adaptação do protocolo apresentado por Rasgon *et al*¹⁹. Ainda outro método foi desenvolvido para a extração de *Wolbachia* após marcação fluorescente (Material e Métodos - 3.9) Este consiste na extração das bactérias dos túbulos de Malpighi de *Drosophila* (*ex vivo*) após dissecação. Associado a este protocolo é possível proceder a marcação de todo o tecido do hospedeiro e, consecutivamente, as respectivas endobactérias.

3.8. Microinjecção

As populações mel^+ e sim^+ foram capturadas na natureza já infectadas com as respectivas estirpes de *Wolbachia*. Para a de infecção com *Wolbachia* de *Drosophila yakuba* em laboratório foi utilizada a microinjecção na zona abdominal de fêmeas jovens de hemolinfa extraída de fêmeas de *Drosophila melanogaster* (mel^+).

3.9. Ensaio de Ingestão

Para as experiências de ingestão, foram utilizadas larvas dos três estádios de desenvolvimento das subpopulações mel^- . Estas ingeriram exclusivamente, durante um período de 24 horas, uma suspensão em PBS de células infectadas com *Wolbachia* oriundas de adultos das populações mel^+ e sim^+ ou uma extracção de *Wolbachia* a partir de embriões infectados. Este delineamento configura duas experiências intra-específica e duas inter-específicas. Como controlo, o mesmo procedimento foi repetido com extracções de subpopulações não infectadas, ou seja, das subpopulações mel^- e sim^- . Assim, formaram-se quatro experiências e os quatro respectivos controlos onde, em cada um deles, 250 larvas alimentaram-se de células provenientes de 200 moscas (dividida em cinco réplicas). Outra experiência levou a ingestão de extracção *Wolbachia* de embriões infectados (sim^+) por 50 moscas adultas não infectadas (dividida em 3 réplicas). Em todos os procedimentos, as fêmeas F0 deram origem à F1, na qual a procura de infecções estáveis foi analisada em conjuntos de 10 machos. Como as estirpes de *Wolbachia* que infectam *D.melanogaster* e *D.simulans* são diferentes, uma eventual transmissão horizontal entre as espécies testadas pode ser confirmada por sequenciação de regiões génicas específicas do material genético do hospedeiro e das estirpes bacterianas, onde haverá confirmação da espécie hospedeira e da respectiva estirpe bacteriana que esta alberga.

3.10. Marcação fluorescente de *Wolbachia*

Após a tentativa de transformação de *Wolbachia* por eletroporação para expressão de GFP, a marcação fluorescente foi realizada através do *kit* de viabilidade bacteriana BacLight. Este é composto por dois marcadores de DNA, SYTO 9 e Iodeto de propídeo (PI). O primeiro entra em todas as células conferindo ao núcleo uma emissão fluorescente verde. Já PI penetra apenas em células mortas, marcando os seus núcleos a vermelho. Este método foi utilizado tanto para a marcação de *Wolbachia* em suspensão (*in vitro*) como em tecidos infectados do hospedeiro (*in vivo* e *ex vivo*).

3.11. Imagiologia dos túbulos de Malpighi

Para a imagiologia da expressão de fluorescência nos tecidos de *Drosophila*, os tecidos foram dissecados (Material e Métodos – 3.1.3) para a visualização *ex vivo*, ou então anestesiados, para a aquisição de imagens *in vivo*. As amostras foram montadas em lâmina e lamela com quantidades de PBS variáveis de acordo com o volume do tecido em causa.

3.11.1. Microscopia Multifotão

A visualização foi realizada de imediato após montagem em um microscópio Multifotão (Upright Multiphoton Microscope). As imagens obtidas foram tratadas no programa Imaris 6.2.

3.11.1.1. Fluorescência *in vivo*

As larvas, após anestesiadas, foram e montadas inteiras em lâmina e lamela separadas por plataformas laterais para evitar o esmagamento do material biológico. Para a manutenção da larva em posição estática para a aquisição de imagem, foi utilizada refrigeração constante das laterais da lâmina por peças de gelo seco. A visualização dos órgão em causa foi realizada através da cutícula das larvas.

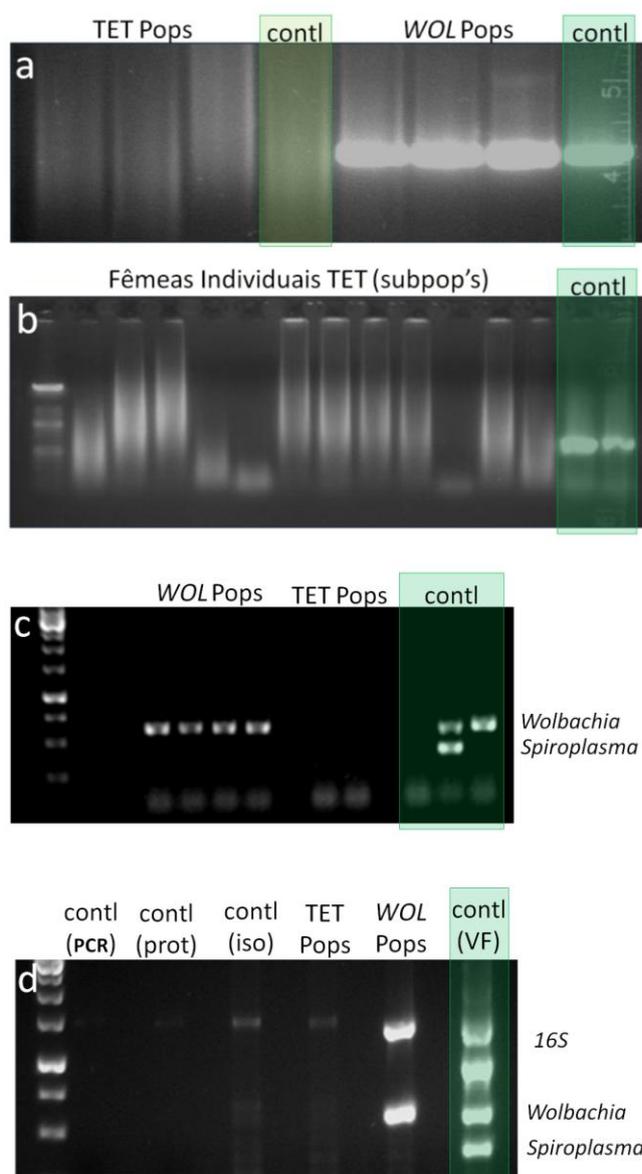
3.11.1.2. Fluorescência *ex vivo*

Após a dissecação dos tecidos biológicos, estes são marcados ainda vivos e visualizados de imediato. Esta abordagem facilita a marcação do tecido e reduz o tempo perdido na procura do tecido alvo dentro do organismo.

4. RESULTADOS

4.1. PRESENÇA OU AUSÊNCIA BACTERIANA NAS POPULAÇÕES E SUBPOPULAÇÕES

Para a fundação das populações com e sem *Wolbachia*, foram feitas 2 caixas populacionais de cada espécie (com a mesma representação parental). Em uma das caixas as moscas estavam infectadas com *Wolbachia* (WOL Pops), na outra, foi realizado um tratamento com o antibiótico tetraciclina ao longo de várias gerações com o objectivo de livrar a população da infecção com *Wolbachia* (TET Pops). Para confirmar a presença ou ausência da bactéria nas caixas populacionais, uma amostra significativa de moscas foi amplificada para a presença do gene codificante para uma proteína da membrana de *Wolbachia* (*wsp*) (Figura 4.1a). Para evitar falsos positivos nas experiências de ingestão (uma vez que a amplificação das caixas populacionais era referente a uma amostra da população)



foram fundadas sub-populações de cada espécie (com e sem *Wolbachia*). Estas foram originadas com moscas das populações WOL e TET, onde todas as fêmeas, após deixarem progenia, foram analisadas por amplificação do gene *wsp* (Figura 4.1b).

Figura 4.1 – Análise bacteriana para a fundação das populações de *Drosophila*

(a) Fundação das populações com *Wolbachia* e sem *Wolbachia* (mel, sim e yak). (b) Gel representativo da fundação das subpopulações sem *Wolbachia* através de análises individuais de cada fêmea fundadora. (c) Confirmação da ausência de *Spiroplasma* (para além da *Wolbachia*, *Spiroplasma* é a única espécie de bactéria intracelular herdável descrita em *Drosophila*). (d) Confirmação da ausência de outras bactérias nas populações testadas. A extracção de DNA foi realizada a partir de embriões estéreis. Para comparação foi realizado um duplo controlo positivo (VF) e 3 controlos negativos, para a PCR (PCR), para o protocolo de extracção de DNA (prot) e com uma linhagem de *Drosophila* mantida em esterilidade, tanto para bactérias como para vírus (iso).

De seguida confirmou-se a ausência de outras bactérias nas subpopulações fundadas. Primeiramente foi verificada a ausência de *Spiroplasma* em todas as sub-populações, bactéria esta que, para além de *Wolbachia*, é a única bactéria descrita com transmissão vertical em *Drosophila* (Figura 4.1c). Para uma confirmação da ausência de outras bactérias para além de *Wolbachia* e *Spiroplasma*, embriões estéreis das subpopulações foram controlados por amplificação genérica do gene 16S bacteriano, sendo a intensidade da banda da amplificação das populações TET inferior a intensidade da banda da população controlo, controlada para a presença de bactérias e vírus (iso) (Figura 4.1d).

4.2. NÃO ENCONTRADA PASSAGEM POR INGESTÃO, EM LABORATÓRIO, EM PROGENIA DE INDIVÍDUOS DE *DROSOPHILA* QUE INGERIRAM *WOLBACHIA*

Para testar a ingestão como mecanismo de transmissão horizontal de *Wolbachia* foram realizadas diversas experiências, onde larvas de diferentes estádios de *D. melanogaster* da subpopulação mel^- (F0) ingeriram *Wolbachia* proveniente de dois tipos de extracções e de duas subpopulações diferentes, mel^+ e sim^+ (Figura 4.2). Em todas as experiências, tanto a F1 precoce como a F1 tardia foi analisada para a presença de *Wolbachia*. Primeiramente, larvas de diferentes estádios de *D. melanogaster* ingeriram por 24 horas uma suspensão de *Wolbachia* extraída a partir de embriões sim^+ (Figura 4.2a). Outro método de obtenção de *Wolbachia* foi também utilizado. Neste, larvas mel^- ingeriram por 24 horas a suspensão de células com *Wolbachia* resultante do esmagamento de moscas adultas infectadas de sim^+ (figura 4.2b). O mesmo procedimento foi também realizado com ingestão da suspensão por esmagamento proveniente de moscas mel^+ (como referido na legenda da figura 4.2b). Em um outro set de experiências, este mesmo procedimento foi repetido, com a diferença que a ingestão foi realizada por moscas adultas (ao invés de larvas). Assim, moscas adultas mel^- ingeriram durante 24 horas *Wolbachia* resultante do esmagamento de moscas adultas infectadas de sim^+ (figura 4.2c) e também proveniente de moscas mel^+ (como referido na legenda da figura 4.2c). Em nenhuma das experiências foi encontrada *Wolbachia* na progenia das moscas ou larvas que realizaram a ingestão. Os resultados dos gráficos da Figura 4.2 são representativos de experiências independentes (três em **a** e **b** e duas em **c**) realizadas para cada tratamento. Cada experiência mostra os valores acumulados das réplicas realizadas (cinco em **a** e **b** e três em **c**).

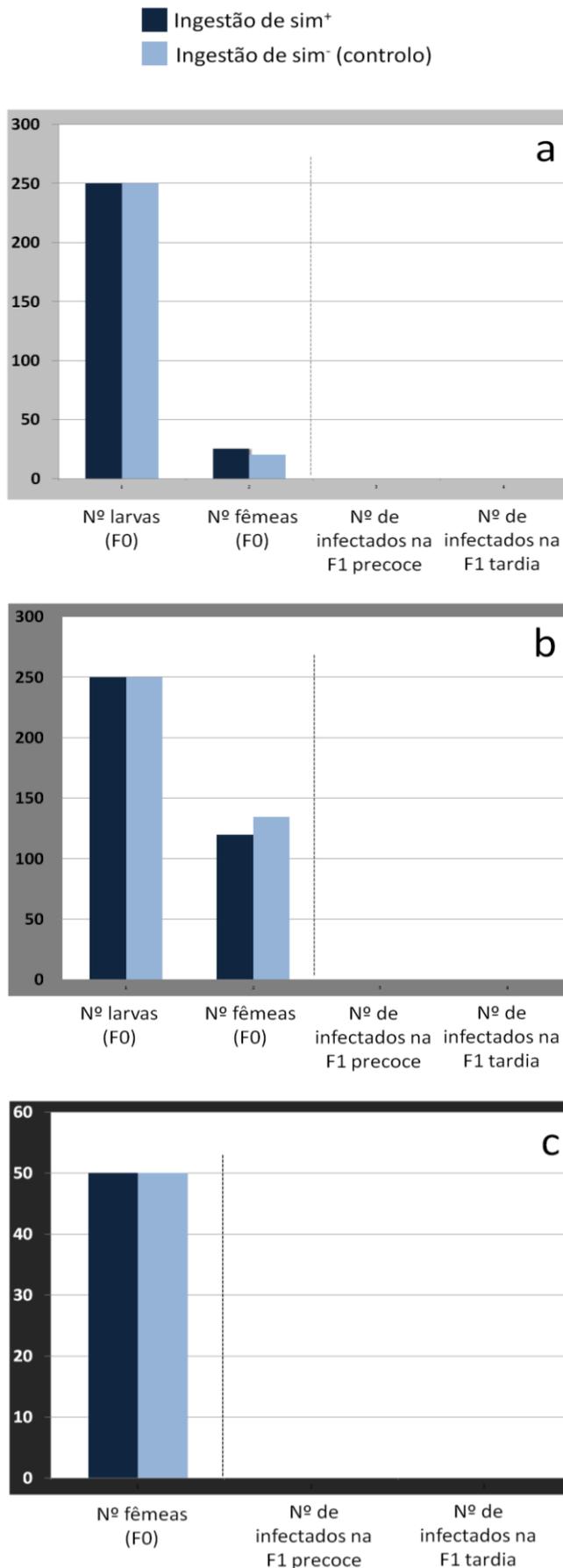


Figura 4.2 – Ausência de progenia infectada após ingestão de *Wolbachia*. (a) Ingestão de extracção *Wolbachia* de embriões infectados (sim⁺) por 250 larvas não infectadas (mel⁻) de diferentes estadios (F0). Das larvas que sobreviveram ao protocolo, resultaram aproximadamente 30 fêmeas após metamorfose. Não foi encontrada presença de *Wolbachia* nos indivíduos da progenia, tanto da F1 precoce (até 15 dias) como da F1 tardia (mais de 15 dias). Estes resultados são referentes a adição de 5 réplicas e representativos de três experiências independentes. (b) Ingestão de extracção *Wolbachia* por esmagamento de moscas adultas infectadas (sim⁺) por 250 larvas não infectadas (mel⁻) de diferentes estadios (F0). Das larvas que sobreviveram ao protocolo, resultaram aproximadamente 120 fêmeas após metamorfose. Não foi encontrada presença de *Wolbachia* nos indivíduos da progenia, tanto da F1 precoce (até 15 dias) como da F1 tardia (mais de 15 dias). Estes resultados são referentes a adição de cinco réplicas e representativos de três experiências independentes. [Os mesmos resultados foram obtidos para a ingestão de mel⁺]. (c) Ingestão de extracção *Wolbachia* de embriões infectados (sim⁺) por 50 moscas adultas não infectadas (mel⁻) (F0). Não foi encontrada presença de *Wolbachia* nos indivíduos da progenia, tanto da F1 precoce (até 15 dias) como da F1 tardia (mais de 15 dias). Estes resultados são referentes a adição de três réplicas e representativos de duas experiências independentes [Os mesmos resultados foram obtidos para a ingestão de mel⁺].

4.3. EFICÁCIA DO MÉTODO DE IMAGIOLOGIA PARA VISUALIZAÇÃO DE *WOLBACHIA*

Apesar de ser uma das endotoxinas mais estudadas pela comunidade científica, nunca se conseguiu transformar *Wolbachia* para a expressão de uma proteína fluorescente. Esta limitação cria grandes entraves nos estudos de relações ecológicas, onde a relação em tempo real é uma enorme mais-valia para alcançar as respostas pretendidas. Assim, como alternativa a transformação de *Wolbachia*, foi desenvolvida uma nova técnica de imagiologia com recurso a corantes genéricos de viabilidade associado a aquisição de imagem em tecidos vivos por microscopia multi-fotão. Como consequência, tornou-se possível a visualização da dinâmica de interação entre *Wolbachia* e *Drosophila*, tanto *in vivo* como *ex vivo*. Esta técnica permite acompanhar a localização de bactérias, dentro ou fora das células, assim como a sua viabilidade de acordo com os corantes incorporados. Na Figura 4.3 é possível ver a presença de *Wolbachia* viva (pequenos pontos verde intenso) em diversos tecidos (também vivos) como o túbulo de Malpighi, o intestino e o ovário de *Drosophila* (moscas das população infectadas – WOL Pops).

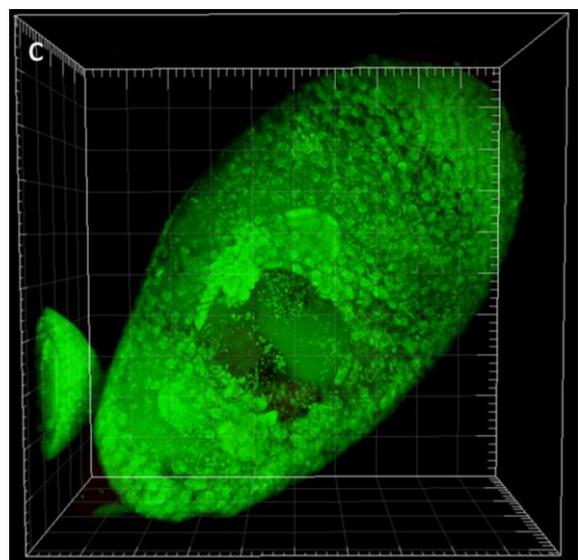
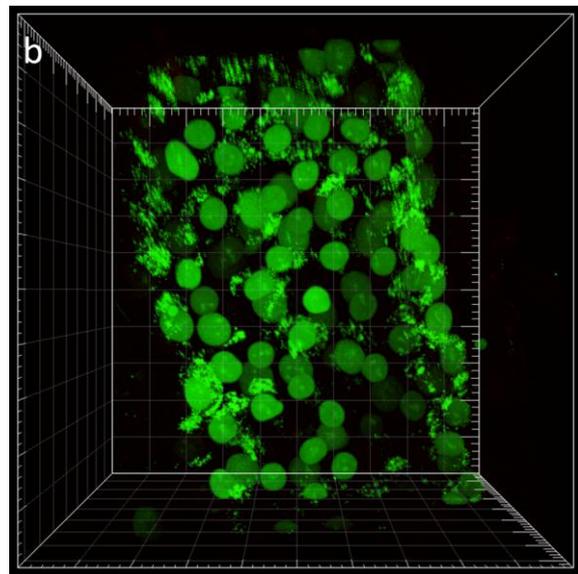
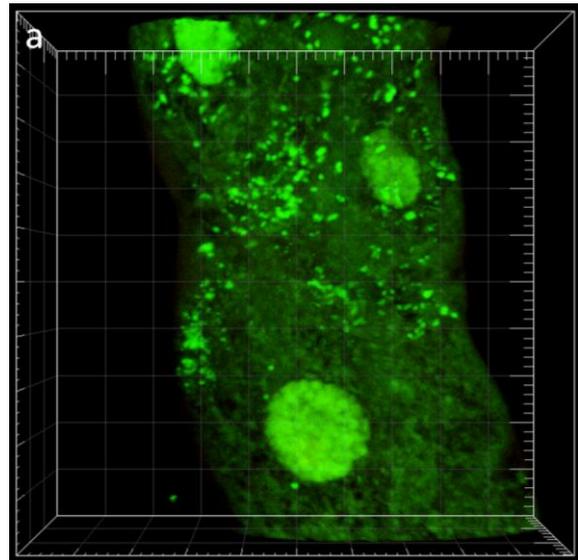


Figura 4.3 – Desenvolvimento de técnica de imagiologia *in vivo* e *ex vivo* para visualizar *Wolbachia* viva (ou morta) em *Drosophila*. Marcação *ex-vivo* com o kit de viabilidade bacteriana BacLight. Combinando um marcador de viabilidade bacteriana com microscopia multi-fotões foi possível acompanhar a dinâmica de interação entre *Wolbachia* e seu hospedeiro. Nas imagem os círculos verdes de grandes dimensões correspondem aos núcleos das células hospedeiras. Os pequenos pontos verdes (intensos) correspondem a *Wolbachia* viva (a) nos túbulos de Malpighi (b) no intestino (c) e no ovário.

4.4. TÚBULO DE MALPIGHI PODE SER UMA ZONA DE PASSAGEM PARA *WOLBACHIA* APÓS INGESTÃO

4.4.1. CONFIRMAÇÃO DE *WOLBACHIA* NOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE MOSCAS INFECTADAS

Para a confirmação da viabilidade e abundância de *Wolbachia* nos túbulos de Malpighi das populações infectadas (*mel*⁺), foram realizadas marcações *ex vivo* em túbulos de larvas, pupas e adultos (Figura 4.4). Nas imagens é possível ver, que apesar de algumas células do tecido hospedeiro já estarem a morrer devido à dissecação (núcleos vermelhos por incorporação de Iodeto de Propídeo), *Wolbachia* permanece viva e em grandes quantidades (pequenos pontos verde intenso). Isto confirma os túbulos de Malpighi como um tecido de preferencial colonização por parte de *Wolbachia*, sendo o tecido somático de *Drosophila* com maior quantidade da bactéria em estudo.

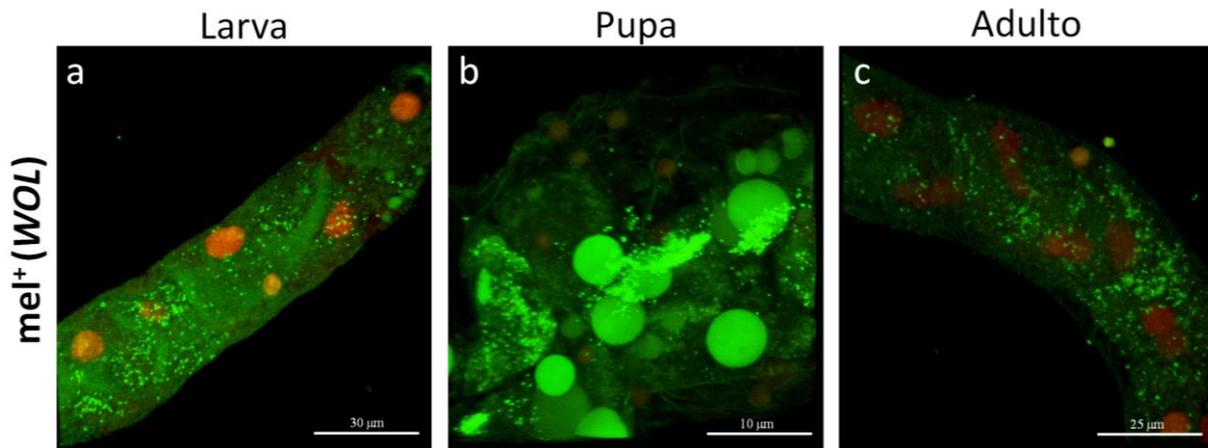


Figura 4.4 – Presença de *Wolbachia* nos túbulo de Malpighi das populações infectadas. (a) em larva (b) em pupa (c) em adulto. *Wolbachia* apresenta-se viva (pequenos pontos verdes por incorporação de SYTO 9). Os círculos vermelhos são núcleos de células do tecido hospedeiro que já entraram em apoptose (devido à dissecação) incorporando assim Iodeto de Propídeo. Os círculos verdes são núcleos das células ainda vivas do túbulo. Marcação *ex vivo* com o *kit* de viabilidade bacteriana BacLight.

4.4.2. *WOLBACHIA* É ENCONTRADA VIVA NOS TÚBULOS DE MALPIGHI

Para verificar se *Wolbachia* consegue sobreviver a ingestão e chegar ao túbulo de Malpighi, foram realizadas experiências onde larvas de *D. melanogaster* não infectadas ingeriram extracções de *Wolbachia*. Após 24 horas, as larvas foram dissecadas para a extracção dos túbulos de Malpighi. Após marcação fluorescente com o *kit* de viabilidade BacLight foi possível a visualização de algumas bactérias no interior de vesículas das células do túbulo (Figura 4.5).

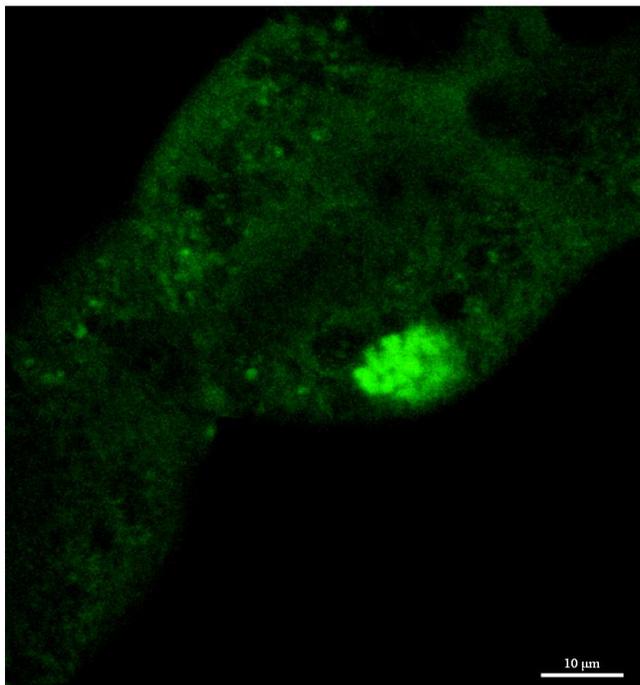


Figura 4.5 – Presença de *Wolbachia* dentro das células do túbulo de Malpighi após ingestão. Após ingestão de extracção de *Wolbachia* por larvas das populações não infectadas, a bactéria aparece viva em vesículas no interior das células do túbulo de Malpighi. Marcação com o *kit* de viabilidade bacteriana BacLight. Marcação e visualização *ex vivo*.

4.5. ACTIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNITÁRIO POR *WOLBACHIA*

Para *Wolbachia* chegar viva aos túbulos de Malpighi após ingestão, esta bactéria teria que ter bloqueado ou sobrevivido a produção local de AMPs (péptidos anti-microbianos), tanto no intestino como nos túbulos. A Figura 4.5 mostra que *Wolbachia* foi endocitada ainda viva para o interior das células dos túbulos, porém, mesmo que consiga posteriormente ser exocitada para a hemolinfa, terá que sobreviver a resposta celular, ou seja, a fagocitose dos hemócitos. Para começar a responder estas questões, foram realizadas experiências *in vitro* onde hemócitos extraídos de populações sem *Wolbachia* (mel^-) foram incubados com uma suspensão de *Wolbachia*. Posteriormente, estes hemócitos foram marcados com o *kit* de viabilidade BacLight. Na Figura 4.5 é possível ver que os hemócitos não só fagocitam *Wolbachia* como também matam as bactérias, como indica a incorporação de Iodeto de Propídeo. Adicionalmente, e também *in vitro*, foi realizada uma experiência onde hemócitos com expressão endógena de GFP, provenientes de uma população infectada com *Wolbachia*, foram encubados com uma suspensão de *Wolbachia*. São visíveis os prolongamentos de citoplasma dos hemócitos para captura da bactéria, assim como os inúmeros vacúolos de internalização. Esta experiência vem mostrar que a presença de *Wolbachia* em populações infectadas não bloqueia a fagocitose destas bactérias.

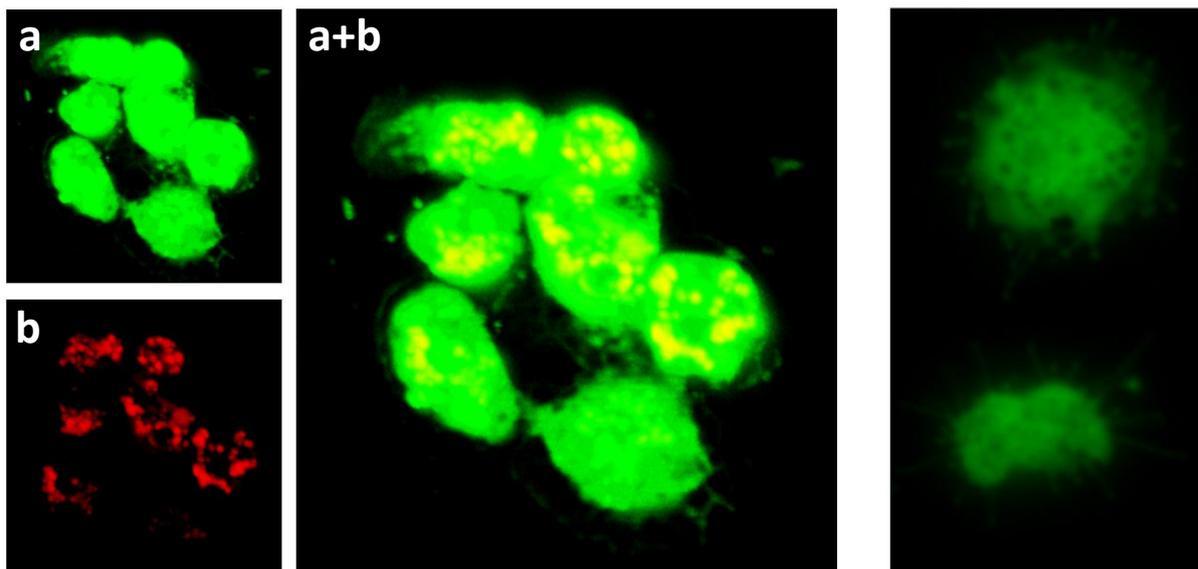


Figura 4.6 – *Wolbachia* é fagocitada e morta pelos hemócitos. (a) Hemócitos extraídos de população TET em meio com *Wolbachia* (b) Bactérias *Wolbachia* mortas a vermelho por incorporação de PI (a+b) sobreposição das imagens a e b onde é possível ver a localização das bactérias dentro dos hemócitos (c) Hemócitos-GFP extraídos de população com *Wolbachia*, em meio com *Wolbachia*. É visível a captura das bactérias e também os vacúolos de internalização.

4.6. SUMÁRIO

Após a análise detalhada da presença ou ausência de *Wolbachia* (e também de outras bactérias) nas populações e subpopulações das espécies que iriam ser testadas, foram realizadas várias experiências de ingestão de *Wolbachia* por parte de larvas e adultos não infectados. Não foi encontrada a presença de *Wolbachia* na progenia de nenhum indivíduo testado, tanto na F1 precoce como na F1 tardia. Porém, para acompanhar com detalhe o percurso de *Wolbachia* após ingestão, foi desenvolvida uma técnica para visualizar a dinâmica de interação da bactéria com o seu novo indivíduo hospedeiro. Devido às suas características, os túbulos de Malpighi foram escolhidos como tecido hospedeiro candidato a passagem de *Wolbachia* para a hemolinfa após a ingestão. Ao acompanhar o túbulo após experiências de ingestão, foram encontradas bactérias vivas no interior das células deste tecido. Como a endocitose e exocitose são uma constante nos túbulos de Malpighi, é provável que as bactérias tenham acesso a cavidade celômica. Uma vez na hemolinfa, é sabido que *Wolbachia* consegue estabelecer uma infecção viável nos ovários e ser transmitida para a próxima geração. No entanto, para permanecer na hemolinfa, a bactéria tem que sobreviver ao sistema imunitário de *Drosophila*. Aqui verificámos que em ensaios *in vitro* *Wolbachia* é fagocitada e morta pelos hemócitos, resultado que levanta muitas e importantes questões.

5. DISCUSSÃO

Para a fundação das populações que foram utilizadas nas experiências, foi necessário uma triagem detalhada para evitar resultados equivocados. Apesar das populações TET terem sido tratadas com o antibiótico tetraciclina durante várias gerações, a amplificação para controlo de infecção só foi realizada numa parte da população (Figura 4.1a). Como o delineamento experimental aqui utilizado foi baseado na procura de acontecimentos raros (transmissão horizontal) tornou-se fulcral não obter falsos positivos como resultado. As caixas populacionais têm uma variabilidade genética muito elevada e é sempre possível que alguma colónia de bactérias, em algum hospedeiro, se torne resistente. Para eliminar este factor de incerteza dos futuros resultados, foram fundadas as sub-populações sem *Wolbachia*. Aqui, todas as fêmeas progenitoras que contribuíram para a fundação foram amplificadas individualmente, confirmando de forma segura a ausência da bactéria nas populações testadas (Figura 4.1b).

Era também fundamental ter a certeza que *Wolbachia* era a única bactéria presente nas populações com perpetuação por transmissão vertical. Isso porque qualquer outro factor que alterasse a fisiologia ou resposta das moscas hospedeiras invalidaria, automaticamente, os controlos realizados para as respectivas experiências. Para isso as populações foram primeiramente controladas para a bactéria *Spiroplasma* por amplificação de uma porção específica do gene 16S. Esta, para além de *Wolbachia*, é a única bactéria de transmissão materna descrita em *Drosophila*, embora utilizem estratégias diferentes para permanecer neste hospedeiro⁵⁴. Todas as populações testadas confirmaram a ausência de *Spiroplasma*, estando assim eliminada a hipótese da presença de um segundo endossimbionte facultativo (Figura 4.1c). Adicionalmente, e como teste final a exclusividade de *Wolbachia* como factor de variação entre as populações testadas, os elementos das populações foram examinados para a presença de qualquer tipo de bactéria em embriões esterilizados, através da amplificação generica do gene 16S bacteriano (Figura 4.1d). O resultado negativo desta amplificação veio certificar que as diferenças entre as experiências e os seus respectivos controlos não poderiam variar pela presença de outras bactérias.

Com as populações controladas para as bactérias e a confirmação da presença ou ausência de *Wolbachia*, foi possível iniciar os *sets* de experiências com a certeza que qualquer resultado positivo seria um verdadeiro positivo. Apesar das populações de *D. yakuba* terem

sido fundadas e analisadas, os indivíduos desta espécie não aguentaram os protocolos de teste de ingestão. Como a mortalidade era muito elevada, os testes com *D.yakuba* foram suspensos. Por outro lado, foi definido *a priori* a não utilização de *D.simulans* para as experiências de ingestão (mas apenas como indivíduos que procederiam a ingestão). Isto porque foi descrito que *D.simulans* tem fragmentos do genoma de *Wolbachia* inseridos no seu genoma²⁷, o que poderia levar, embora seja este acontecimento muito pouco provável, a amplificação de um segmento presente no genoma da mosca e não referente a presença da bactéria. Assim, apesar das subpopulações de *D.simulans* terem tido o mesmo controlo individual para as fêmeas progenitoras, foi optado não utilizar os indivíduos desta espécie como novos hospedeiros por ingestão, sendo apenas utilizados como fonte de extracção de *Wolbachia*.

Com a primeira abordagem experimental, por análise da progenia após ingestão de *Wolbachia*, foi possível testar um mecanismo extremamente recorrente na natureza, principalmente em fase larvar. Todas as experiências realizadas neste trabalho não apresentaram qualquer descendência infectada. Tanto a F1 precoce com a F1 tardia não acusaram a presença de *Wolbachia*, independentemente da sua proveniência de extracção (embriões ou adultos; *D. melanogaster* ou *D. simulans*) (Figura 4.2). Este delineamento por análise da descendência das moscas testadas, pode ser classificado como uma perspectiva de *Big Picture*, uma vez que em caso de resultado positivo passaríamos a conhecer um mecanismo de transmissão horizontal mas não saberíamos os detalhes do processo de estabelecimento desta infecção. Este delineamento dificulta, por outro lado, a percepção dos motivos dos resultados negativos obtidos, pois não sabemos qual é o momento crítico da infecção, ou seja, até onde vai a bactéria de forma viável. Assim, é impossível perceber se a ausência de *Wolbachia* na F1 das moscas é um fenómeno taxativo ou a consequência da multiplicação das baixas probabilidades de cada passo necessário para a ocorrência de transmissão horizontal por ingestão. Esta segunda hipótese nos remete para a dificuldade de estabelecer o número de experiências para tentar simular estes acontecimentos nas populações naturais, uma vez que estas transmissões são fenómenos descritos como esporádicos ao longo da evolução. Mesmo aumentando de forma drástica, em laboratório, a probabilidade de alguns passos necessários para a transmissão horizontal por ingestão (como por exemplo a probabilidade de um hospedeiro não infectado ingerir *Wolbachia* na natureza), as outras parcelas da equação que não foram alteradas (a sobrevivência de *Wolbachia* no interior do organismo ou o acesso a hemolinfa ou ainda a colonização dos ovários) indicam-nos que o número de experiências realizadas não supera a probabilidade de ocorrência do fenómeno.

Foi então fundamental seguir a ingestão passo-a-passo para poder visualizar cada momento da interação entre a bactéria e o seu hospedeiro. Esta abordagem, para além de permitir separar individualmente as parcelas de probabilidades que resultariam na transmissão horizontal, dissecaria também o real mecanismo por detrás deste fenómeno. Numa primeira tentativa de alcançar este objectivo, tentou-se transformar a bactéria com um plasmídeo para expressão de GFP, utilizando para isso a técnica de electroporação. Infelizmente este propósito não foi conseguido, dificuldade protocolar partilhada com outros grupos que trabalham com esta bactéria. Como alternativa, foi desenvolvida uma técnica de imagiologia, combinando marcações fluorescentes genéricas e a possibilidade de visualização dos tecidos em profundidade por utilização da microscopia multi-fotão (Figura 4.3). A importância do desenvolvimento da técnica é a sua não restrição ao nosso caso de estudo, podendo ser também utilizada em qualquer relação de endossimbiose bacteriana. Cada vez mais é fundamental acompanhar a dinâmica de interação em estudos de simbiose, pois podem produzir resultados que normalmente não são obtidos com técnicas baseadas em materiais biológicos fixados, como por exemplo a imunohistoquímica ou a hidratação *in situ*.

Por um lado a transformação de *Wolbachia* retiraria qualquer dúvidas sobre a interpretação dos resultados de localização. Porém, esta limitação pode ser facilmente ultrapassada com as marcações fluorescentes genéricas através de controlos negativos bem realizados. Assim este método de imagiologia apresenta-se muito eficaz, pois é capaz de seguir a dinâmica de interação e acompanhar simultaneamente a viabilidade das bactérias e dos tecidos hospedeiros. Mesmo quando a densidade do tecido impossibilite a aquisição de imagens *in vivo*, será sempre viável realizar as imagens *ex vivo*, também com uma grande qualidade de informação. Quando a realização de imagens for *in vitro* ou o tecido apresentar uma pequena espessura, o melhor é trocar a capacidade de penetração luminosa em tecidos da microscopia multi-fotão pela maior resolução da microscopia confocal.

Criada a possibilidade de acompanhar a internalização de *Wolbachia* após ingestão, era preciso focar a nossa procura numa hipótese viável de caminho de transmissão. Devido às variadas características particulares dos túbulos de Malpighi, este tecido foi escolhido como candidato a zona de colonização de *Wolbachia* e posterior passagem para a hemolinfa após ingestão (Figura 1.6). O facto de estarem directamente ligados ao sistema digestivo, permite a passagem passiva das bactérias para o lúmen do túbulo e, como é um epitélio simples, as bactérias estão separadas da hemolinfa por apenas uma camada de células. Os túbulos não são

destruídos ao longo da metamorfose, o que poderia potenciar o estabelecimento da infecção por ingestão larvar e a passagem da bactéria para os ovários na idade adulta, servindo assim de refúgio a forte actividade imunitária característica da metamorfose. Este dado ganha força quando verificamos a quantidade e viabilidade de *Wolbachia* nos túbulos das moscas infectadas ao longo da metamorfose (Figura 4.4b). Por poder apresentar uma resposta imunitária autónoma, ou seja, independente do resto do corpo, caso eventualmente a co-evolução tenha tornado esta resposta ineficaz para *Wolbachia* então seria um local preferencial de colonização. Principalmente porque a endocitose intensa pode promover a internalização da bactéria antes da sua morte pelo sistema imunitário. Como estão em íntimo contacto com os ovários, talvez a exocitose se dê perto o suficiente para não activar a resposta imune ou essa não ser eficaz.

Um grande apoio aos túbulos de Malpighi como hipótese é a grande recorrência de *Wolbachia* neste tecido das moscas que transmitem verticalmente a bactéria. Como visto nas imagens dos túbulos de Malpighi das populações infectadas, *Wolbachia* sobrevive em grandes quantidades dentro das células deste tecido (Figura 4.4). Por isso, uma vez que *Wolbachia* chegasse viva ao túbulos após ingestão e fosse internalizada por endocitose, provavelmente iria se estabelecer e colonizar o tecido como acontece com as bactérias de transmissão vertical. Porém esta realidade levanta uma importante questão relacionada com a selecção bacteriana ao longo das gerações. Como só são transmitidas verticalmente as bactérias presentes no tecido germinal, era de se prever que ao longo das gerações as bactérias com uma localização preferencial em zonas da linha germinal prevalecessem na população devido à esta forte selecção. Aliás, tal acontece com *Wolbachia*, como podemos ver na sua localização diferencial na oogénese²⁶ (Figura 1.3) e embriogénese³⁹, e confirmada pela sua baixa frequência em diversos tecidos somáticos. No entanto os túbulos de Malpighi apresentam uma grande concentração muito grande de *Wolbachia* em *Drosophila*⁵⁴. O que nos remete para duas fortes possibilidades: A primeira é que os túbulos de Malpighi são um beco sem saída para as bactérias que lá se estabelecem. Apesar disso, estas encontram nos túbulos um ambiente muito propício para a sua multiplicação; a segunda hipótese é que os túbulos de Malpighi possam estar de alguma forma conectados ao sistema reprodutor. Isto daria sentido a grande quantidade de *Wolbachia* nos túbulos, pois evolutivamente estas bactérias poderiam estar representadas nas próximas gerações. Esta hipótese é muito semelhante ao que acontece nos hospedeiros de bactérias obrigatórias nos insectos, onde um órgão é privilegiado para o estabelecimento da colonização⁶. Este, por sua vez, apresenta

ligação com o tecido germinal e promove a passagem das bactérias para a próxima geração. Desta forma, um mecanismo de ligação entre os ovários e os túbulos de Malpighi poderia explicar a alta frequência de *Wolbachia* nos túbulos de *Drosophila*. Esta mesma ligação funcionaria esporadicamente aquando da ingestão de *Wolbachia*.

Foi verificado que após a ingestão de *Wolbachia* por larvas não infectadas, é possível encontrar a bactéria dentro das células do túbulo de Malpighi (Figura 4.5). Adicionalmente, *Wolbachia* permanece viva nestas células, como indica a ausência de fluorescência vermelha (não incorporação de PI). Apesar de não ter sido visualizado a exocitose para a hemolinfa, este fenómeno é tão recorrente quanto o de endocitose, fazendo prever que tal aconteça. Mesmo porque, este fenómeno já foi descrito como muito recorrente em bactérias Rickettsia, onde várias bactérias são endocitadas e exocitadas por tecidos epiteliais. Ao associar todas estas características podemos idealizar um modelo hipotético de transmissão horizontal de

Wolbachia, que após ser internalizada por ingestão, se estabelece nas células dos túbulos de Malpighi por endocitose. Posteriormente, teria acesso a hemolinfa por exocitose, e potenciada pela proximidade aos ovários, poderia estabelecer uma infecção estável nos ovaríolos. Por consequência, *Wolbachia* estaria presente na progenia do novo hospedeiro (Figura 5.1).

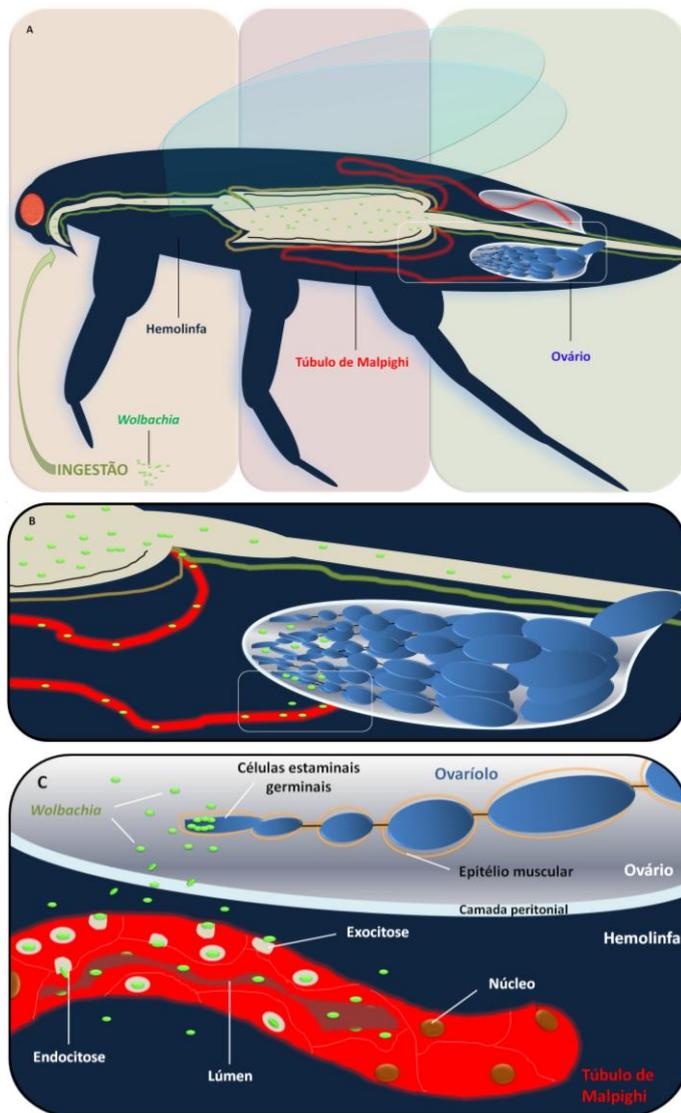


Figura 5.1 – Modelo hipotético de transmissão horizontal de *Wolbachia*, após ingestão, via túbulos de Malpighi.

(A) Após a ingestão de *Wolbachia* por *Drosophila*, a bactéria é encontrada viva dentro das células do túbulo de Malpighi. (B) A proximidade dos túbulos aos ovários promove uma localização favorável para a entrada de *Wolbachia* no tecido reprodutor. (C) Sendo a endocitose e exocitose um fenómeno recorrente nos tecidos epiteliais, e principalmente nos túbulos, é possível que *Wolbachia* seja exocitada para a hemolinfa, aproveitando a localização privilegiada para aceder as células estaminais germinais dos ovaríolos (como demonstrado por Frydman e colaboradores).

Mesmo que *Wolbachia* seja exocitada pelos túbulos para a hemolinfa, é fundamental perceber como consegue esta bactéria sobreviver a resposta do sistema imunitário de *Drosophila*. Os resultados apresentados na Figura 4.6 mostram que *Wolbachia* é fagocitada e morta pelos hemócitos de *Drosophila*. Tendo em mente este resultado da fagocitose de *Wolbachia*, é fundamental revisitar as experiências de Frydman⁴⁵ (Figura 1.4) e pensar como as bactérias introduzidas por microinjecção na hemolinfa de moscas não infectadas não foram fagocitadas pelos hemócitos. Uma possibilidade, embora pouco provável, é que a quantidade de bactérias microinjectadas na hemolinfa tenham causado uma saturação dos hemócitos, sobrando assim bactérias livres para colonizar o ovário. Outra hipótese é que algum factor presente nesta interacção *in vivo* possa alterar a resposta dos hemócitos.

Adicionalmente, a experiência dos hemócitos provenientes de população infectadas com *Wolbachia* vem mostrar que a sua presença nas populações infectadas não bloqueia a fagocitose das bactérias em suspensão. Este resultado é concordante com a experiência que demonstrou que a infecção vertical de *Wolbachia* não altera a produção de AMPs por parte do hospedeiro quando infectado com outras bactérias⁵³. Assim, estes dois resultados indicam que a presença de *Wolbachia* não altera a resposta imunitária de *Drosophila*, nem para bactérias da mesma espécie nem para de outras espécies.

Basicamente, muito pouco é sabido da relação entre *Wolbachia* e o sistema imunitário (Figura 5.2). Por um lado, *Wolbachia* pode não activar a resposta imunitária. Porém, caso active, pode ser resistente ou tolerante as defesas do organismo. Pode ainda ser susceptível, mas com algumas bactérias a sobreviver no organismo por algum tipo de protecção celular (como a que pode acontecer com a endocitose).

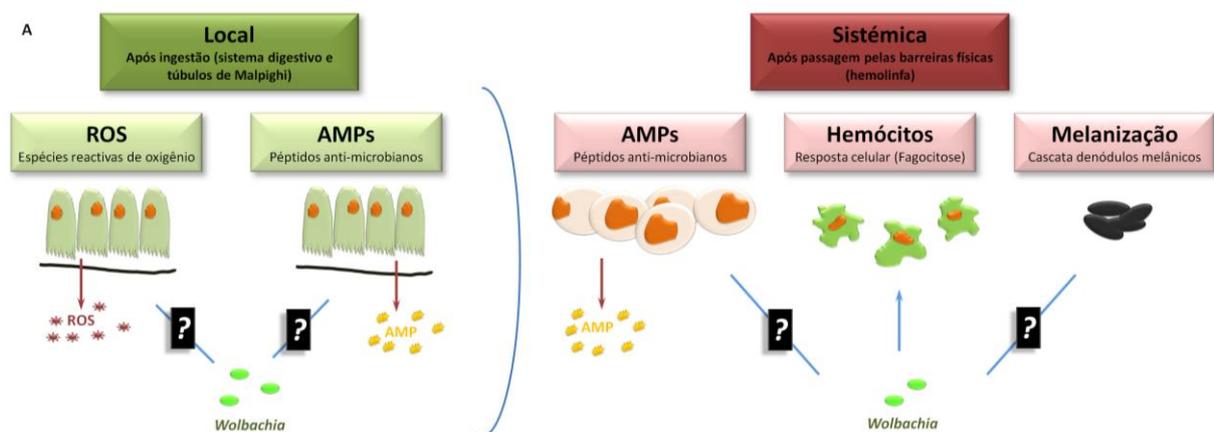


Figura 5.2 – Representação esquemática da interacção de *Wolbachia* com o sistema imunitário em *Drosophila*. Como é visível na imagem, quase tudo está ainda por descrever na interacção da imunidade de *Drosophila* e a presença de *Wolbachia*. Estas futuras respostas terão que ter em conta não só as possíveis variações entre experiências *in vitro* e *in vivo*, como também o estágio do ciclo de vida do hospedeiro e os desafios que este enfrenta no seu meio ambiente.

Para responder a estas perguntas é de grande auxílio utilizar linhagens de *Drosophila* com expressão de AMPs associada a proteínas fluorescentes. Assim será possível ver o nível de produção de AMPs pelo sistema imunitário, tanto local como sistémico, em resposta a entrada de *Wolbachia* em diferentes situações. Por exemplo, esta é uma excelente forma de responder como *Wolbachia* consegue chegar viva nos túbulos de Malpighi após a ingestão. Caso *Wolbachia* active a produção de AMPs, a quantidade de produção destes péptidos será correspondente a fluorescência do tecido em estudo. Por um lado, é de se prever que *Wolbachia* active a produção de AMPs por parte das células epiteliais e do corpo gordo, devido ao facto de activar a fagocitose nos hemócitos. Por outro lado, o facto de *Wolbachia* ter desenvolvido ao longo da evolução uma parede bastante modificada (devido ao seu estilo de vida intracelular, rodeada por membranas do hospedeiro) pode fazer com que os seus peptidoglicanos não sejam reconhecidos pelas PGPRs, não desencadeando uma produção de AMPs.

Outra interessante possibilidade é que *Wolbachia* não active a resposta imunitária de *Drosophila* em situações pontuais, como no caso em que a sua presença da bactéria é benéfica para o organismo. Para testar tal hipótese, seria necessário introduzir *Wolbachia* em *Drosophila* de diferentes formas (ingestão e microinjecção) em diferentes situações de stress (como por exemplo alguns vírus e fungos). Assim, em certas situações, *Wolbachia* poderia ser encarada pelo sistema imunitário do hospedeiro como uma bactéria mutualista. No entanto ainda não é claro como, por exemplo, as bactérias comensais não activam a resposta imune em *Drosophila*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estreita relação simbiótica entre bactérias intracelulares e seus hospedeiros apresenta-se como um importante motor evolutivo, que para além da co-evolução gradual, pode também promover modificações fenotípicas e rápidas especiações. Daí a grande importância do actual estudo destas relações simbióticas com insectos hospedeiros, pois podemos ver, em larga escala, a evolução em acção através deste processo promíscuo de transmissão vertical e transmissão horizontal interespecífica.

Para a continuação destes estudos, esperamos que o método de imagiologia aqui utilizado contribua para futuros trabalhos de interacção ecológica, retirando das informações em tempo real importantes indícios e constatações que não seriam alcançados por outros métodos protocolares.

As hipóteses para tentar responder quais são os mecanismos ecológicos responsáveis pela transmissão horizontal de *Wolbachia* devem ser alargadas, e apesar de aqui nos termos centrado na hipótese da ingestão, outros fenómenos podem desencadear a passagem bacteriana entre espécies. Bons candidatos são os vectores parasitas, como por exemplo os ácaros, que para além de poderem ser promíscuos entre espécies, podem introduzir bactérias directamente na hemolinfa do novo hospedeiro. Outro importante mecanismo que deveria ter o seu estudo intensificado são os vectores parasitóides, que ao depositarem os seus embriões no interior dos ovos de outras espécies podem também promover a transmissão horizontal de bactérias.

Aqui, apesar de não termos confirmado a ingestão como um mecanismo de transmissão, verificámos que este pode ser possível, principalmente associado as características presentes nos túbulos de Malpighi. Na eventualidade da transmissão horizontal por ingestão, é possível prever baseado nos nossos dados (e como era de se esperar) que tal aconteça em baixa frequência em populações naturais. Assim, mesmo que a infecção por transmissão horizontal seja descrita ao longo da evolução pelas análises filogenéticas, é extremamente difícil prever a sua frequência de ocorrência na natureza.

Outra importante questão aqui abordada e amplamente desconhecida é como as bactérias facultativas, ao mudarem de hospedeiro, conseguem sobreviver a resposta imunitária do organismo. Assim, a relação de *Wolbachia* com *Drosophila* se apresenta não apenas como uma excelente endossimbiose-modelo para estudos de interacções fisiológicas, genómicas e evolutivas, mas também para os estudos de infecção e resposta imunitária.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Bary, A. (1879) *The Phenomenon of Symbiosis*.
2. Douglas, A.E. (1994) *Symbiotic Interactions*. Oxford University Press.
3. Tsuchida, T., *et al.* (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* 303, 1989
4. Moran, N.A. (2006) Symbiosis. *Curr Biol* 16, R866-871
5. Bianciotto, V., *et al.* (2004) Vertical transmission of endobacteria in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* through generation of vegetative spores. *Appl Environ Microbiol* 70, 3600-3608
6. Moran, N.A., *et al.* (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet* 42, 165-190
7. Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59, 519-546
8. Lima, P.T., *et al.* (2009) Plant-microbe symbioses: new insights into common roots. *Bioessays* 31, 1233-1244
9. Moran, N.A., and Wernegreen, J.J. (2000) Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends Ecol Evol* 15, 321-326
10. Russell, J.A., *et al.* (2003) Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol Ecol* 12, 1061-1075
11. Thao, M.L., *et al.* (2000) Secondary endosymbionts of psyllids have been acquired multiple times. *Curr Microbiol* 41, 300-304
12. Ewald, P.W. (1994) *Evolution of infectious disease*. Oxford University Press
13. Yamamura, N. (1997) *Diversity and evolution of symbiotic interactions*. Springer
14. Vallet-Gely, I., *et al.* (2008) Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev Microbiol* 6, 302-313
15. Vavre, F., *et al.* (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16, 1711-1723
16. Mira, A., and Moran, N.A. (2002) Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microb Ecol* 44, 137-143
17. Baumann, P. (2005) Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu Rev Microbiol* 59, 155-189
18. Werren, J.H., and O'Neill, S.L. (1997) *The evolution of heritable symbionts*. Oxford University Press
19. Dobson, S.L., *et al.* (2004) Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* 93, 135-142
20. Hedges, S.B. (2002) The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet* 3, 838-849
21. Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415
22. Werren, J.H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol* 42, 587-609
23. Hertig, M. (1936) The rickettsia, *Wolbachia pipiensis* and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*. *Parasitology*, 453-486
24. Lo, N., *et al.* (2002) How many *wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol* 19, 341-346
25. Avakyan, A.A., and Popov, V.L. (1984) Rickettsiaceae and Chlamydiaceae: comparative electron microscopic studies. *Acta Virol* 28, 159-173
26. Ferree, P.M., *et al.* (2005) *Wolbachia* utilizes host microtubules and Dynein for anterior localization in the *Drosophila* oocyte. *PLoS Pathog* 1, e14

27. Hotopp, J.C., *et al.* (2007) Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317, 1753-1756
28. Bandi, C., *et al.* (1999) Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *Int J Parasitol* 29, 357-364
29. Bandi, C., *et al.* (2001) *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Vet Parasitol* 98, 215-238
30. Fenn, K., and Blaxter, M. (2004) Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts? *Trends Ecol Evol* 19, 163-166
31. Brownlie, J.C., and Johnson, K.N. (2009) Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol* 17, 348-354
32. Teixeira, L., *et al.* (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 6, e2
33. Brownlie, J.C., *et al.* (2009) Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog* 5, e1000368
34. Clark, M.E., *et al.* (2002) The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila*. *Mech Dev* 111, 3-15
35. Werren, J.H., *et al.* (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6, 741-751
36. Charlat, S., *et al.* (2003) Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends Genet* 19, 217-223
37. Fenn, K., and Blaxter, M. (2006) *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends Parasitol* 22, 60-65
38. Dobson, S.L., *et al.* (1999) *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem Mol Biol* 29, 153-160
39. Serbus, L.R., and Sullivan, W. (2007) A cellular basis for *Wolbachia* recruitment to the host germline. *PLoS Pathog* 3, e190
40. Bordenstein, S.R., *et al.* (2006) The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. *PLoS Pathog* 2, e43
41. Mouton, L., *et al.* (2003) Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Mol Ecol* 12, 3459-3465
42. Werren J.H., O.n.S.L. (1997) *The evolution of heritable symbionts*. Oxford University Press
43. Grenier, S., *et al.* (1998) Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *P Roy Soc Lond B Bio* 265, 1441-1445
44. Poinot, D., *et al.* (1998) *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* 150, 227-237
45. Frydman, H.M., *et al.* (2006) Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature* 441, 509-512
46. Rasgon, J.L., *et al.* (2006) Survival of *Wolbachia pipientis* in cell-free medium. *Appl Environ Microbiol* 72, 6934-6937
47. Marsollier, L., *et al.* (2007) Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. *PLoS Med* 4, e64
48. Dow, J.A., and Davies, S.A. (2006) The Malpighian tubule: rapid insights from post-genomic biology. *J Insect Physiol* 52, 365-378
49. McGettigan, J., *et al.* (2005) Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 741-754

50. Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25, 697-743
51. Hurst, G.D., *et al.* (2003) Hidden from the host: Spiroplasma bacteria infecting *Drosophila* do not cause an immune response, but are suppressed by ectopic immune activation. *Insect Mol Biol* 12, 93-97
52. Herbert, E.E., and Goodrich-Blair, H. (2007) Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat Rev Microbiol* 5, 634-646
53. Bourtzis, K., *et al.* (2000) Wolbachia neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. *Insect Mol Biol* 9, 635-639
54. Goto, S., *et al.* (2006) Asymmetrical interactions between Wolbachia and Spiroplasma endosymbionts coexisting in the same insect host. *Appl Environ Microbiol* 72, 4805-4810