

Wolbachia, una pandemia con posibilidades

RODRIGUERO, Marcela S.

Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IEGEBA (CONICET-UBA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. rodriguero@ege.fcen.uba.ar

***Wolbachia*, a pandemic with potential**

ABSTRACT. *Wolbachia* infection is the most widespread in animals. Its ability to manipulate insect reproduction places it at the center of organismal biology, affecting such important processes like sex determination, cell cycle, generation and extinction of species and behaviour of arthropods, including several pest and disease vector insects. Attributes like vertical transmission, the speed at which it drives in the population, the ability to block the pathogenic activity of several microorganisms and the ability to shorten the lifespan of its host point to this bacterium as a potential tool to control harmful insects and nematodes. What are the possibilities offered by this pandemic?

In the present work a detailed and updated review of the main aspects of this infection is presented, as well as the practical implications for managing pest and disease vector insects and nematodes. This review is based on the symposium of the same title held in the VIII Argentinean Meeting of Entomology.

KEYWORDS. *Wolbachia*. Pandemic. Horizontal Transfer. Incompatible Insect Technique. Cytoplasmic Incompatibility. Thelytokous Parthenogenesis. Feminization. Male Killing. Reproductive Parasite.

RESUMEN. La infección causada por *Wolbachia* es la más extendida entre los animales. La capacidad de esta bacteria para manipular la reproducción de sus hospedadores la posicionan en el centro de la biología de los organismos, influyendo en procesos tan capitales como la determinación del sexo, el ciclo celular, la formación y extinción de especies y el comportamiento de artrópodos entre los que se cuentan varias plagas y vectores de enfermedades. Cualidades tales como la herencia vertical de *Wolbachia*, la velocidad a la que se propaga en las poblaciones que afecta, la capacidad de bloquear la actividad patogénica de diversos microorganismos o de acortar el ciclo de vida de sus hospedadores la señalan como un potencial instrumento para el control de poblaciones de insectos y nematodos perjudiciales. ¿Cuáles son las posibilidades que nos ofrece esta pandemia?

En la presente contribución se presenta una revisión de los aspectos fundamentales de esta infección y sus implicancias prácticas para el manejo de insectos plaga. Esta revisión está basada en el simposio del mismo nombre acontecido en el VIII Congreso Argentino de Entomología.

PALABRAS CLAVE. *Wolbachia*. Pandemia. Transferencia horizontal. Técnica del insecto incompatible. Incompatibilidad citoplasmática. Partenogénesis telitóquica. Feminización. Androcidio. Parásito reproductivo.

El género *Wolbachia* está integrado por bacterias gram-negativas intracelulares obligadas de transmisión maternal (= vertical) que infectan a artrópodos y nematodos (Werren *et al.*, 1995b). Este género pertenece a la familia *Anaplasmataceae*, orden *Rickettsiales*, subdivisión $\alpha 2$ de la clase *Proteobacteria*.

Como no pueden vivir fuera del ambiente celular, estas bacterias se consideran endosimbiontes. En los artrópodos se localizan principalmente en las gónadas y son capaces de inducir alteraciones en la reproducción de sus hospedadores que producen un incremento de su frecuencia en la población, por lo que se las considera **parásitos reproductivos** (Werren *et al.*, 1995b). Por el contrario, en los nematodos se comportan como **mutualistas**.

Wolbachia (como se la conoce en la literatura especializada y como la llamaremos de aquí en más) constituye la pandemia más grande desde el origen de la vida y es **la bacteria más abundante, más diversa y más versátil de toda la biota** (Werren *et al.*, 2008). Sus sorprendentes características la han colocado en un sitio de honor en la investigación biológica, no solo básica, sino también aplicada, ya que posee varias propiedades que la señalan como una potencial herramienta para el control de poblaciones de insectos plaga y vectores de enfermedades (Brelsfoard & Dobson, 2009). Por eso, *Wolbachia* se presenta como una alternativa novedosa para combinar con otras estrategias ya existentes como el control genético para el manejo integrado de insectos nocivos de una manera amigable con el ambiente.

1.- Breve cronología de los hechos que condujeron al descubrimiento de *Wolbachia*

La especie tipo del género *Wolbachia* fue descrita por Samuel Wolbach y Marshall Hertig en 1924 como una rickettsia que residía en los ovarios del mosquito *Culex pipiens* (Hertig & Wolbach, 1924). Pasaron doce años hasta que Hertig (1936) la bautizó "*Wolbachia pipientis*" en honor a su mentor (nombre genérico) y al hospedador de la bacteria (epíteto específico).

En la década del '50, los investigadores Ghelelovitch (1952) y Laven (1951, 1959) descubrieron que ciertos cruzamientos entre individuos de *C. pipiens* resultaban incompatibles (*i.e.* la progenie era escasa o nula). Laven (1959, 1967) concluyó que el factor causante

de esta incompatibilidad exhibía un patrón de herencia citoplasmática (*i.e.* herencia a través de las hembras). Este tipo de esterilidad se conoce como **incompatibilidad citoplasmática**. En la década del '70 Yen & Barr (1971) lograron una conexión formal entre los descubrimientos de Hertig y Wolbach y los de de Laven y Ghelelovitch, al establecer que *Wolbachia pipientis* era la causa de las incompatibilidades en los cruzamientos entre machos infectados y hembras no infectadas de *C. pipiens*. Mediante un experimento consistente en la administración de antibióticos a los hospedadores para eliminar al microbio (*Wolbachia* es sensible a los antibióticos tetraciclina y rifampicina, y también a las altas temperaturas), Yen & Barr (1971) determinaron que los huevos no infectados fertilizados por el esperma de machos infectados morían. Pero curada la infección, la incompatibilidad desaparecía.

Desde los '70 hasta entrados los '90 prácticamente nadie se ocupó de resolver si *Wolbachia pipientis* intervenía de algún modo en la incompatibilidad reproductiva de *C. pipiens*, debido a que no es fácil trabajar con esta bacteria, ya que su naturaleza endosimbiótica hace imposible cultivarla. La solución a este problema llegaría a mediados de la década del '80 cuando se desarrollaron dos métodos que revolucionaron la Biología Molecular. Uno de ellos fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa (técnica más conocida como "PCR" por sus siglas en inglés), que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. El otro método fue la secuenciación de fragmentos de ADN (técnicas de Sanger y de Maxam y Gilbert), que permitió la caracterización de las cepas de *Wolbachia* mediante su análisis filogenético. Estos avances tecnológicos reavivaron el interés por esta bacteria, al vislumbrarse que el fenómeno observado en *C. pipiens* se extendía a otras especies (Werren *et al.*, 1995a).

2.- Abundancia de *Wolbachia*

Al convertirse la técnica de PCR en una rutina de laboratorio, se comprobó la presencia de *Wolbachia* al menos en el 17% de los insectos neotropicales (Werren *et al.*, 1995a). Fue detectada en los principales órdenes de insectos, incluyendo Coleoptera, Diptera, Hemiptera/Homoptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Orthoptera. Relevamientos subsiguientes al trabajo se-

minal de Werren *et al.* (1995a) demostraron que los hospedadores de *Wolbachia* no estaban restringidos solo a los insectos. También infecta arácnidos (*e.g.* Baldo *et al.*, 2007), hexápodos primitivos como los colémbolos (Vandekerckhove *et al.*, 1999), crustáceos como los isópodos terrestres (Bouchon *et al.*, 1998; Cordaux *et al.*, 2001; Cordaux *et al.*, 2012), anfípodos (Cordaux *et al.*, 2001, 2012), ostrácodos no marinos (Baltanás *et al.*, 2007) y cirripedios (Cordaux *et al.*, 2012), nematodos filariales de importancia médica y veterinaria (Sironi *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1999) y algunos nematodos no filariales (Tsai *et al.*, 2007; Haegeman *et al.*, 2009).

Según recientes meta-análisis, la infección por *Wolbachia* está presente en el 40% de las especies de insectos (Zug & Hammertein, 2012), el 45% de las especies de ácaros (Breuwer & Jacobs, 1996), el 35% de las especies de isópodos terrestres (Bouchon *et al.*, 1998; Cordaux *et al.*, 2001) y el 47% de los nematodos filariales (Ferri *et al.*, 2011).

3.- Diversidad de *Wolbachia*

El estudio de múltiples cepas que infectan a distintos hospedadores permitió describir la enorme diversidad de *Wolbachia*. El análisis fi-

logenético de diversas regiones de su genoma permitió dividir al género en varios supergrupos (grupos de cepas relacionadas filogenéticamente) llamados arbitrariamente **A-N** (Fig. 1). Los supergrupos **A** y **B** infectan artrópodos en forma exclusiva (Werren *et al.*, 1995a, b), mientras que los supergrupos **C** y **D** son específicos de los nematodos filariales (Bandi *et al.*, 1998). Además se han descrito algunos supergrupos menos abundantes como el **E**, que infecta a colémbolos (Vandekerckhove *et al.*, 1999); el **F**, único que infecta tanto a artrópodos como a nematodos filariales (Baldo *et al.*, 2007); el **G**, que infecta a un grupo de arañas australianas y a un nematode no filarial (Rowley *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2007) y el **H**, que infecta a un género de termitas (Bordenstein & Rosengaus, 2007). Recientemente se han adicionado el supergrupo **I**, que se encuentra en las pulgas (Augustinos *et al.*, 2011); el **J**, en nematodos filariales (Augustinos *et al.*, 2011); el **K**, en ácaros araña (Ros *et al.*, 2009); el **L**, que se localiza en un nematode parásito de plantas (Haegeman *et al.*, 2009); y los supergrupos **M** y **N**, que infectan áfidos (Augustinos *et al.*, 2011).

Esta clasificación no está exenta de controversias: aún falta estudiar con mayor profundidad algunos agrupamientos (Haegeman *et al.*,

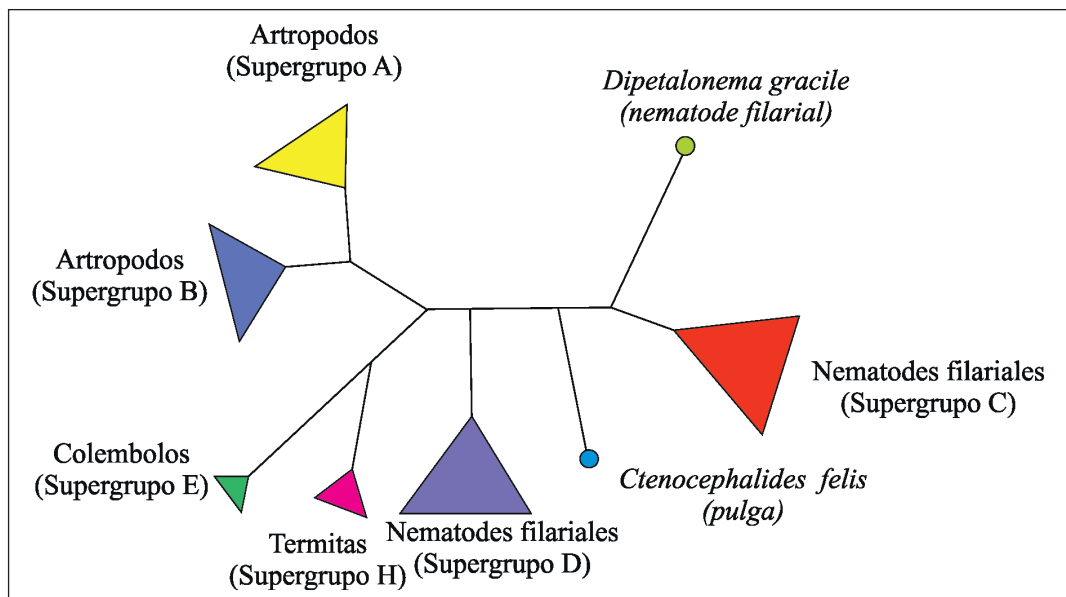


Fig. 1. Árbol filogenético no enraizado de los principales supergrupos de *Wolbachia* según lo ilustraron Werren *et al.* (2008). El supegrupo G se ha removido porque podría ser espurio. La diversidad filogenética adicional representada por estos autores actualmente se engloba en los supegrupos I (pulgas) y J (nematodos filariales). Los grupos determinados con posterioridad a Werren *et al.* (2008) no se han graficado. Crédito de la figura: John Werren, Laura Baldo y Michael Clark.

2009; Ros *et al.* 2009; Augustinos *et al.*, 2011), mientras que otros podrían ser artificiales debido a la frecuente ocurrencia de eventos de recombinación intragénica e intergénica que experimentan las cepas de *Wolbachia*, como se sospecha del supergrupo **G** (Baldo & Werren, 2007).

4.- Transmisión materna de *Wolbachia*

Para explicar la permanencia de una infección en un hospedador a través de tiempos evolutivos es necesario invocar alguna de estas alternativas: **parasitismo reproductivo**, que implica un aumento de la frecuencia de la infección en el tiempo y en el espacio a través de la manipulación de la reproducción del hospedador, o **mutualismo**, que implica un beneficio directo al organismo que actúa como “alojamiento” (Werren *et al.*, 2008). Cualquiera de estas trayectorias evolutivas evitará la pérdida de la infección, ya que en términos de *fitness*, no resulta económico “mantener” durante muchas generaciones a un organismo neutro.

Wolbachia se transmite por vía **maternal o vertical**: la bacteria es transferida de madres a hijos, independientemente del sexo de la descendencia, por medio del citoplasma del huevo. Por lo tanto, los “intereses reproductivos” de *Wolbachia* se relacionan únicamente con los hospedadores de sexo femenino (Hurst & Randerson, 2002).

Como el sexo masculino impide la transferencia de la bacteria entre dos generaciones de individuos (o sea, de padres a hijos e hijas), representa un “callejón sin salida” evolutivo para *Wolbachia*. Sin embargo, mediante la alteración de la reproducción de sus portadores, *Wolbachia* incrementa la cantidad de individuos que tienen la capacidad de transmitirla (*i.e.* hembras infectadas). El arsenal por medio del cual *Wolbachia* manipula a sus hospedadores incluye las siguientes estrategias i) androcidio o matanza masculina; ii) feminización; iii) partenogénesis telitóquica; iv) incompatibilidad citoplasmática (véase Werren *et al.*, 2008 y Engelstädter & Hurst, 2009). Justamente el vínculo de *Wolbachia* con el sistema reproductivo y las estrategias puestas en práctica para evitar el callejón sin salida que representan los machos le han hecho merecedora del mote de “titiritera del sexo” (Hurst & Randerson, 2002).

5.- Versatilidad de *Wolbachia*

Las alteraciones reproductivas que induce

Wolbachia otorgan una ventaja a las hembras infectadas sobre los individuos no involucrados en la transmisión (hembras no infectadas y machos). Este comportamiento ha señalado a *Wolbachia* como un elemento genético egoísta. Por lo tanto, cualquier variante bacteriana que

i) induzca a las hembras infectadas a producir más hijas que las no infectadas,

ii) produzca hijas que tengan más chances de sobrevivir,

será capaz de invadir las poblaciones no infectadas y expandirse.

Existen dos tipos de alteraciones reproductivas producidas por *Wolbachia*: las estrategias que distorsionan la relación de sexos (de una relación 1:1 se pasa a una relación en la que los individuos del sexo femenino son mayoría), y las que no lo hacen. En este último caso, la cantidad de hembras infectadas supera ampliamente a las que no lo están. El primer grupo incluye la partenogénesis telitóquica (de aquí en más PT; los huevos no fertilizados se desarrollan dando lugar a individuos del sexo femenino), el androcidio o matanza masculina (muerte de las larvas o de los embriones masculinos en aquellas especies en las que el canibalismo aumenta la posibilidad de supervivencia de las hermanas) y la feminización (la reproducción sexual persiste, pero aquellos individuos que se desarrollarían como machos en condiciones normales, lo hacen como hembras). En el segundo grupo se encuentra la incompatibilidad citoplasmática (de aquí en más IC), que es la alteración reproductiva más extendida entre los artrópodos. En este caso, el esperma de los machos infectados causa la esterilidad de las hembras que no portan la infección.

Existen algunas cepas que no inducen anomalías reproductivas en sus hospedadores, que sin embargo pueden invadir a las poblaciones y expandirse con éxito. En estos casos *Wolbachia* establece relaciones mediadas por el “trueque de utilidades” en artrópodos, como la producción de vitaminas (Hosokawa *et al.*, 2010) o nutrientes (Brownlie *et al.*, 2009) y la resistencia contra patógenos (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2009; van den Hurk *et al.*, 2012). Adicionalmente, *Wolbachia* aumenta la fecundidad de diversas especies (*e.g.* Vavre *et al.*, 1999) e interviene en la ovogénesis (Dedeine *et al.*, 2001).

Considerando que más del 40% de los in-

sectos están infectados con *Wolbachia*, es probable que el mutualismo nutricional y los efectos beneficiosos en la fecundidad y en la resistencia a enfermedades no sean meras excepciones, sino una regla que espera ser descubierta y formulada.

Tanto el parasitismo reproductivo como el mutualismo, ya sea nutricional o de cualquier otro tipo, explican la persistencia de *Wolbachia* en una misma especie. ¿Pero de qué manera esta epidemia se transformó en una pandemia? La respuesta a este enigma subyace en la **transferencia horizontal** de cepas entre hospedadores no relacionados, un fenómeno muy frecuente (Werren *et al.*, 1995b).

6.- *Wolbachia* y la conquista del phylum Arthropoda: de epidemia a pandemia

La incongruencia entre las filogenias de hospedadores y endosimbiontes observada inicialmente por Werren *et al.* (1995b) sugirió indirectamente que la amplia distribución de *Wolbachia* en artrópodos se debía claramente a la transmisión horizontal. Pero... ¿cómo pasa una entidad bacteriana de una especie hospedadora a otra? Uno de los posibles “vehículos” propuestos para la transmisión intertaxónica podría ser el parasitismo (parasitoides, parásitos foréticos como los ácaros o endoparásitos como los nematodos). De ello se desprende que tales parásitos y sus artrópodos hospedadores deberían compartir linajes de *Wolbachia* estrechamente emparentados. Solo se han encontrado evidencias a favor de los dos primeros de los casos mencionados (Werren *et al.*, 1995b; Vavre *et al.*, 1999; Cordaux *et al.*, 2001).

Otras rutas potenciales de intercambio podrían incluir predadores, presas y competidores asociados (Werren, 1997). En un principio se creía que la posibilidad de que *Wolbachia* no sobreviviera al pasaje por el tracto digestivo era elevada (Cordaux *et al.*, 2001). Pero recientemente se demostró su presencia en varios órganos de las especies de bicho bolita *armadillidium vulgare* and *Porcellio dilatatus dilatatus*, inicialmente no infectados, después de devorar especímenes de *A. vulgare* infectados con *Wolbachia* (Le Clec'h *et al.*, 2013).

Meta-análisis recientes han revelado que el ambiente ecológico constituiría un factor explicativo de suma importancia en la transferencia horizontal de *Wolbachia*, pero el parentesco filo-

genético no lo sería menos (Simoes *et al.*, 2012).

8.- ¿Por qué *Wolbachia* es la bacteria más abundante, diversa y versátil de toda la biota?

Wolbachia es la bacteria más abundante del planeta por su mecanismo de transmisión vertical, que asegura la expansión de la infección en el tiempo y en el espacio dentro de una misma especie, pero también por sus capacidades para transferirse horizontalmente y pasar desapercibida para el sistema inmune del hospedador (Bourtzis *et al.*, 2000), lo que posibilita la expansión de la infección a otras muchas especies, convirtiendo la epidemia inicial en una pandemia global (Werren, 1997). Además, los fenómenos de recombinación, y la presencia de fagos y de secuencias de inserción, que señalan un genoma extraordinariamente dinámico, posibilitan el aumento de la diversidad genética (Baldo *et al.*, 2005). La capacidad de inducir diferentes fenotipos, ya sea como parásito reproductivo o como mutualista, demuestra la gran versatilidad de esta bacteria. Veamos ahora cuales son estos fenotipos...

8.1.- Incompatibilidad citoplasmática

La IC es un defecto post-fertilización en la cromatina que resulta en altos niveles de muerte embrionaria y promueve el esparcimiento de *Wolbachia*. Es la alteración más común en los artrópodos (Engelstädter & Hurst, 2009). Su amplia distribución sugiere que *Wolbachia* adquirió esta capacidad varias veces durante su evolución en los artrópodos (Werren *et al.*, 1995b).

Un cruzamiento resulta incompatible cuando un macho infectado se cruza con una hembra no infectada, lo que determina la muerte del embrión en desarrollo: el cruzamiento fue incompatible. Por el contrario, el cruzamiento entre un macho sano y una hembra infectada y el cruzamiento entre dos individuos infectados con la misma cepa son totalmente compatibles.

Mediante esta alteración reproductiva, *Wolbachia* elimina las hembras no infectadas: la esterilidad de los machos infectados que se cruzan con hembras que carecen de la bacteria determinará que no nazcan individuos no infectados, y así la proporción de la progenie que no posee la bacteria irá disminuyendo con el correr del tiempo. Este tipo de incompatibilidad recibe el nombre de **unidireccional** (ICU), puesto que los apareamientos son incompatibles en un

único sentido: hembra sana y macho infectado; el cruzamiento entre una hembra infectada y un macho sano resulta compatible (Werren *et al.*, 2008; Engelstädter & Hurst, 2009).

Por otro lado, si el macho y la hembra que se cruzan poseen dos cepas diferentes de *Wolbachia*, por ejemplo *w1* y *w2*, el apareamiento es incompatible en ambas direcciones, aún cuando estos individuos pertenezcan a la misma especie y sean totalmente compatibles en ausencia de la infección. En este caso se habla de la **incompatibilidad citoplasmática bidireccional** (ICB), ya que ambas direcciones del cruzamiento (hembra *w1* con machos *w2* y hembra *w2* con machos *w1*) resultan en abortos masivos. Para un resumen actual del estado del arte de esta alteración, véase LePage & Bordestein (2013).

8.2.- Androcidio o Matanza masculina

En las especies de artrópodos que presentan esta alteración reproductiva, los machos mueren en una etapa temprana del desarrollo embrionario, a menudo antes de la eclosión de los huevos. La evolución del androcidio es una adaptación muy importante si las hembras de una especie obtienen un beneficio directo de la muerte de los machos, por ejemplo la posibilidad de alimentarse de los cadáveres de esos machos y mejorar su crecimiento, o de reducir o evitar el canibalismo entre hembras. Así, la muerte del macho hospedador aumenta las chances de supervivencia de sus hermanas, que aunque comparten la misma bacteria, son las únicas que pueden transmitirla a la siguiente generación.

Wolbachia tiene que ser capaz de reconocer el sexo de los embriones, porque la muerte ocurre de manera selectiva. Pero aún no se conoce ni el mecanismo por el que las bacterias reconocen el sexo de los embriones, ni la manera en la que ocurre la matanza (Hurst & Jiggins, 2000).

8.3.-Feminización

La feminización es un fenómeno por el cual un macho genético es convertido en una hembra funcional. Mediante esta alteración las hembras infectadas producen hasta un 90% de individuos del sexo femenino, aunque genéticamente muchas de ellas sean machos, permitiendo que su citoplasma sea transmitido al doble de las nietas a las que se transmitiría bajo

condiciones normales (o sea, sin infección). Como consecuencia, la frecuencia relativa de las hembras infectadas aumentará en la población a través de las generaciones (Engelstädter & Hurst, 2009). Aparte de los ácaros y de varios órdenes de insectos, la feminización inducida por *Wolbachia* ha sido reportada en isópodos terrestres (Bouchon *et al.*, 1998).

En los isópodos terrestres los órganos reproductores no están diferenciados en el embrión en desarrollo. Si se desarrolla la glándula androgénica, libera hormona masculina y se forman testículos; de lo contrario, se forman ovarios (Martin *et al.*, 1990). Se ha propuesto que *Wolbachia* interfiere este sistema mediante la inhibición de los genes determinantes de la masculinidad que controlan el desarrollo y diferenciación de la glándula androgénica. De esta manera, los machos se convierten en hembras reproductivamente competentes. Pero si la relación de sexos se desplaza hacia las hembras, se darán las condiciones para un conflicto genético en la determinación del sexo. Esto podría conducir a la evolución de factores supresores de la infección (Hatcher, 2000).

8.4.- Partenogénesis telitóquica

Esta es una de las estrategias más eficaces de *Wolbachia*. La partenogénesis es un tipo particular de reproducción en el que el huevo no fecundado se desarrolla dando lugar a una cría. En el caso de la PT, la progenie está compuesta "exclusivamente" por hembras.

La inducción de PT por *Wolbachia* es una manipulación casi perfecta de la reproducción del hospedador: una hembra adulta infectada produce una progenie consistente en hembras infectadas solamente, que a su vez producirán más hembras infectadas. De este modo, si una hembra infectada produce más hijas que una hembra saludable, la infección se extenderá a través de la población, en tanto la transmisión de *Wolbachia* sea perfecta (Stouthamer *et al.*, 2010). En caso de transmisión imperfecta, se alcanzará un polimorfismo estable. A menudo, las infecciones jóvenes implican una transmisión imperfecta de la bacteria a la próxima generación, tal como lo demuestra la ocurrencia ocasional de machos en la avispa *Encarsia formosa* (Reumer *et al.*, 2011), aunque la tasa de transmisión de la infección puede evolucionar en tiempos increíblemente cortos (Weeks *et al.*, 2007).

8.5.- Efecto popcorn

Este efecto de *Wolbachia*, descubierto por azar en una cepa de *D. melanogaster* (Min & Benzer, 1997), no es una alteración reproductiva pero es tan impresionante que merece ser explicado con detalle, sobre todo por el potencial que encierra como una herramienta para la aplicación de *Wolbachia* al control de plagas y vectores.

La cepa inductora de *popcorn* fue descubierta mientras Min & Benzer (1997) trataban de identificar mutaciones causantes de una degeneración cerebral en la mosca antes mencionada. Esta cepa de *Wolbachia* es muy virulenta y ocasiona una reducción sorprendente del ciclo de vida a través de una rápida y masiva degeneración de los tejidos corporales concomitantemente con una enorme proliferación de *Wolbachia* en tejidos nerviosos y musculares hacia la mitad de la adultez, lo que resulta en la muerte prematura del insecto. De aquí el nombre de esta "patología": la acumulación de *Wolbachia* es tan violenta, que recuerda al comportamiento del pochoclo (*popcorn* en inglés) en un horno de microondas. Como no podía ser de otra manera, la mosca muere repentinamente. El mecanismo molecular que dispara este "estallido replicativo" se desconoce por completo. Hasta el momento, la cepa *popcorn* no ha sido detectada en otra especie.

9.- Otros parásitos reproductivos

Wolbachia no es el único parásito reproductivo (Duron *et al.*, 2008). Hace unos pocos años se descubrió otra bacteria de características muy similares a *Wolbachia*: *Cardinium hertigii*, a quien de aquí en más llamaremos *Cardinium* (Zchori Fein *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 2003). Esta bacteria pertenece al phylum Bacteroidetes (no es una rickettsia) (Zchori Fein *et al.*, 2004) y produce IC, feminización y PT en insectos y ácaros (Zchori Fein *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 2003). Hasta el momento se ha detectado en el 7,2% de los insectos (Weeks *et al.*, 2003). Al igual que *Wolbachia*, se transfiere horizontalmente (Gruwell *et al.*, 2009). Aunque es vulnerable a los mismos antibióticos que *Wolbachia* (rifampicina y tetraciclina), la penicilina G, la ampicilina y el cloranfenicol también resultan letales para su desarrollo, lo que es muy útil para discernir el papel que juega cada una de estas bacterias cuando se las encuentra en el mismo hospedador (White *et al.*, 2011).

Recientemente se registraron otros parásitos reproductivos bacterianos en los géneros *Arsenophonus* (hasta ahora se ha visto que induce androcidio en una avispa, [Ferree *et al.*, 2008]), *Rickettsia* (que induce PT y androcidio [Werren *et al.*, 1994; Lawson *et al.*, 2001]), y *Spiroplasma* (que produce androcidio tanto en embriones como en larvas de escarabajos, chicharras y mariposas (Majerus *et al.*, 1998; Hurst *et al.*, 1999).

También existen algunos otros parásitos reproductivos por fuera del dominio procariótico, entre los que se cuentan protozoos, nematodos y virus de ARN (Vance, 1996; Terry *et al.*, 2004; Nakanishi *et al.*, 2008). Los estudios sobre estos organismos son incipientes y pueden abrir nuevas posibilidades.

10.- Consecuencias evolutivas de la infección

Debido a su rol en la reproducción, *Wolbachia* tiene una influencia capital en el destino evolutivo de sus hospedadores. De acuerdo al fenotipo que despliegue, *Wolbachia* puede incidir en cuestiones tan importantes como la determinación del sexo (Cordaux *et al.*, 2011; Kagayama *et al.*, 2012), el ciclo celular (Stouthamer, 1997) o la gametogénesis (*e.g.* Dedeine *et al.*, 2001). También puede constituir el punto de partida para la adquisición de una novedad evolutiva al contribuir a ciertas funciones del hospedador (*e.g.* Hosokawa *et al.*, 2010), o al transferir porciones de su genoma al genoma de la especie hospedadora (*e.g.* Dunning Hotopp *et al.*, 2007). Todo esto al margen de otros efectos como la reversión de los roles sexuales (*e.g.* Jiggins *et al.*, 2000) o el surgimiento (Bordenstein 2003; Brucker & Bordenstein, 2012) y la extinción de especies (Charlat *et al.*, 2003), y la influencia en los genomas de herencia vertical como el ADN mitocondrial (Hurst & Jiggins, 2005).

11.- *Wolbachia* y biología aplicada: una pandemia con posibilidades

La resistencia a los insecticidas, sumada a la toxicidad de estas sustancias en organismos que no son plagas y a la crisis ambiental que estamos viviendo enfatizan la necesidad de implementar métodos alternativos al control químico para reducir o erradicar poblaciones de insectos plaga, entre los que se cuentan los vectores de enfermedades. La amplia distribu-

ción de *Wolbachia*, así como la capacidad de manipular la reproducción de sus hospedadores la convierten en una buena candidata como potencial herramienta para el control de plagas (Saridaki & Bourtzis, 2009). Los avances producidos en las últimas décadas proveen el punto de partida para la aplicación de este microbio al control de insectos y también de nematodos parásitos (Brelsfoard & Dobson, 2009; Saridaki & Bourtzis, 2009; LePage & Bordenstein, 2013; McGraw & O'Neill, 2013).

Algunos de los fenotipos inducidos por *Wolbachia* han servido como fuente de inspiración para estrategias tendientes a controlar los niveles poblacionales de sus hospedadores. Se han propuesto dos estrategias basadas en la IC: 1) la supresión poblacional o Técnica del Insecto Incompatible, que utilizaría a *Wolbachia* como un factor esterilizante, y 2) el reemplazo poblacional o estrategia de impulso, que la utilizaría como un simple vehículo para impulsar fenotipos deseables en poblaciones naturales como el efecto *popcorn*, que podría ser utilizado para reducir la longevidad de insectos adultos. También la PT podría ser empleada en los programas de control biológico que utilizan avispas parasíticas, sin dejar de lado a los mutualismos nutricionales.

Para aplicar estas técnicas, es necesario conocer cuáles son las plagas y vectores que están infectados y qué fenotipos poseen, cuáles no lo están y porqué, y qué efectos pueden inducirse en estos últimos. Aunque parezca sorprendente, a pesar de la distribución global de *Wolbachia*, importantes plagas agrícolas como la mosca del olivo *Bactrocera oleae* y la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata* y algunos vectores de severas enfermedades humanas, como *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae* no están naturalmente infectados con *Wolbachia*. Sin embargo, la bacteria puede ser transferida y establecida en algunos hospedadores nuevos, operación conocida como transinfección.

Aunque algunas veces se obtiene la expresión del fenotipo reproductivo esperado (Braig *et al.*, 1994; Zabalou *et al.*, 2004), a menudo ocurren resultados totalmente inesperados. Un ejemplo notable lo constituye la transinfección de la cepa feminizante del lepidóptero *Ostrinia scapularis* al lepidóptero *Ephesia kuehniella*, en el que induce androcidio (Fujii *et al.*, 2001). El fenotipo expresado por *Wolbachia* es una

función de la cepa bacteriana en sí, de la densidad de esa cepa en particular, del fondo genético del hospedador y de sus capacidades fisiológicas (Braig *et al.*, 2002). El impacto de cada factor diferirá en cada caso. Con el tiempo se ha sumado evidencia a favor de la importancia del fondo genético en la expresión de un fenotipo dado (revisada en Dobson, 2003).

11.1.- Técnica del Insecto Incompatible

La "Técnica del Insecto Incompatible" (TII) se basa en la esterilidad que resulta de la IC entre hembras silvestres no infectadas y machos liberados infectados con una cepa de *Wolbachia* inductora de ese trastorno reproductivo y podría ser utilizada como una alternativa a la Técnica del Insecto Estéril (TIE). Como *Wolbachia* no se transmite por vía paterna, la infección no llegaría a establecerse en el lugar.

Zabalou *et al.* (2004) lograron la infección estable de una línea naturalmente no infectada de *C. capitata* con una cepa inductora de IC. A partir de este hallazgo se han logrado suprimir completamente varias poblaciones de laboratorio de esta mosca con una única liberación de machos infectados. Posteriormente, Zabalou *et al.* (2009) optimizaron esta técnica y obtuvieron resultados muy satisfactorios en las pruebas de supresión de la plaga en condiciones seminatales (> 99%). Cabe aclarar que estos resultados no son extrapolables a todas las líneas de *C. capitata* (Sarakatsanou *et al.*, 2011): la interacción entre el fondo genético de la bacteria y el del hospedador es fundamental para el establecimiento exitoso de la infección.

Respecto a los vectores de enfermedades humanas, Laven (1967) suprimió una población aislada de *C. pipiens quinquefasciatus* en la India. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Consejo Médico de Investigación de la India aplicaron la técnica a mayor escala en ese país no solo para diversas especies de *Culex* sino también para *Ae. aegypti*, aunque el esfuerzo no pudo ser continuado debido a reclamos de los medios de comunicación, que relacionaron este procedimiento con un programa de guerra biológica (Curtis & Von Borstol, 1978; Curtis & Reuben, 2007). Recientemente, Atyame *et al.* (2011) retomaron los estudios para la implementación de la TII en el sur de la India y produjeron el colapso demográfico de una población de la Isla Reunión. Otros sujetos de evaluación de la TII

son *Ae. polynesiensis*, vector en el que se logró una supresión del 75% de la población original (Brelsfoard *et al.*, 2008; O'Connor *et al.*, 2012), y *Ae. albopictus* (Calvitti *et al.*, 2010).

La TII podría constituir una herramienta adicional para el control de numerosas especies de moscas y mosquitos perjudiciales para las poblaciones humanas, con el aditamento de que no resulta agresiva para el ambiente. Pero para que la técnica sea aplicada exitosamente, se debe cumplir una serie de condiciones. A saber, una alta tasa de IC en la cepa liberada (es decir, que no haya descendencia de ningún cruzamiento entre hembras silvestres y machos liberados); similar o mayor competitividad sexual de los machos liberados respecto a los machos silvestres, de modo que el macho silvestre no resulte más atractivo para la hembra a la hora de elegir compañero; que no haya riesgo de efectos colaterales indeseados en el ecosistema a causa de la liberación; que solo se liberen machos para que la infección no se establezca en la naturaleza y que así no se produzca el reemplazo de la población no infectada por la infectada. Otra preocupación de tipo ética se refiere al caso especial de los mosquitos, ya que solo la hembra pica a los humanos y por ende se comporta como vector de enfermedad. Por eso, se deberían extremar los esfuerzos para determinar el sexo de los insectos liberados. Aun contando con líneas de sexado genético, se ha contabilizado hasta un 0,25% de contaminación de hembras (Franz, 2005). Este valor es pequeño en términos absolutos, pero la enorme cantidad e insectos liberados aumenta su valor relativo. Aunque se han propuesto algunas soluciones provisionales (Zabalou *et al.*, 2004, 2009), el desarrollo de una línea de sexado genético 100% efectiva será clave para la aplicación de esta estrategia de control de plagas.

A pesar de algunos escollos iniciales, la TII se perfila como una alternativa interesante para reemplazar o combinar con la TIE. El éxito de los ensayos mencionados constituye un estímulo para la aplicación de la TII a otras especies de mosquito de importancia sanitaria y de plagas agrícolas.

11.2.- Técnicas de reemplazo poblacional

Si bien hasta el momento no se ha detectado la presencia de *Wolbachia* en especies de importancia sanitaria como los mosquitos del género *Anopheles* (el vector de la malaria) o

el mosquito *Ae. aegypti*, *Wolbachia* podría ser utilizada como un sistema de “para-transformación”. Esta técnica consistiría en el reemplazo de una población de vectores no infectados por una población portadora de *Wolbachia* que posea alguna característica deseable. A continuación se describen los casos más relevantes.

11.2.1.- Paratransgénesis

Una meta muy ambiciosa de los programas de control implica la producción de organismos genéticamente modificados o “transgénicos” en los que su material genético es manipulado a fin de que produzcan alguna característica deseada. *Wolbachia* podría resultar de utilidad como un medio de esparcimiento de insectos genéticamente modificados en poblaciones naturales.

Actualmente se está intentando la producción de esta clase de organismos en insectos vectores, de manera que ya no sean capaces de actuar como vehículos de los patógenos que portan (se les introduce un “gen antivector” que bloquea la transmisión del parásito). Si además el insecto transgénico está infectado con una cepa de *Wolbachia* inductora de IC, estos podrían reemplazar al vector natural en la población. *Wolbachia* sería la fuerza de impulso del sistema transgénico. Aunque a nivel teórico este sistema de control parece promisorio, hasta el momento no se han logrado avances significativos en la combinación de una cepa que cause IC y un insecto transgénico. Una de las posibilidades para lograr esto es introducir los genes de interés en un cultivo de bacterias e incorporar dichas bacterias en el insecto vector, objetivos que no se han alcanzado hasta ahora por la imposibilidad de cultivar a *Wolbachia*. También se podrían introducir los genes responsables de la IC en el genoma del hospedador, aunque por el momento no se sabe cuáles son ni donde se ubican. Pero se podría combinar la introducción del gen de interés a través de una bacteria cultivable en combinación con una cepa de *Wolbachia* inductora de IC que esparza esta característica. La cooperación entre diferentes microorganismos simbióticos puede ser la clave para la implementación de esta técnica, por ejemplo para controlar la “enfermedad del sueño”.

Las moscas tsetse (Diptera, Glossinidae) son los vectores cíclicos de los protozoos que causan la tripanosomiasis humana africana (o “enferme-

dad del sueño”) y la tripanosomiasis animal africana (o “nagana”). Recientemente se demostró la inducción de una fuerte IC en *Glossina morsitans morsitans* (Alam *et al.*, 2011). Este estimulante descubrimiento abre una nueva ruta hacia el control de las poblaciones de los vectores de estas tripanosomiasis (Doudoumis *et al.*, 2013). Una posibilidad es la ya mencionada TII. Pero la IC también podría esparcir moscas paratransgénicas resistentes a los tripanosomas, reemplazando las poblaciones originales susceptibles.

Las moscas tsetse poseen un simbionte cultivable, la bacteria *Sodalis glossinidus*. La posibilidad de cultivar a *Sodalis* abre al camino hacia la paratransgénesis, *i.e.* la modificación de esta bacteria para que exprese productos que confieran resistencia a los tripanosomas (Aksoy *et al.*, 2008). Además, *Sodalis* reside muy cerca de donde se ubican los tripanosomas, por lo que tiene el potencial de bloquear el desarrollo del parásito a través de la expresión de productos nocivos para ellos y es además muy resistente a la mayoría de los péptidos tripanosomicidas. Las bacterias modificadas podrían ser impulsadas en las poblaciones de *Glossina* sp. por medio de la IC inducida por *Wolbachia*, una verdadera estrategia cooperativa para la erradicación de esta enfermedad. Un paso crucial en la tecnología paratransgénica es la identificación de sustancias efectoras, *i.e.* productos génicos que tengan un efecto adverso en el desarrollo del patógeno. A la fecha se han producido algunos avances en este campo (Nantulya & Moolo, 1988; Hu & Aksoy, 2005; Caljon *et al.*, 2013).

Los modelos matemáticos predicen que la paratransgénesis tiene el potencial para eliminar la enfermedad del sueño, siempre y cuando la modificación genética sea efectiva en proteger contra la transmisión del tripanosoma y que la especie de mosca tsetse blanco sea mayoritaria respecto a otras tsetse en la localidad de la liberación (Medlock *et al.*, 2013).

11.2.2.- Reemplazo poblacional y acortamiento del ciclo de vida

El efecto *popcorn* detallado más arriba podría ser utilizado como un método de control de ciertos vectores de enfermedades infecciosas, de modo que estos mueran antes de que finalice el período de incubación de la enfermedad que van a transmitir o “período de incubación extrínseco” (*i.e.* tiempo transcurrido entre el

consumo de sangre infectada con un patógeno por un insecto vector y el escape del patógeno del tubo digestivo y la consiguiente colonización de las glándulas salivales) (Sinkins & O’Neill, 2000).

Este escenario requiere además que la cepa de *Wolbachia* inductora del efecto *popcorn* produzca una fuerte IC. Para implementar esta estrategia de control habría que lograr la infección estable del vector con una cepa con estas características.

Mediante la transfección de la cepa inductora de *popcorn* de *D. melanogaster* a *Ae. aegypti*, McMeniman *et al.* (2009) redujeron la duración del ciclo de vida del vector a la mitad bajo condiciones de laboratorio. Además, esta cepa indujo IC, lo que facilitaría la invasión de una población natural por parte de estos insectos modificados. Por otra parte, tuvo otros efectos deseables, como el bloqueo de los virus que producen dengue y chikungunya (artritis epidémica) (Moreira *et al.*, 2009a), de nematodos filariales (Kambris *et al.*, 2009) e incluso de un protozoo como *Plasmodium* cuando esta misma cepa de *Wolbachia* fue transinfectada a *An. gambiae* (Kambris *et al.*, 2010). Pero también se notaron efectos negativos en el fitness del hospedador (Turley *et al.*, 2009), lo que iría en detrimento del reemplazo poblacional, particularmente en regiones con estaciones secas (McGraw & O’Neill, 2013). Se notaron además una elevada actividad locomotora (Kambris *et al.*, 2009) y una elevada tasa metabólica (Evans *et al.*, 2009), así como temblores y proboscis deformadas que revelaron cambios fisiológicos que no se ajustan a una patogénesis bacteriana estándar en insectos (Moreira *et al.*, 2009b). Una densidad exagerada de la bacteria podría explicar desajustes tales como un exceso de dopamina, responsable del aumento en la locomoción (Moreira *et al.*, 2011). En síntesis, los efectos negativos producidos en el fitness del hospedador podrían ser contraproducentes para el establecimiento de esta cepa en poblaciones naturales (Turelli, 2010).

En *Ae. albopictus*, vector de varios tipos de encefalitis y también del dengue, los resultados fueron menos promisorios que en *Ae. aegypti*: la elevadísima densidad de *Wolbachia* sería la responsable de una disminución en la fecundidad (Suh *et al.*, 2009). Además, la IC es incompleta y débil, y la reducción de la longevidad en la hem-

bra no es tan severa como la conseguida en *Ae. aegypti*. Por lo tanto, es muy poco probable que esta simbiosis no adaptativa se expanda en una población no infectada de *Ae. albopictus*.

En cuanto a la efectividad de esta técnica como método de control de insectos vectores, Schraiber *et al.* (2012) desarrollaron modelos matemáticos y computaron los parámetros demográficos para mosquitos infectados y no infectados y la velocidad de expansión de la infección, y los resultados distan de ser optimistas. La lentitud de la expansión sería tal (0,43 m/día), que se requeriría una cantidad de puntos de liberación prohibitiva. Así, a partir de una única liberación en el centro de Bangkok (Tailandia), tomaría unos 130 años la propagación de la infección por la ciudad. Para resultar efectiva, la campaña de expansión de esta cepa de *Wolbachial* alcanzaría costos siderales. De cualquier manera, las predicciones del modelo podrían subestimar la velocidad real en la naturaleza, dado que falta aún la evaluación del desempeño de la población de insectos modificados en condiciones de campo y la evaluación de los riesgos de la liberación para el ecosistema.

11.2.3.- Reemplazo poblacional y bloqueo de la enfermedad I

En los últimos años se ha descubierto que algunas cepas de *Wolbachia* proveen defensas contra patógenos a sus hospedadores. Una cepa que además induzca IC (o en combinación con alguna otra cepa que lo haga) podría inmunizar a los insectos vectores de las enfermedades que transmiten.

La malaria es una enfermedad vectorial causada por el parásito *Plasmodium*, que es transmitido a través de la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. Aunque estos mosquitos no están naturalmente infectados (e.g. Kittayapong *et al.*, 2000, Ricci *et al.*, 2002), se podría ensayar la transinfección de la bacteria. Factores como la edad del embrión al momento de la inyección y el nivel de desecación son cruciales para el éxito del experimento. Aunque se ha conseguido la infección en líneas celulares inmunocompetentes (Rasgon *et al.*, 2006) y en tejidos somáticos de *Ae. gambiae* (Rasgon *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2009), no ha ocurrido lo mismo con los tejidos germinales, lo que impide una infección estable.

Recientemente, se han identificado algunas

barreras que impiden a *Wolbachia* la colonización de los tejidos reproductivos (Rasgon & Hughes, 2012). Estos autores determinaron que *Wolbachia* es capaz de invadir los tejidos germinales tanto *in vitro* como *in vivo*, pero la microflora intestinal de *An. gambiae* impide la transmisión de la bacteria a las siguientes generaciones. Eliminada la microflora endógena del mosquito, la transmisión vertical de *Wolbachia* es posible a niveles comparables a los de las infecciones naturales. Estos resultados son cruciales no solo para la obtención de líneas de *An. gambiae* con infecciones estables, sino para comprender por qué algunos posibles hospedadores no poseen la infección en la naturaleza.

La evidencia indica que es probable que *Wolbachia* provea protección contra *Plasmodium* sp. en el caso de lograr una transinfección estable (Moreira *et al.*, 2009a; Kambris *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2012b; Zele *et al.*, 2012), aunque el efecto de *Wolbachia* sería cepa-específico (Hughes *et al.*, 2012a, b).

Recientemente se ha logrado la infección estable de *An. stephensi*: la infección con esta cepa indujo IC, una altísima tasa de transmisión vertical gracias a la infección de los ovarios y resistencia a *P. bergeri* a través del estrés oxidativo (Bian *et al.*, 2013).

El uso de *Wolbachia* para el control de la malaria requiere líneas con una infección estable de los principales vectores de la enfermedad: *An. gambiae* (África), *An. stephensi* (India) y *An. darlingi* (América del Sur y Central), además de una extensa evaluación de los efectos protectivos contra los parásitos de la malaria humana como *P. falciparum* y *P. vivax* (Walker & Moreira, 2011). Por el momento no es posible contar con un sistema que invada fácilmente poblaciones naturales de *Anopheles*, con excepción de *An. stephensi*, pero se están comenzando a identificar las barreras biológicas para este propósito. La enorme complejidad biológica de los vectores de la malaria dificulta la implementación de *Wolbachia* como mecanismo de control, limitándose a áreas endémicas en las que un único vector transinfectable esté presente. No obstante, el hallazgo de Bian *et al.* (2013) sugiere buenas expectativas.

11.2.4.- Reemplazo poblacional y bloqueo de la enfermedad II

El dengue es una enfermedad viral transmiti-

da por el mosquito *Ae. aegypti*. Las estimaciones más recientes de la OMS predicen que los casos de dengue oscilarán entre los 50-100 millones por año (McGraw & O'Neill, 2013). "Eliminemos el Dengue" ("Eliminate Dengue Project" [EDP], <http://www.eliminatedengue.com>) es un esfuerzo de alcance mundial para eliminar al virus de esta temible enfermedad a través de la diseminación de mosquitos infectados con *Wolbachia*. De origen australiano, el proyecto posee centros de investigación también en Colombia, China, Indonesia, Vietnam y Brasil, aumentando la influencia de la liberación de mosquitos modificados en algunas de las áreas más afectadas. La base de este proyecto es bastante simple, no así su implementación.

El grupo de Scott O'Neill logró la infección estable de *Ae. aegypti* con una cepa aislada de *D. melanogaster* que no sólo induce IC, sino que además produce resistencia contra ciertos virus. El resultado es un vector del dengue en el que se ha bloqueado la transmisión del virus y que gracias a la IC puede expandir rápidamente esta característica, reemplazando la población inicial en unas pocas generaciones (Walker *et al.*, 2011).

Hasta el momento solo se han realizado pruebas en jaulas de campo y liberaciones en dos puntos suburbanos de la ciudad de Cairns (Queensland, Australia) (Hoffman *et al.*, 2011). Se liberaron hasta 275 mosquitos transinfectados con *Wolbachia* por semana durante un período de diez semanas. La infección alcanzó una prevalencia del 80% al mes de la liberación, y la fijación a los tres meses. El reemplazo de la población nativa se mantiene aún después de 18 meses (McGraw & O'Neill, 2013). Estos guarismos sugieren que se podría liberar un menor número de mosquitos, abaratando los costos (Hoffman *et al.*, 2011) sobre todo en grandes regiones geográficas.

De hecho, ya se está pensando en la liberación a una escala mayor, considerando que no se han detectado efectos perjudiciales para el ecosistema (Murphy *et al.*, 2010). Por ejemplo, no hubo evidencia de transferencia de *Wolbachia* a los humanos por la picadura de los mosquitos, ni a predadores como las arañas o los geckos (Popovici *et al.*, 2010).

Hace algún tiempo se comenzaron a desarrollar los ensayos necesarios para examinar el desempeño de la cepa inductora de *popcorn*,

que también mostró poseer la capacidad de bloquear al virus del dengue en Vietnam. Después de liberar mosquitos transinfectados una vez por semana durante cuatro semanas en la isla de Tri Nguyen, la infección se había extendido al 30% de la población. En la semana 11, los niveles de infección se elevaban al 59%. Al final de la experiencia (principios de septiembre de 2013), *Wolbachia* había colonizado el 80% de la población. El carácter insular de esta liberación promueve la creencia de que la infección se fijará en poco tiempo. En Indonesia y en Brasil han comenzado las "negociaciones" a nivel regulatorio con el gobierno y con la comunidad a fin de liberar mosquitos en algunos puntos de Rio de Janeiro durante 2014.

A corto plazo, el desafío para este tipo de tecnologías será la sostenibilidad, por el peligro que representa el restablecimiento de la población nativa, ya sea por supresión incompleta o por la migración (McGraw & O'Neill, 2013). Este efecto deberá ser evaluado en cada contexto geográfico y ecológico donde ocurran las liberaciones. En poblaciones aisladas, especialmente en las insulares, la eliminación podría ser permanente. Quizás, una vez lograda la supresión, solo se deban realizar pequeñas liberaciones para mantener la población libre de virus. Aun no se ha probado si la expansión de *Wolbachia* podría alcanzar a las especies que no son blanco. Los cuerpos de agua, las autopistas y las áreas de cultivo podrían constituir barreras efectivas para la propagación de los mosquitos modificados, dado el carácter antropofílico del vector y su escasa capacidad de dispersión (Harrington *et al.*, 2005).

Como ocurre con cualquier estrategia de control de plagas, uno de los grandes problemas de este sistema es la aparición de resistencia a la bacteria, que reduciría su densidad o restringiría su distribución a ciertos tejidos (McGraw *et al.*, 2002). Liberaciones subsecuentes de *Ae. aegypti* infectados con múltiples cepas de *Wolbachia* podrían contrarrestar los efectos de la resistencia, al reemplazar la infección que se volvió ineficaz por medio de ICB (Cook *et al.*, 2008). Además, el patógeno podría desarrollar resistencia al bloqueo ocasionado por *Wolbachia*. El desconocimiento del mecanismo que elimina los agentes virales impide cualquier tipo de predicción sobre la evolución de este tipo de resistencia, además de la estabilidad de dicho meca-

nismo en el campo. Aparentemente, el grado de bloqueo del parásito depende de la densidad de la bacteria y/o de su distribución en los tejidos del hospedador (Moreira *et al.*, 2009a; Mousson *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012). Aunque el estímulo de la inmunidad innata en el hospedador por parte de la bacteria podría contribuir al bloqueo del parásito, particularmente en transinfecciones jóvenes, otros mecanismos deben estar implicados en esta compleja interacción (Rances *et al.*, 2012).

11.3.- Mutualismo nutricional como base del mecanismo de control

Los mutualismos nutricionales relacionados con *Wolbachia*, que podrían ser muchos más de los que aún se conocen, constituyen la base de otra potencial técnica de control. En el caso de la chinche *Cimex lectularius*, a la que *Wolbachia* suministra vitamina B (Hosokawa *et al.*, 2010) ¿cómo sobrevivir siendo hematófago sin esa preciosa sustancia?

Recientemente, *C. lectularius* resurgió como una amenaza a nivel mundial, quizás como consecuencia de la mayor frecuencia en los viajes, el cambio climático y la resistencia a los insecticidas. Aunque este insecto no es un vector (al menos no se conoce la transmisión de ninguna enfermedad asociada a su picadura), se han descubierto patógenos humanos tanto en la superficie de su cuerpo como en sus excrementos (Delaunay *et al.*, 2011). Debido a su carácter antropofílico, puede generar reacciones en la piel, anafilaxis, ansiedad y otros problemas, lo que la convierte en un caso preocupante desde un punto de vista sanitario (Rossi & Jennings, 2010).

El mutualismo nutricional reportado por Hosokawa *et al.* (2010) podría ser el instrumento de control de este insecto cosmopolita, aunque se necesita mucha información sobre esta interacción, especialmente sobre la comunidad microbiana que alberga *C. lectularius*. La caracterización del microbioma (*i.e.* la comunidad ecológica de microorganismos comensales, mutualistas y patogénicos que habitan en un espacio corporal) de este hospedador de *Wolbachia* es uno de los primeros pasos para su utilización como medio de biocontrol (Meriweather *et al.*, 2013), ya que para empezar, es necesario conocer cómo podría impactar la estructura de la comunidad en las acciones necesarias para su erradicación.

En los nematodos productores de filariasis

Wolbachia se comporta como mutualista, por lo que podrían ser blanco de esta técnica de control. Cuando se administra un antibiótico que cura la infección, la filaria hospedadora experimenta problemas en el desarrollo, disminuye su supervivencia a largo plazo y experimenta una marcada disminución de la fecundidad. Se cree que *Wolbachia* proveería de vitaminas, nucleótidos, cofactores y grupos hemo al gusano hospedador (Foster *et al.*, 2005; Ghedin *et al.*, 2007). En compensación recibe metabolitos específicos que ya no puede generar debido a que el genoma de estos endosimbiontes, en los que la dependencia es recíproca, va sufriendo una degradación severa (Foster *et al.*, 2005; Ghedin *et al.*, 2007).

Las filariasis son difíciles de sanar, ya que la mayoría de los tratamientos tienen efectos colaterales severos. Además, los protocolos corrientes están perdiendo eficacia, y la resistencia a los fármacos se está volviendo preocupante (Slatko *et al.*, 2010). Una posible solución benigna para estas terribles enfermedades tropicales fue ensayada por Saint Andre *et al.* (2002), quienes comprobaron que el endosimbionte cumple un rol fundamental en la respuesta inflamatoria de la dolencia conocida como “ceguera del río”, la cual disminuye cuando se administra un tratamiento con antibióticos efectivos contra *Wolbachia* (doxiciclina). Más allá de la dependencia del gusano con la bacteria, esta última jugaría un papel primario en la inflamación: aparentemente la ceguera estaría causada por *Wolbachia*, no por la filaria. Así, la terapia “anti-*Wolbachia*” se perfila como una herramienta prometedora, no solo para eliminar al gusano parásito, sino para mitigar el efecto de la infección.

Los caminos metabólicos involucrados en la interacción gusano-*Wolbachia* son blancos potenciales de diversas drogas (LePage & Bordenstein, 2013). Incluso existe la esperanza para una vacuna antifilarial: la inmunización de ratones con una proteína recombinante de *Wolbachia* mostró una resistencia fuerte, aunque incompleta, al vector de la elefantiasis *Brugia malayi* (Nag *et al.*, 2013). Finalmente, el Consorcio Anti-*Wolbachia* (A-WOL, <http://www.a-wol.net>) ha comenzado el escrutinio de diversos compuestos que podrían eliminar la infección en una línea celular de mosquitos con el propósito de identificar drogas para tratar las filariasis (Taylor *et al.*, 2013) La urgencia por encontrar

una terapia anti-*Wolbachia* es grande a pesar de la doxiciclina, en parte por la duración del tratamiento, la potencial generación de resistencia en la microflora endógena y las contraindicaciones en niños y mujeres embarazadas.

11.4.- Partenogénesis telitóquica como un medio para la reducción de los costos del control biológico

Las cepas de *Wolbachia* inductoras de PT pueden ser de utilidad en el campo del control biológico de plagas. Esta estrategia consiste en la liberación de “enemigos naturales” (predadores, parásitos) que reducen la población de la plaga en cuestión. Muchos de los enemigos naturales que se usan son avispas parasitoides que están naturalmente infectadas con *Wolbachia* (géneros *Trichogramma* o *Nasonia*, por ejemplo). Las avispas infectadas con cepas de *Wolbachia* inductoras de PT podrían ser más eficientes en el control biológico de plagas porque toda la progenie consistiría en hembras (recordemos que la hembra del parasitoide es la que deposita los huevos en el cuerpo de la víctima). De esta manera, los costos de producción de la cría masiva por hembra serían menores, las avispas infectadas podrían tener una mayor tasa de crecimiento poblacional y podrían causar una disminución más marcada de la población plaga respecto a su contraparte sexual (Stouthamer, 1993; Stouthamer *et al.*, 1999). Sin embargo, hay un costo. Debido a la reproducción asexual, se acumularán mutaciones deletéreas y se erosionará la variabilidad genética (Brelsfoard & Dobson, 2009). Si estos efectos pudieran disminuirse, los programas de control biológico podrían beneficiarse con las cepas inductoras de PT. Hasta el momento solo se ha logrado una introducción exitosa de *Wolbachia* de una especie de *Trichogramma* en otra, aunque los resultados no han sido enteramente satisfactorios (Grenier *et al.*, 1998).

Como en cualquier plan de control que se plantee seriamente, un factor muy importante a tener en cuenta es el efecto del uso de *Wolbachia* en las especies que no constituyen un blanco del plan de acción.

11.5.- Bacteriófagos como vectores de paratransformación de *Wolbachia*.

Una de las mayores limitaciones en la investigación básica y aplicada de *Wolbachia* es la

imposibilidad de cultivarla y transformarla exitosamente. Los fagos existentes en el genoma de *Wolbachia* (Masui *et al.*, 2000) ofrecen una alternativa para resolver estos problemas, utilizándolos como vectores transgénicos para *Wolbachia*. Incluso, ¿podrían tales partículas ser utilizadas en una terapia anti-*Wolbachia* para tratar las filariasis?

El fago WO resulta un candidato interesante para llevar a cabo la manipulación del genoma de *Wolbachia*, tomando como punto de partida las recombinasas y los sitios de anclaje para la integración de los WO identificados (Tanaka *et al.*, 2009), aun a pesar de su gran diversidad (Kent *et al.*, 2011). Aunque los obstáculos para lograr este cometido son muchos, el potencial del fago WO como vector de transformación es enorme (Metcalf & Bordenstein, 2012).

En cuanto a las aplicaciones terapéuticas, el genoma de los fagos WO contiene algunos productos génicos que podrían inhibir a *Wolbachia*, como lisozimas (enzimas que lisan la pared celular) y patatinas (proteínas con actividad fosfolipasa) (Kent *et al.*, 2011). Estas sustancias podrían aislarse o bien sintetizarse por medios artificiales para su administración a pacientes de filariasis (Metcalf & Bordenstein, 2012).

12.- Consideraciones finales y perspectivas: ¿Qué se podría hacer en la Argentina?

El simposio presentado en el VIII Congreso Argentino de Entomología, “*Wolbachia, una pandemia con posibilidades*”, trató de difundir el potencial de la bacteria como “insecticida biológico” para el control de poblaciones de insectos. En los próximos párrafos me referiré a los avances acontecidos en el país y las posibilidades que se podrían explorar.

En cuanto al control de plagas agrícola, el relevamiento de la infección en poblaciones naturales y en líneas de laboratorio de la mosca sudamericana de la fruta *Anastrepha fraterculus* y de su parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* se halla en progreso (Conte *et al.*, 2012), así como el estudio del fenotipo inducido por la bacteria a partir de experimentos de cura con antibióticos. Estos estudios básicos sentarán las bases para una futura implementación de la TII o de algún otro tipo de control, si la bacteria cumpliera un rol en la respuesta inmune frente a la parasitación, como ocurre en el par hospedador-parasitoide *D. simulans* - *Leptopilina*

heterotoma (Fytou et al., 2006).

Por otro lado, se ha reportado la infección con *Wolbachia* en numerosas especies de gorgojos partenogenéticos de origen sudamericano que se comportan como plagas de la soja, los cítricos, la alfalfa y otros cultivos (Rodríguez et al., 2010a). Las especies asexuales de gorgojos poseen mayor capacidad colonizadora que las bisexuales (Rodríguez et al., 2010b; Guzmán et al., 2012; Lanteri et al., 2013). Dado que la bacteria guarda una relación con la partenogénesis (Rodríguez et al., 2010a; Rodríguez et al., en prep.), la conquista de nuevos ambientes por parte de estos destructivos gorgojos es una consecuencia indirecta de la infección. El estudio de estas cepas puede conducir a estrategias de control novedosas y contribuir a desentrañar muchos de los interrogantes que guarda la colonización de los ambientes marginales.

Respecto a la chicharrita *Delphacodes kuscheli* Fennah, vector de importantes virosis que diezman los cultivos de maíz, los primeros estudios desarrollados por Mattio (2011) sugirieron que *Wolbachia* aumenta la eficiencia de transmisión de los agentes etiológicos mencionados. *Wolbachia* podría liberar alguna proteína similar a la simbiosina de los endosimbiontes de pulgones y moscas blancas, que protegería a las partículas virales del ataque de las enzimas presentes en la hemolinfa del insecto, favoreciendo la transmisión de virus (e.g. Morin et al., 1999). Es importante profundizar en la interacción tripartita chicharrita-*Wolbachia*-virus e identificar las cepas que potencian la transmisión del virus y las que lo bloquean, lo que podría conducir a mecanismos de control novedosos.

Pasando al terreno de las enfermedades vectoriales, además de las dolencias mencionadas en estas páginas, existen muchas otras que afectan a los sectores más pobres del planeta, como la leishmaniasis o el mal de Chagas, cuyas prevalencias son importantes en Argentina. ¿Será posible aplicar métodos de control como los discutidos en este trabajo a las poblaciones de los insectos vectores de estas y otras enfermedades?

Son muchas las especies de mosquitos (Osei-Poku et al., 2012), pulgas (e.g. Gorham et al., 2003) y piojos (e.g. Perotti et al., 2004) en las que *Wolbachia* ha sido detectada y en los que se podría utilizar como agente de control a medida que los conocimientos sobre la

biología, el status de infección y la distribución de los vectores se incrementa (e.g. Díaz Nieto et al., 2013a, b). La meta puede ser más o menos fácil de cumplir, dependiendo de la especie hospedadora en cuestión. Por ejemplo, en los vectores asiáticos de la leishmaniasis, *Wolbachia* fue detectada en unas pocas especies, entre las que se cuenta *Phlebotomus papatasi*, y se demostró que induce IC (Benlarbi & Ready, 2003; Parvizi et al., 2003). Sin embargo, la transinfección de individuos no infectados no resultó exitosa debido a la escasa tasa de transmisión maternal (Kassem & Osman, 2007). Por lo tanto, el control de *Phlebotomus* sp. por medio del reemplazo poblacional de *Wolbachia* podría ser inaplicable, aunque la TII en poblaciones no infectadas sería una alternativa. En nuestro continente *Wolbachia* fue descubierta, concomitantemente con *Leishmania naiffi* (que en Sudamérica produce lesiones cutáneas), en dos vectores de la leishmaniasis, los flebotomos *Lutzomyia traxipidoi* y *Lu. gomezi*, en la zona del canal de Panamá (Azpurua et al., 2010). Los patrones de transmisión deberían ser estudiados en estas especies, a fin de decidir la estrategia más adecuada. Además, sería deseable expandir el muestreo a otros países centroamericanos y ciertamente a las zonas afectadas de Sudamérica, a fin de relevar el status y la prevalencia de infección en todas las especies vectoras de esta enfermedad.

En cuanto al mal de Chagas, *Wolbachia* fue detectada en poblaciones panameñas de *Rhodnius pallescens*, uno de los reservorios más importantes de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en esa región (Espino et al., 2009). Otra bacteria muy emparentada con *Arsenophonus* que se mantuvo en una línea celular de *Ae. albopictus* fue descubierta en *Triatoma infestans*, el principal vector del Chagas en Argentina (Hypša & Dale, 1997). Aunque los simbiosiontes bacterianos extracelulares ingeridos durante la coprofagia han resultado ser diseminadores muy eficientes para el esparcimiento de genes exógenos en redúvidos (Durvasula et al., 1997), aún se debe que indagar el potencial de *Wolbachia* en las vinchucas. Ensayar transinfecciones, evaluar fenotipos, conseguir métodos de cría eficientes en el laboratorio... El hallazgo de Espino et al. (2009) abre el camino, aunque todavía hay un largo trecho por recorrer. La vinchuca es muy

diferente del mosquito, organismo en el que se ha trabajado con verdadero ahínco en los últimos años. Conseguir resultados exitosos puede demandar un período de tiempo igual o mayor que el que se ha invertido en la liberación de *Ae. aegypti* transinfectados...

Las cepas de *Wolbachia* varían en forma considerable respecto a la protección viral que conceden a sus hospedadores y a la magnitud de la IC que producen. Estos factores pueden afectar la capacidad de la bacteria para expandirse espacialmente y para bloquear agentes patogénicos. Además, la transfección de la bacteria a especies noveles puede deparar más de una sorpresa. Por ello, la detección de infecciones naturales es importante. Con seguridad, la transferencia de *Wolbachia* desde un hospedador a otro resultará más fácil en términos técnicos si ambos están emparentados. Además, la dinámica de una cierta cepa que se introduce en un insecto puede verse alterada por las cepas ya existentes en esa población.

Aunque para muchas de las alternativas descritas sólo se ha demostrado la factibilidad en términos teóricos, son varias las posibilidades que brinda *Wolbachia* como medio de control amigable con el ambiente, sin olvidar a otros endosimbiontes, ya sean parásitos reproductivos (como *Cardinium* o *Arsenophonus*) o no (como *Sodalis*). Se deberá dedicar un gran esfuerzo por parte de los investigadores a la aplicación de este extraordinario microorganismo en pos del bienestar de este planeta y de quienes lo habitamos.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al comité organizador del VIII Congreso Argentino de Entomología por el apoyo en la organización y realización del simposio "*Wolbachia, una pandemia con posibilidades*", al comité editorial de la Revista de la Sociedad Entomológica Argentina por la invitación para escribir este artículo, a Analía Lanteri por el estímulo para organizar el simposio y para difundir a *Wolbachia* en Argentina, a María Fernanda Mattio, Corina Berón y Claudia Conte por participar en el simposio con entusiasmo y dedicación, a Viviana Confalonieri y Analía Lanteri por haber hecho posible el sueño de investigar a *Wolbachia* en Argentina durante mis estudios de doctorado, postdoctorado y en la

actualidad y por acompañarme en este proceso y a Diego Segura por haber despejado algunas dudas sobre la Técnica del Insecto Estéril.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AKSOY, S., B. WEISS & G. ATTARDO. 2008. Paratransgenesis applied for control of tsetse transmitted sleeping sickness. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 627: 35-48.
- ALAM, U., J. MEDLOCK, C. BRELSFOARD, R. PAIS, C. LOHS, S. BALMAND, J. CARNOGURSKY, A. HEDDI, P. TAKAC, A. GALVANI & S. AKSOY. 2011. *Wolbachia* symbiont infections induce strong cytoplasmic incompatibility in the tsetse fly *Glossina morsitans*. *PLoS Pathogens* 7(12): e1002415.
- ATYAME, C.M., N. PASTEUR, E. DUMAS, P. TORTOSA, M.L. TANTELY, N. POCQUET, S. LICCIARDI, A. BHEECARRY, B. ZUMBO, M. WEILL & O. DURON. 2011. Cytoplasmic incompatibility as a means of controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito in the islands of the south-western Indian Ocean. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e1440. (2011).
- AUGUSTINOS, A.A., D. SANTOS-GARCIA, E. DIONYSOPOULOU, M. MOREIRA, A. PAPAPANAGIOTOU, M. SCARVELAKIS, V. DOUDOUMIS, S. RAMOS, A.F. AGUIAR, P.A.V. BORGES, M. KHADEM, A. LATORRE, G. TSIAMIS & K. BOURTZIS. 2011. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: Is the hidden diversity fully unraveled? *PLoS ONE* 6(12): e28695.
- AZPURUA, J., D. DE LA CRUZ, A. VALDERAMA & D. WINDSOR. 2010. *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4(3): e627.
- BALDO, L., N. LO, & J.H. WERREN. 2005. The mosaic nature of the *Wolbachia* Surface Protein (wsp). *Journal of Bacteriology* 187: 5406-5418.
- BALDO, L., L. PRENDINI, A. CORTHALS & J.H. WERREN. 2007. *Wolbachia* are present in Southern African scorpions and cluster with supergroup F. *Current Microbiology* 55: 367-373.
- BALDO, L. & J.H. WERREN. 2007. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on *wsp*: Spurious lineages and discordance with MLST. *Current Microbiology* 55: 81-87.
- BALTANAS, A., M. ZABAL-AGUIRRE, M. PITA & C. LOPEZ-FERNANDEZ. 2007. *Wolbachia* identified in a new crustacean host: An explanation of the prevalence of asexual reproduction in non-marine ostracods? *Fundamental and Applied Limnology* 169: 217-221.
- BANDI, C., T.J.C. ANDERSON, C. GENCHI & M.L. BLAXTER. 1998. Phylogeny of *Wolbachia*-like bacteria in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 265: 2407-2413.
- BENLARBI, M. & P.D. READY. 2003. Host-specific *Wolbachia* strains in widespread populations of *Phlebotomus perniciosus* and *P. papatasi* (Diptera: Phlebotomidae), and prospects for driving genes into these vectors of *Leishmania*. *Bulletin of Entomological Research* 93(5): 383-391.
- BIAN, G., D. JOSHI, Y. DONG, P. LU, G. ZHOU, X. PAN, Y. XU, G. DIMOPOULOS Z. XI. 2013. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science* 340: 748-751.
- BORDENSTEIN, S.R. 2003. *Wolbachia* and the origin of species. *En: Bourtzis, K. & T.A. Miller (eds.), Insect Symbiosis*, CRC Press, Boca Raton, pp. 283-304.
- BORDENSTEIN, S. & R.B. ROSENGAUS. 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera *Current Microbiology* 51: 393-398.
- BOUCHON, D., T. RIGAUD & P. JUCHAULT. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: Molecular identification and host feminization. *Proceedings*

- of the Royal Society *B-Biological Sciences* 265: 1081-1090.
- BOURTZIS, K., M.M. PETTIGREW & S.L. O'NEILL. 2000. *Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. *Insect Molecular Biology* 9: 635-639.
- BRAIG, H.R., H. GUZMAN, R.B. TESH & S.L. O'NEILL. 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature* 367: 453-455.
- BRAIG, H.R., B.D. TURNER, B.B. NORMARK & R. STOUTHAMER. 2002. Microorganism-induced parthenogenesis. *En: Hughes, R.N. (ed.), Reproductive biology of invertebrates. Volume XI: Progress in asexual reproduction*, Oxford & IBH publishing, New Delhi, pp. 1- 62.
- BREEUWER, J.A.J. & G. JACOBS. 1996. *Wolbachia*: Intracellular manipulators of mite reproduction. *Experimental and Applied Acarology* 20: 421-434.
- BRELSFOARD, C.L. & S.L. DOBSON. 2009. *Wolbachia*-based strategies to control insect pests and disease vectors. *Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 17(3): 55-63.
- BRELSFOARD, C.L., Y. SECHAN & S.L. DOBSON. 2008. Interspecific hybridization yields strategy for South Pacific filariasis vector elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2: e129.
- BROWNLIE, J.C., B.N. CASS, M. RIEGLER, J.J. WITSENBURG, I. ITURBE-ORMAETXE, E.A. MCGRAW & S.L. O'NEILL. 2009. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathogens* 5(4): e1000368.
- BRUCKER, R.M. & S.R. BORDENSTEIN. 2012. Speciation by Symbiosis. *Trends in Ecology and Evolution* 27(8): 443-451.
- CALJON, G., L. DE VOOGHT & J. VAN DEN ABEELE. 2013. Options for the delivery of anti-pathogen molecules in arthropod vectors. *Journal of Invertebrate Pathology* 112: S75-S82.
- CALVITTI, M., R. MORETTI, E. LAMPAZZI, R. BELLINI & S.L. DOBSON. 2010. Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 47: 179-187.
- CHARLAT, S., G.D.D. HURST & H. MERÇOT. 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections *Trends in Genetics* 19(4): 217-223.
- CONTE, C.A.; M.A. PARREÑO, M.L. JURÍ, M.C. MANNINO, F. MILLA, S.B. LANZAVECCHIA, M. BERRETTA, D.F. SEGURA & J.L. CLADERA. 2012. Detección y caracterización de la infección con *Wolbachia* sp en líneas de laboratorio y poblaciones naturales de la Mosca Sudamericana de la Fruta, *Anastrepha fraterculus*. *En: Libro de Actas del VIII Congreso Argentino de Entomología, Bariloche*, p. 180.
- COOK, P.E., C.J. MCMENIMAN & S.L. O'NEILL. 2008. Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 627: 126-140.
- CORDAUX, R., D. BOUCHON & P. GRÈVE. 2011. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics* 27(8): 332-341.
- CORDAUX, R., A. MICHEL-SALZAT & D. BOUCHON. 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: Novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 237-243.
- CORDAUX, R., S. PICHON, H.B.F. HATIRA, V. DOUBLET, P. GRÈVE, I. MARCADÉ, C. BRAQUART-VARNIER, C. SOUTY-GROSSET, F. CHARFI-CHEIKHROUHA & D. BOUCHON. 2012. Widespread *Wolbachia* infection in terrestrial isopods and other crustaceans. *ZooKeys* 176: 123-131.
- CURTIS, C. F. & R. REUBEN. 2007. Destruction in the 1970s of a research unit in India on mosquito control by sterile male release and a warning for the future. *Antenna* 31: 214-216.
- CURTIS, C. F. & R.C. VON BORSTOL. 1978. Allegations against Indian research refuted. *Nature* 273: 96.
- DEDEINE, F., F. VAVRE, F. FLEURY, B. LOPPIN, M.E. HOCHBERG & M. BOULETREAU. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11): 6247-6252.
- DELAUNAY, P., V. BLANC, P. DEL GIUDICE, A. LEVY-BENCHETON, O. CHOSIDOW, P. MARTY & P. BROUQUI. 2011. Bedbugs and infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* 52: 200-210.
- DÍAZ NIETO, L.M., A. MACIÁ, G. PARISI, J.L. FARINA, M.E. VIDAL DOMÍNGUEZ, M.A. PEROTTI & C.M. BERÓN. 2013a. Distribution of mosquitoes in the South East of Argentina and first report on the analysis based on 18S rDNA and COI Sequences. *PLoS ONE* 8(9): e75516.
- DÍAZ NIETO, L.M., A. MACIÁ, M.A. PEROTTI & C.M. BERÓN. 2013b. Geographical limits of the Southeastern distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases* vol. 7(1): e1963.
- DOBSON, S.L. 2003. *Wolbachia pipientis*: Impotent by association. *En: Bourtzis, K. & T.A. Miller (eds.), Insect Symbiosis*, CRC Press, Boca Raton, pp. 199-215.
- DOUDOUMIS, V., U. ALAM, E. AKSOY, A.M.M. ABD-ALLA, G. TSAMIS, C. BRELSFOARD, S. AKSOY, K. BOURTZIS. 2013. Tsetse-*Wolbachia* symbiosis: Comes of age and has great potential for pest and disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* 112: S94-S103.
- DUNNING HOTOPP, J.C., M.E. CLARK, D.C. OLIVEIRA, J.M. FOSTER, P. FISCHER, *et al.* 2007. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* 317: 1753-1756.
- DURON, O., D. BOUCHON, S. BOUTIN, L. BELLAMY, L. ZHOU, J. ENGELSTÄDTER & G.D.D. HURST. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biology* 6: 27.
- DURVASULA, R.V., A. GUMBS, A. PANACKAL, O. KRUGLOV, S. AKSOY, R.B. MERRIFIELD, F.F. RICHARDS & C.B. BEARD. Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 3274-3278.
- ENGELSTÄDTER, J. & G.D.D. HURST. 2009. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 127-149.
- ESPINO, C.I., T. GÓMEZ, G. GONZÁLEZ, M.F. BRAZIL DO SANTOS, J. SOLANO, O. SOUSA, N. MORENO, D. WINDSOR, A. YING, S. VILCHEZ & A. OSUNA. 2009. Detection of *Wolbachia* bacteria in multiple organs and feces of the Triatomine insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). *Applied and Environmental Microbiology* 75(2): 547-550.
- EVANS, O., E.P. CARAGATA, C.J. MCMENIMAN, M. WOOLFIT, D.C. GREEN, C.R. WILLIAMS, C.E. FRANKLIN, S.L. O'NEILL & E.A. MCGRAW. 2009. Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipientis*. *Journal of Experimental Biology* 212: 1436-1441.
- FERREE, P.M., A. AVERY, J. AZPURUA, T. WILKES & J.H. WERREN. 2008. Bacterium blocks centrosome formation to kill males in *Nasonia vitripennis*. *Current Biology* 18: 1409-1414.
- FERRI, E., O. BAIN, M. BARBUTO, C. MARTIN, N. LO, S. UNI, F. LANDMANN, S.G. BACCÉ, R. GUERRERO, S. DE SOUZA LIMA, C. BANDI, S. WANJJI, M. DIAGNE & M. CASIRAGHI. 2011. New insights into the evolution of *Wolbachia* infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. *PLoS ONE* 6: e20843.
- FOSTER, J., M. GANATRA, I. KAMAL, J. WARE, K. MAKAROVA, NATALIA IVANOVA, *et al.* 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology* 3: e121.
- FRANZ, G. 2005. Genetic sexing strains amenable to large scale rearing as required for the sterile insect technique.

- En: Dyck, V.A., J. Hendrichs & A.S. Robinson (eds.), *The Sterile Insect Technique*, Springer, Dordrecht, pp. 427-451.
- FUJII, Y., D. KAGEYAMA, S. HOSHIZAKI, H. ISHIKAWA, & T. SASAKI T. 2001. Transfection of *Wolbachia* in Lepidoptera: The feminizer of the adzuki bean borer *Ostrinia scapulalis* causes male killing in the Mediterranean flour moth *Ephesia kuehniella*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 268: 855-859.
- FYTROU, A., P.G. SCHOFIELD, A.R. KRAAIJEVELD & S.F. HUBBARD. 2006. *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 273: 791-796.
- GHEGIN, E., S. WANG, D. SPIRO, E. CALER, Q. ZHAO, J. CRABTREE, J.E. ALLEN, et al. 2007. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science* 317(5845): 1756-1760.
- GHELELOVITCH, S. 1952. Sur le déterminisme génétique de la stérilité dans le croisement entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris* 24: 2386-2388.
- GORHAM, C.H., Q.Q. FANG & L.A. DURDEN. 2003. *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). *Journal of Parasitology* 89(2): 283-289.
- GRENIER, S., B. PINTUREAU, A. HEDDI, F. LASSABLIÈRE, C. JAGER, C. LOUIS & C. KHATCHADOURIAN. 1998. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 265: 1441-1445.
- GRUWELL, M.E., J. WU & B.B. NORMARK. 2009. Diversity and phylogeny of *Cardinium* (Bacteroidetes) in armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae). *Annals of the Entomological Society of America* 102: 1050-1061.
- GUZMÁN, N.V., A.A. LANTERI & V.A. CONFALONIERI. 2012. Colonization ability of two invasive weevils with different reproductive modes. *Evolutionary Ecology* 26(6): 1371-1390.
- HAEGEMAN, A., B. VANHOLME, J. JACOB, T.T.M. VANDEKERCKHOVE, M. CLAEYS, G. BORGONIE & G. GHEYS-EN. 2009. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: Member of a new *Wolbachia* supergroup. *International Journal of Parasitology* 39: 1045-1054.
- HARRINGTON, L.C., T.W. SCOTT, K. LERDTHUSNEE, R.C. COLEMAN, A. COSTERO, G.G. CLARK, J.J. JONES, S. KITTHAWEE, P. KITTHAYAPONG, R. SITHIPRASASNA & J.D. EDMAN. 2005. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 290-292.
- HATCHER, M.J. 2000. Persistence of selfish genetic elements: Population structure and conflict. *Trends in Ecology and Evolution* 15(7): 271-277.
- HEDGES, L.M. J.C. BROWNLIE, S.L. O'NEILL & K.N. JOHNSON. 2009. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322: 702.
- HERTIG, M. 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipiensis* (gen. et sp.n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology* 28: 453-486.
- HERTIG, M. & S.B. WOLBACH. 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *Journal of Medical Research* 44: 329-374.
- HOFFMANN, A.A., B.L. MONTGOMERY, J. POPOVICI, I. ITURBE-ORMAETXE, P.H. JOHNSON, F. MUZZI, M. GREENFIELD, M. DURKAN, Y.S. LEONG, Y. DONG, H. COOK, J. AXFORD, A.G. CALLAHAN, N. KENNY, C. OMODEI, E.A. MCGRAW, P.A. RYAN, S.A. RITCHIE, M. TURELLI & S.L. O'NEILL. 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* 476: 454-457.
- HOSOKAWA, T., R. KOGA Y. KIKUCHI, X.-Y. MENG & T. FUKATSU. 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 769-774.
- HU, Y. & S. AKSOY. 2005. An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 105-115.
- HUGHES, G.L., A.D. PIKE, P. XUE P. & J.L. RASGON. 2012a. Invasion of *Wolbachia* into *Anopheles* and other insect germlines in an ex vivo organ culture system. *PLoS ONE* 7: e36277.
- HUGHES, G.L., J. VEGA-RODRIGUEZ, P. XUE & RASGON J.L. 2012b. *Wolbachia* strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Applied Environmental Microbiology* 78: 1491-1495.
- HUNTER, M.S., S.J. PERLMAN & S.E. KELLY. 2003. A bacterial symbiont in the *Bacteroidetes* induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270: 2185-2190.
- HURST, G.D.D., C. BANDI, L. SACCHI, A.G. COCHRANE, D. BERTRAND, I. KARACA & M.E.N. MAJERUS. 1999. *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) bears maternally inherited Flavobacteria that kill males only. *Parasitology* 118: 125-134.
- HURST, G.D.D. & F.M. JIGGINS. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272: 1525-1534.
- HURST, L.D. & J.P. RANDERSON. 2002. Parasitic sex pupeteers. *Scientific American* 286(4): 42-47.
- HYPŠA, V. & V.C. DALE. 1997. In vitro culture and phylogenetic analysis of "*Candidatus Arsenophonus triatominarum*", an intracellular bacterium from the Triatomine bug, *Triatoma infestans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47(4): 1140-1144.
- JIGGINS, F.M., G.D.D. HURST & M.E.N. MAJERUS. 2000. Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in butterfly host. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 267: 63-68.
- JIN, C., X. REN X & J.L. RASGON. 2009. The virulent *Wolbachia* strain wMelPop efficiently establishes somatic infections in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3373-3376.
- KAGEYAMA, D., DAISUKE, K., S. NARITA & M. WATANABE. 2012. Insect sex determination manipulated by their endosymbionts: Incidences, mechanisms and implications. *Insects* 3: 161-199.
- KAMBRIS, Z., A.M. BLAGBOROUGH, S.B. PINTO, M.S. BLAGROVE, H.C. GODFRAY, R.E. SINDEN & S.P. SINKINS. 2010. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathogens* 6: e1001143.
- KAMBRIS, Z., P.E. COOK, H.K. PHUC & S.P. SINKINS. 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* 326: 134-136.
- KASSEM, H.A. & G. OSMAN. 2007. Maternal transmission of *Wolbachia* in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 101: 435-440.
- KENT, B.N., L. SALICHOS, J.G. GIBBONS, A. ROKAS, I.L. NEWTON, M.E. CLARK & S.R. BORDENSTEIN. 2011. Complete bacteriophage transfer in a bacterial endosymbiont (*Wolbachia*) determined by targeted genome capture. *Genome Biology and Evolution* 3: 209-218.
- KITTHAYAPONG, P., K. BAISLEY, V. BAIMAI & S.L. O'NEILL. 2000. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 37(3): 340-345.
- LANTERI, A.A., N.V. GUZMÁN, M.G. DEL RÍO & V.A. CONFALONIERI. 2013. Potential geographic distributions and successful invasions of parthenogenetic broad-nosed weevils (Coleoptera: Curculionidae) native to South America. *Environmental Entomology* 42(4): 677-687.
- LAVEN, H. 1951. Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution* 5: 370-375.
- LAVEN, H. 1959. Speciation by cytoplasmic isolation in the

- Culex pipiens* complex. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 24: 166-173.
- LAVEN, H. 1967. Speciation and evolution in *Culex pipiens*. In *Genetics of Insect Vectors of Disease* (Wright J.W. & Pal R., eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 251-75.
- LAWSON, E.T., T.A. MOUSSEAU, R. KLAPER, M.D. HUNTER & J.H. WERREN. 2001. *Rickettsia* associated with male-killing in a puprestid beetle. *Heredity* 86: 497-505.
- LE CLEC'H, W., C.F.D. CHEVALIER, L. GENTY, J. BERTAUX, D. BOUCHON & M. SICARD. 2013. Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. *PLoS ONE* 8: e60232.
- LEPAGE, D. & S.R. BORDENSTEIN. 2013. *Wolbachia*: Can we save lives with a great pandemic? *Trends in Parasitology* 9(8): 385-393.
- LU, P., G. BIAN, X. PAN & Z. & XI. 2012. *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. *PLoS Negl Trop. Dis.* 6: e1754.
- MAJERUS, T.M.O., M.E.N. MAJERUS, B. KNOWLES, J. WHEELER, D. BERTRAND, V.N. VICTOR, H. UENO & G.D.D. HURST. 1998. Extreme variation in the prevalence of inherited male-killing microorganisms between three populations of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Heredity* 81: 683-691.
- MARTIN, G., P. JUCHAULT, O. SOROKINE & A. VAN DORSSELAER. 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *General and Comparative Endocrinology* 80: 349-354.
- MASUI, S., S. KAMODA, T. SASAKI & H. ISHIKAWA. 2000. Distribution and evolution of bacteriophage WO in *Wolbachia*, the endosymbiont causing sexual alterations in arthropods. *Journal Molecular Evolution* 51: 491-497.
- MCGRAW, E.A., D.J. MERRITT, J.N. DROLLER & S.L. O'NEILL. 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2918-2923.
- MCGRAW, E.A. & S.L. O'NEILL. 2013. Beyond insecticides: A new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology* 11(3): 181-193.
- MCMENIMAN, C. J., R.V. LANE, B.N. CASS, A.W.C. FONG, M. SIDHU, Y.-F. WANG, S.L. O'NEILL. 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323: 141-144.
- MEDLOCK, J., K.E. ATKINS, D.N. THOMAS, S. AKSOY & A.P. GALVANI. 2013. Evaluating paratransgenesis as a potential control strategy for African trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(8): e2374.
- MERIWEATHER, M., S. MATTHEWS, R. RIO & R.S. BAUCOM. 2013. A 454 Survey reveals the community composition and core microbiome of the common bed bug (*Cimex lectularius*) across an urban landscape. *PLoS ONE* 8(4): e61465.
- METCALF, J.A. & S.R. BORDENSTEIN. 2012. The complexity of virus systems: The case of endosymbionts. *Current Opinion in Microbiology* 15: 546-552.
- MIN, K.T. & S. BENZER. 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 10792-10796.
- MOREIRA, L.A., I. ITURBE-ORMAETXE, J.A. JEFFERY, G. LU, A.T. PYKE, L.M. HEDGES, B.C. ROCHA, S. HALL-MENDELIN, A. DAY, M. RIEGLER, L.E. HUGO, K.N. JOHNSON, B.H. KAY, E.A. MCGRAW, A.F. VAN DEN HURK, P.A. RYAN & S.L. O'NEILL. 2009a. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139: 1268-1278.
- MOREIRA, L.A., E. SAIG, A.P. TURLEY, J.M. RIBEIRO, S.L. O'NEILL & E.A. MCGRAW. 2009b. Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3: e568.
- MOREIRA, L.A., Y.H. YE, K. TURNER, D.W. EYLES, E.A. MCGRAW & S.L. O'NEILL. 2011. The wMelPop strain of *Wolbachia* interferes with dopamine levels in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors* 4: 28.
- MORIN, S., M. GHANIM, M. ZEIDAN, H.CZOSNEK, M. VERBEEK & J. VAN DEN HEUVEL. 1999. A GroEL homologue from the endosymbiotic bacteria of *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 256: 75-84.
- MOUSSON, L., E. MARTIN, K. ZOUACHE, Y. MADEC, P. MAVINGUI & A.B. FAILLOUX. 2010. *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. *Molecular Ecology* 19: 1953-1964.
- MURPHY, B., C. JANSEN, J. MURRAY & P. DE BARRO. 2010. Risk analysis on the Australian release of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) containing *Wolbachia*. *CSIRO Report*.
- NAG, J.K., N. SHRIVASTAVA, J. GUPTA & S. MISRA-BHATTACHARYA. 2013. Recombinant translation initiation factor-1 of *Wolbachia* is an immunogenic excretory secretory protein that elicits Th2 mediated immune protection against *Brugia malayi*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 36: 25-38.
- NAKANISHI, K., M. HOSHINO, M. NAKAI & Y. KUNIMI. 2008. Novel RNA sequences associated with late male killing in *Homona magnanima*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275: 1249-1254.
- NANTULYA, V.M. & S.K. MOLOO. 1988. Suppression of cyclical development of *Trypanosoma brucei brucei* in *Glossina morsitans centralis* by an anti-procyclics monoclonal antibody. *Acta Tropica* 45: 137-144.
- O'CONNOR, L., C. PLICHART, A.C. SANG, C.L. BRELSFOARD, H.C. BOSSIN & S.L. DOBSON. 2012. Open release of male mosquitoes infected with a *Wolbachia* biopesticide: Field performance and infection containment. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1797.
- OSBORNE, S.E., Y.S. LEONG, S.L. O'NEILL & K.N. JOHNSON. 2009. Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* s strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathogens* 5(11): e1000656.
- OSEI-POKU, J., C. HAN, C.M. MBOGO & F.M. JIGGINS. Identification of *Wolbachia* strains in mosquito disease vectors. *PLoS One* 7: e49922.
- PARVIZI, P., M. BENLARBI & P.D. READY. 2003. Mitochondrial and *Wolbachia* markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi*: Little population differentiation between peridomestic dities and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Medical and Veterinary Entomology* 17(4): 351-362.
- PEROTTI, M.A., S.S. CATALÁ, A. ORMEÑO, M. ZELAZOWSKA, S.M. BILINSKI & H.R. BRAIG. 2004. The sex ratio distortion in the human head louse is conserved over time. *BMC Genetics* 5: 10.
- POPOVICI, J., L.A. MOREIRA, A. POINSIGNON, I. ITURBE-ORMAETXE, D. MCNAUGHTON & S.L. O'NEILL. 2010. Assessing key safety concerns of a *Wolbachia*-based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105(8): 957-964.
- RANCES, E., Y.H. YE, M. WOOLFIT, E.A. MCGRAW & S.L. O'NEILL. 2012. The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated dengue interference. *PLoS Pathogens* 8: e1002548.
- RASGON, J.L. & G.L. HUGHES. 2012. Eliminating barriers to *Wolbachia* germline infection and vertical transmission in *Anopheles gambiae*. *En: Libro de actas de la 7^{ma} Conf. Int. de Wolbachia*, St. Pierre d'Oléron (Francia), p. 124.
- RASGON, J.L., X. REN & M. PETRIDIS. 2006. Can *Anopheles gambiae* be infected with *Wolbachia pipiensis*? Insights from an in vitro system. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7718-7722.
- REUMER, B.M., J.J.M. VAN ALPHEN & K. KRAAIJEVELD. 2011. Occasional males in parthenogenetic populations of *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae): Low *Wolbachia* titer or incomplete coadaptation? *Heredity* 108(3): 341-346.
- RICCI, I., G. CANCRINI, S. GABRIELLI, S. D'AMELIO & G.

- FAVIA. 2002. Searching for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae): Large polymerase chain reaction survey and new identifications. *Journal of Medical Entomology* 39(4): 562-567.
- RODRIGUERO, M.S., V.A. CONFALONIERI, J.V.C. GUEDES & A.A. LANTERI. 2010a. *Wolbachia* infection in the tribe Naupactini: Association between telytokous parthenogenesis and infection status. *Insect Molecular Biology* 18: 599-705.
- RODRIGUERO, M.S., A.A. LANTERI & V.A. CONFALONIERI. 2010b. Mito-nuclear genetic comparison in a *Wolbachia* infected weevil: Insights on reproductive mode, infection age and evolutionary forces shaping genetic variation. *BMC Evolutionary Biology* 10: 340.
- ROS, V.I.D., FLEMING, V.M., E.J. FEIL & J.A.J. BREEUWER. 2009. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology* 75: 1036-1043.
- ROSSI, L. & S. JENNINGS. 2010. Bed bugs: A public health problem in need of a collaborative solution. *Journal of Environmental Health* 72: 34-35.
- ROWLEY, S.M., R.J. RAVEN & E.A. MCGRAW. 2004. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Current Microbiology* 49: 208-214.
- SAINT ANDRÉ, A.V., N.M. BLACKWELL, L.R. HALL, A. HOERAUF, N.W. BRATTIG, L. VOLKMAN, M.J. TAYLOR, L. FORD, A.G. HISE, J.H. LASS, E. DIACONU & E. PEARLMAN. 2002. The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science* 295 (5561): 1892-1895.
- SARAKATSANOU, A., A.D. DIAMANTIDIS, S.A. PAPANASTASIOU, K. BOURTZIS & N.T. PAPADOPOULOS. 2011. Effects of *Wolbachia* on fitness of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 135: 554-563.
- SARIDAKI, A. & K. BOURTZIS. 2009. *Wolbachia*-induced reproductive parasitism and applications. *Entomologia Helvetica* 18: 3-16.
- SCHRAIBER, J.G., A.N. KACZMARCZYK, R. KWOK, M. PARK, R. SILVERSTEIN, F.U. RUTAGANIRA, T. AGGARWAL, M.A. SCHWEMMER, C.L. HOM, R.K. GROSBERG & S.J. SCHREIBER. 2012. Constraints on the use of lifespan-shortening *Wolbachia* to control dengue fever. *Journal of Theoretical Biology* 297: 26-32.
- SIMÕES, P., G. MIALDEA, M. CARIOU, M. BAILLY-BECHET & S. CHARLAT. 2012. *Wolbachia* horizontal transfer. *En: Libro de actas de la 7^{ma} Conf. Int. de Wolbachia*, St. Pierre d'Oléron (Francia), p. 10.
- SINKINS, S.P. & S.L. O'NEILL. 2000. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. *En: Handler, A.M. & A.A. James (eds.), Insect transgenesis. Methods and applications*, CRC Press. Boca Raton, pp. 271-287.
- SIRONI, M., C. BANDI, L. SACCHI, B. DI SACCO, G. DAMIANI & C. GENCHI. 1995. A close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Molecular and Biochemical Parasitology* 74: 223-227.
- SLATKO, B.E., M.J. TAYLOR & J.M. FOSTER. 2010. The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis* 51(1): 55-65.
- STOUTHAMER, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. *En: O'Neill, S.L., A.A. Hoffman & J.H. Werren (eds.), Influential passengers: Inherited microorganisms and invertebrate reproduction*, Oxford University Press, Oxford, pp. 102-124.
- STOUTHAMER, R., J.A.J. BREEUWER & G.D.D. HURST. 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulators of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology* 53: 71-102.
- STOUTHAMER, R. 1993. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga* 38: 3-6.
- STOUTHAMER, R., J.E. RUSSELL, F. VAVRE & L. NUNNEY. 2010. Intragenomic conflict in populations infected by parthenogenesis inducing *Wolbachia* ends with irreversible loss of sexual reproduction. *BMC Evolutionary Biology* 10: 29.
- SUH, E., D.R. MERCER, Y. FU & S.L. DOBSON. 2009. Pathogenicity of life-shortening *Wolbachia* in *Aedes albopictus* after transfer from *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7783-7788.
- TANAKA, K., S. FURUKAWA, N. NIKOH, T. SASAKI & T. FUKATSU. 2009. Complete WO phage sequences reveal their dynamic evolutionary trajectories and putative functional elements required for integration into the *Wolbachia* genome. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5676-5686.
- TAYLOR, M.J., D. VORONIN, K.L. JOHNSTON & L. FORD. 2013. *Wolbachia* filarial interactions. *Cellular Microbiology* 15(4): 520-526.
- TAYLOR, M.J., K. BILO, H.F. CROSS, J.P. ARCHER & A.P. UNDERWOOD. 1999. 16S rDNA phylogeny and ultrastructural characterization of *Wolbachia* intracellular bacteria of the filarial nematodes *Brugia malayi*, *Brugia pahangi*, and *Wuchereria bancrofti*. *Experimental Parasitology* 91: 356-361.
- TEIXEIRA, L., A. FERREIRA & M. ASHBURNER. 2008. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 6, e2.
- TERRY, R.S., J.E. SMITH, R.G. SHARPE, T. RIGAUD, D.T.J. LITTLEWOOD, J.E. IRONSIDE, D. ROLLINSON, D. BOUCHON, C. MACNEIL, J.T.A. DICK & A.M. DUNN. 2004. Widespread vertical transmission and associated host sex-ratio distortion within the eukaryotic phylum *Microspora*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 271(1550): 1783-1789.
- TSAI, K.-H., C.-G. HUANG, L.-C. WANG, Y.-W. Y.-W. YU, W.-J. WU & W.-J. CHEN. 2007. Molecular evidence for the endosymbiont *Wolbachia* in a non-filaroid nematode, *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of Biomedical Science* 14: 607-615.
- TURELLI, M. 2010. Cytoplasmic incompatibility in populations with overlapping generations. *Evolution* 64: 232-241.
- TURLEY, A.P., L.A. MOREIRA, S.L. O'NEILL & E.A. MCGRAW. 2009. *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3: e516.
- VAN DEN HURK, A.F., S. HALL-MENDELIN, A.T. PYKE, F.D. FRENTIU, K. MCELROY, A. DAY, S. HIGGS & S.L. O'NEILL. 2012. Impact of *Wolbachia* on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1892.
- VANCE, S.A. 1996. Morphological and behavioural sex reversal in memethid-infected mayflies. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 263: 907-912.
- VANDEKERCKHOVE, T.T.M., S. WATTEYNE, A. WILLEMS, J.G. SWINGS, J. MERTENS & M. GILLIS. 1999. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiology Letters* 180: 279-286.
- VAVRE, F., F. FLEURY, D. LEPETIT, P. FOUILLET & M. BOULETREAU. 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution* 16(12): 1711-1723.
- WALKER, T., P.H. JOHNSON, L.A. MOREIRA, I. ITURBE-ORMAETXE, F. FRENTIU, C.J. MCMENIMAN, Y.S. LEONG, Y. DONG, A. AXFORD, P. KRISNER, A.L. LLOYD, S.A. RITCHIE, S.L. O'NEILL & A.A. HOFFMANN. 2011. The *wMel* *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476: 450-453.
- WEEKS, A.R., M. TURELLI, W.R. HARCUMBE, K.T. REYNOLDS & A.A. HOFFMANN. 2007. From parasite to mutualist: Rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology* 5:e114.
- WEEKS, A.R., R. VELTEN & R. STOUTHAMER. 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270: 1857-1865.
- WERREN, J.H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of*

RODRIGUERO, M. S. *Wolbachia*, una pandemia con posibilidades

- Entomology* 42: 587-609.
- WERREN, J.H., L. BALDO & M.E. CLARK. 2008. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6: 741-751.
- WERREN, J.H., G.D.D. HURST, W.ZHANG, J.A.J. BREEUWER, R. STOUTHAMER & M.E.N. MAJERUS. 1994. Ricketsial relative associated with male-killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *Journal of Bacteriology* 176: 388-394.
- WERREN, J.H., D. WINDSOR & L.R. GUO. 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 262: 197-204.
- WERREN, J.H., W. ZHANG & L.R. GUO. 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*-reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 261: 55-63.
- WHITE, J.A., S.E. KELLY, S.N. COCKBURN, S.J. PERLMAN, & M.S. HUNTER. 2011. Endosymbiont costs and benefits in a parasitoid infected with both *Wolbachia* and *Cardinium*. *Heredity* 106: 585-591.
- YEN, J.H. & A.R. BARR. 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature* 232: 657-658.
- ZABALOU, S., A. APOSTOLAKI, I. LIVADARAS, G. FRANZ, A.S. ROBINSON, C. SAVAKIS & K. BOURTZIS. 2009. Incompatible insect technique: Incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 132: 232-240.
- ZABALOU, S., M. RIEGLER, M. THEODORAKOPOULOU, C. STAUFFER, C. SAVAKIS & K. BOURTZIS. 2004. *Wolbachia* induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15042-15045.
- ZCHORI-FEIN, E., Y. GOTTLIEB, S.E. KELLY, J.K. BROWN, J.M. WILSON, T.L. KARR & M.S. HUNTER. 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(22): 12555-12560.
- ZCHORI-FEIN, E. & S.J. PERLMAN S.J. 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology* 13: 2009-2016.
- ZÉLÉ, F., A. NICOT, O. DURON & A. RIVERO. 2012. Infection with *Wolbachia* protects mosquitoes against *Plasmodium*-induced mortality in a natural system. *Journal of Evolutionary Biology* 25(7): 1243-1252.
- ZUG, R. & P. HAMMERSTEIN. 2012. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. *PLoS ONE* 7(6): e38544.