

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

HÉLIO PAULO PEREIRA FILHO

**INFECÇÃO POR *Wolbachia* NO GRUPO *Saltans*: UM MECANISMO DE
DISSEMINAÇÃO NOS OVÁRIOS DO HOSPEDEIRO**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

HÉLIO PAULO PEREIRA FILHO

**INFECÇÃO POR *Wolbachia* NO GRUPO *Saltans*: UM MECANISMO DE
DISSEMINAÇÃO NOS OVÁRIOS DO HOSPEDEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Lino Neto

Coorientadora: Karla S. C. Yotoko

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P436i
2021
Pereira Filho, Hélio Paulo, 1968-
Infecção por *Wolbachia* no grupo *saltans*: um mecanismo de disseminação nos ovários do hospedeiro / Hélio Paulo Pereira Filho. – Viçosa, MG, 2021.

1 tese eletrônica (60 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Lino Neto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2021.

Referências bibliográficas: f. 54-60.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.190>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Infecção. 2. *Wolbachia*. 3. Drosophilidae. 4. *Drosophila prosaltans*. 5. *Drosophila sturtevanti*. 6. Transmissão vertical. 7. Transmissão horizontal. 8. Relação hospedeiro-parasito. 9. Simbiontes. 10. Endossimbiontes. 11. Mutualismo. 12. Parasitismo. 13. Microscopia de fluorescência. 14. Microscopia eletrônica. 15. Ovários - Infecções. 16. Óvulo. I. Neto, José Lino, 1959-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 571.9932711

HÉLIO PAULO PEREIRA FILHO

**INFECÇÃO POR *Wolbachia* NO GRUPO *Saltans*: UM MECANISMO DE
DISSEMINAÇÃO NOS OVÁRIOS DO HOSPEDEIRO**

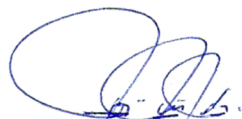
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 08 de setembro de 2021

Assentimento:



Hélio Paulo Pereira Filho
Autor



José Lino Neto
Orientador

À Elenice Silveira Pereira, minha mãe,
com saudade e muito amor.

À Karla Yotoko, minha companheira da vida,
com muito amor.

A ambas sou profundamente agradecido.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de fazer o curso e de crescimento profissional.

Ao Professor José Lino Neto, do Laboratório de Ultraestrutura Celular e à Professora Karla Yotoko, do laboratório de Bioinformática e Evolução - LBE, pela orientação compartilhada, pelo apoio e confiança e pelo exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela convivência harmoniosa entre estudantes, professores e técnicos e pela estrutura que permitiram um ambiente de muito aprendizado e crescimento. Agradeço a todos os professores pela dedicação ao programa e à nossa formação e um agradecimento especial à Elizabeth Alves Pena, nossa secretária, por sua dedicação, eficiência e disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio na realização desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora, presidida pelo Professor José Lino Neto: Anésia Aparecida dos Santos, Glenda Samara Dias Santos, Verônica Saraiva Fialho e Denilson Eduardo Silva Cunha, que muito contribuíram, a partir de uma leitura cuidadosa, na discussão desse trabalho e boas sugestões.

Ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais – CM-UFMG, em especial aos professores Gregory Thomas Kitten e Patricia Massara Martinelli que cuidam tão bem desse centro e aos técnicos Marilene Luzia de Oliveira e Denilson Eduardo Silva Cunha que muito colaboraram com o processamento das amostras e a produção das imagens de microscopia eletrônica de transmissão, fazendo com muita competência e disponibilidade.

Ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG – CAPI-UFMG onde utilizei o microscópio confocal. E aos seus

técnicos, Natália Katley Oliveira, Pedro Henrique da Silva e Samuel Tadeu Rocha pela competência e dedicação.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV – NMM-UFV, em especial aos técnicos Karla Veloso Gonçalves Ribeiro, Gilmar Edilberto Valente, Cristiane do Carmo Cesário e Rosângela Felga de Souza. No NMM-UFV fiz meus primeiros contatos com o ultramicrotomo, com o microscópio confocal e com o microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Professor Jorge Abdala Dergam dos Santos, do Beagle – Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Biologia Animal, da UFV, onde usei o microscópio de fluorescência. Agradeço especialmente às pesquisadoras Marina Souza da Cunha e Natália Martins Travenzoli pela colaboração no uso do microscópio.

Ao Professor Wolfgang Miller, da Universidade Médica de Viena, por ceder as linhagens de *Drosophila* usadas como controle e também por permitir que, durante o inverno europeu de 2018, acompanhasse a pesquisadora Karla Yotoko em seus trabalhos no laboratório, na finalização de seu estágio pós-doutoral, onde aperfeiçoei o contato com o manejo e a criação de *Drosophila*, com o processamento do material para a fluorescência por hibridação DNA-RNA in situ - FISH e com a microscopia de fluorescência e confocal.

Ao Professor Lúcio Antônio de Oliveira Campos e à Professora Anésia Aparecida dos Santos por várias conversas esclarecedoras sobre *Wolbachia*, evolução e as técnicas usadas em meu trabalho.

Às técnicas do DBG/UFV Maura Pinheiro Alves (Laboratório de Ultraestrutura Celular), Renata Cristina Barbosa (Laboratório de Biologia Molecular de Insetos), Sílvia Graziela Torres Miranda (Laboratório de Ecologia) e a técnica do DDE/UFV Verônica Saraiva Fialho (Laboratório de Interações Inseto-Microorganismos) por muito que colaboraram no aporte técnico e boa convivência.

À técnica e aos técnicos da secretaria do DBG/UFV Adriana Maria Rocha Trancoso Santos, Leandro Freitas Silva e Gustavo Paiva Cruz por toda atenção, empenho e boa convivência nesses anos de doutorado.

À pesquisadora Aline Ramos Fregonezi pela colaboração no início de meus trabalhos com às técnicas de extração de DNA e PCR.

À pesquisadora Kamilla Caliman pela convivência, amizade e toda contribuição nas técnicas de extração do DNA e PCR, durante sua iniciação científica no LBE.

Aos colegas que muito contribuíram para o meu trabalho Camila Folly, Glenda Dias e Paulo Henrique Resende (Laboratório de Ultraestrutura Celular); Camilo Guzman e Marina Moreira (LBE) pelo apoio durante a execução dos experimentos e técnicas e por boas trocas de ideias.

Aos colegas Ademária Novais, Jamile Cossolin, Shaiene Maria da Silva, Diego Bolivar e Pedro Neri (Laboratório de Ultraestrutura Celular); Laura Dias, Luísa Dias, Letícia Sena, Nicole Ibagon e Larissa Fajardo (LBE) pela convivência harmoniosa, de muita amizade e aprendizado.

Ao estudante de Ciências Biológicas e desenhista Gleydson Emílio Silva pelos desenhos dos ovários de *Drosophila* que muito enriqueceram essa tese.

Aos colegas da pós, do grupo Bolhas Bordô Zeiss, Alessandra, Amanda, Cláudio, Cleber, Daniel, Filipe, Geise, Ítalo, Larissa, Luciane e Rodrigo, pela amizade e convivência.

Aos colegas, professores e técnicos, do CAp-COLUNI, em especial Átima Clemente Alves Zuanon, Flávia Monteiro Coelho Ferreira, Jildete Karla dos Santos e Luciano Esteves Pelusio, pelos anos de convivência, incentivo e liberação para o treinamento.

Um agradecimento não menos especial aos estudantes do CAp-COLUNI, razão de minha vida profissional, pela convivência e amizade.

E um agradecimento mais do que especial às minhas irmãs, Franci, Márcia, Mara e Solange, ao meu cunhado, In memoriam, Dozinho (Waldor) e aos meus sobrinhos, Sâmiah, Yuri e Renzo, pelo apoio irrestrito e sempre animador.

DECLARAÇÃO COVID-19

Devido à pandemia da doença COVID-19 causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa sofreu atrasos.

Em março de 2020, assim que a doença foi declarada como pandêmica pela OMS, o funcionamento dos laboratórios multiusuários foi suspenso por tempo indeterminado, de forma a cumprir com as medidas emergenciais de restrição e acessibilidade a locais públicos e privados.

No segundo semestre de 2020, iniciou-se a retomada gradativa das atividades, com restrições de horários e pessoal, que perdurou até meados de 2021, e ainda assim, houve avanços significativos na pesquisa, cujos resultados serão apresentados a seguir.

RESUMO

PEREIRA-FILHO, Hélio Paulo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2021. **Infecção por *Wolbachia* no grupo *saltans*: um mecanismo de disseminação nos ovários do hospedeiro.** Orientador: José Lino Neto. Coorientadora: Karla S. C. Yotoko.

Wolbachia, uma Rickettsiales da classe das Alphaproteobacteria, infecta numerosas espécies dos filos Nematoda e Arthropoda. Seu sucesso é atribuído à manipulação da reprodução dos hospedeiros, causando alterações reprodutivas que aumentam o valor adaptativo dos indivíduos infectados. O mutualismo entre *Wolbachia* e artrópodes é um fenômeno incomum e os artrópodes raramente dependem da infecção. Apesar de se propagarem preferencialmente por transferência vertical (da mãe para a prole), há raros registros de paralelismo entre filogenias de wolbachias e hospedeiros artrópodes, indicando que a transferência horizontal (de uma espécie para a outra) é mais frequente do que se imaginava. Estudos envolvendo a interação *Wolbachia*-artrópodes sugerem que em alguns casos a infecção beneficia e em outros prejudica os hospedeiros. No grupo neotropical denominado *Drosophila saltans*, foi constatado que três espécies hospedam *Wolbachia*. Nas espécies crípticas *Drosophila prosaltans* e *D. septentrionsaltans* (subgrupo *saltans*), foram encontradas cepas próximas da bactéria, enquanto uma terceira espécie, *D. sturtevantii* (subgrupo *sturtevantii*), hospeda uma cepa completamente diferente, idêntica àquela encontrada em espécies do gênero *Lutomyia* (Diptera: Psychodidae), de modo que se acredita num evento recente de transmissão horizontal de *Wolbachia*. Este trabalho teve como objetivo investigar as consequências da infecção por *Wolbachia* na produção de óvulos em *D. sturtevantii* (linhagem St8) e *D. prosaltans* (linhagem Pro101), bem como descrever a estratégia de infecção em seus ovários. Os resultados sugerem que *Wolbachia* reduz a produção de óvulos maduros em St8 e aumenta em Pro101. Vimos também, por PCR semi-quantitativa, que em Pro101 a intensidade de infecção é maior no auge da fase reprodutiva da fêmea, quando produz mais óvulos, enquanto em St8 permanece constante, sugerindo que em Pro101 a infecção esteja mais restrita aos ovários que em St8. Os resultados com fluorescência por hibridação DNA-RNA in situ (FISH) sugerem alta incidência da bactéria no germário (parte inicial dos ovariolos) em ambas as linhagens. Em St8, a microscopia eletrônica de transmissão (MET)

mostrou, dentro dos germários, estruturas semelhantes a bacteriócitos, comumente utilizados por simbioses para a colonização dos ovários de insetos e associados a mutualismos nutricionais, densamente ocupados por *Wolbachia*. Bacteriócitos têm como função proteger o hospedeiro da alta proliferação de endossimbiontes e proteger os endossimbiontes do sistema de defesa do hospedeiro. Essa dupla função garante a infecção dos ovócitos, ou seja, a passagem dos endossimbiontes para a próxima geração, favorecendo os hospedeiros nas interações mutualísticas. A cepa infectante de St8, no entanto, parece utilizar bacteriócitos para atingir as células germinativas sem oferecer qualquer benefício, uma estratégia que pode ser geral entre as *Wolbachia*, permitindo que invadam novas espécies de insetos. Esta estratégia, se confirmada como geral, explicaria *i.* a grande variedade de insetos infectados; *ii.* o fato de que nem todas as espécies e populações estejam infectadas, já que a bactéria pode se extinguir rapidamente das populações; *iii.* a raridade das interações mutualísticas e *iv.* a falta de paralelismo nos estudos filogenéticos.

Palavras-chave: Estratégia de infecção. Drosofilídeos neotropicais. Transferência vertical e horizontal. Bacteriócito.

ABSTRACT

PEREIRA-FILHO, Hélio Paulo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September 2021. ***Wolbachia* infection in the *Saltans* group: a mechanism of dissemination in the host ovaries.** Advisor: José Lino Neto. Co-advisor: Karla S. C. Yotoko.

Wolbachia, a Rickettsiales of the class Alphaproteobacteria, infects numerous species of the phylum Nematoda and Arthropoda. Its success is attributed to manipulating host reproduction, causing reproductive changes that increase the fitness of infected individuals. Mutualism between *Wolbachia* and arthropods is an uncommon phenomenon, and arthropods are rarely dependent on infection. Although they spread preferentially by vertical transfer (from mother to offspring), there are rare records of parallelism between phylogenies of *Wolbachia* and arthropod hosts, indicating that horizontal transfer (from one species to another) is more frequent than previously thought. Studies involving *Wolbachia*-arthropod interaction suggest that in some cases, the infection benefits and in others harms the hosts. In the neotropical group called *Drosophila saltans*, populations of three distinct species host *Wolbachia*. The cryptic species *Drosophila prosaltans* and *D. septentriosaltans* (subgroup *saltans*) harbor close strains of the bacterium. In its turn, *D. sturtevantii* (subgroup *sturtevantii*) hosts an entirely different strain, identical to that found in species of the genus *Lutomyia* (Diptera: Psychodidae), so that specialists believe in a recent event of horizontal transmission of *Wolbachia*. This work aimed to investigate the consequences of *Wolbachia* infection on egg production in *D. sturtevantii* (strain St8) and *D. prosaltans* (strain Pro101) and describe the infection strategy in their ovaries. The results suggested that *Wolbachia* reduces mature egg production in St8 and increases it in Pro101. We also saw, by semi-quantitative PCR, that in Pro101, the infection intensity is higher at the peak of the female's reproductive phase when she produces more eggs. At the same time, in St8, it remains constant, suggesting that in Pro101, the infection is more restricted to the ovaries than in St8. Results with fluorescence by DNA-RNA in situ hybridization (FISH) suggest a high incidence of the bacterium in the germarium (initial part of the ovaries) in both strains. In St8, transmission electron microscopy (TEM) showed, within the germaria, bacteriocyte-

like structures, commonly used by symbionts for colonization of insect ovaries and associated with nutritional mutualisms, densely occupied by *Wolbachia*. Bacteriocytes usually protect the host from endosymbionts' high proliferation while protecting endosymbionts from the host defense system. This dual function ensures the infection of the oocytes, *i.e.*, the passage of the endosymbionts to the next generation, favoring the hosts in mutualistic interactions. The infecting St8 strain, however, appears to use bacteriocytes to reach germ cells without providing any benefit. This strategy may be general among *Wolbachia*, allowing them to invade new insect species. If confirmed as general, this strategy would explain *i.* the wide variety of infected insects.; *ii.* the fact that not all species and populations are infected, as the bacterium can quickly die out from populations; and *iii.* the rarity of mutualistic interactions; and *iv.* the lack of parallelism in phylogenetic studies.

Keywords: Infection strategy. Neotropical drosophilids. Vertical and horizontal transfer. Bacteriocyte.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>Wolbachia</i>	13
1.2. O grupo <i>Drosophila saltans</i>	17
1.3. Interação <i>Wolbachia-Drosophila saltans</i>	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS:	21
2.1. Linhagens utilizadas	21
2.2. Extração de DNA	21
2.3. PCR.....	21
2.4. Tratamento com Antibióticos.....	22
2.5. Determinação da idade dos espécimes.....	23
2.6. Contagem de ovos	23
2.7. PCR Semi-quantitativa	24
2.8. Análises estatísticas	27
2.9. Distribuição de <i>Wolbachia</i> nos ovários - FISH	27
2.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	28
3. RESULTADOS	29
3.1. Contagem de ovos	29
3.2. PCR Semiquantitativa	30
3.3. Visualizando a infecção nos ovaríolos.....	32
3.4. Visualizando <i>Wolbachia</i> nas células dos ovaríolos	33
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÕES	50
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	51
7. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Wolbachia*

Bactérias do gênero *Wolbachia* (Rickettsiales: Alphaproteobacteria) são endossimbiontes intracelulares obrigatórios de herança matrilinear que infectam nematoides e artrópodes, compondo a maior pandemia do planeta (WERREN *et al.*, 2008). Estes autores sugeriram que a maioria dos insetos estejam infectados por essa bactéria, que manipula a reprodução de seus hospedeiros causando, entre outras coisas, alterações reprodutivas, como incompatibilidade citoplasmática, morte de embriões machos, indução de partenogênese e feminização de machos genéticos. Quando presentes, estas alterações resultam no aumento do valor adaptativo das fêmeas infectadas em relação às não infectadas, fazendo com que a infecção se espalhe muito rapidamente pela população de hospedeiros.

Sabe-se que as diferentes cepas de *Wolbachia* podem atuar como parasitas em um extremo e como mutualistas metabólicos no outro (HOSOKAWA *et al.*, 2010; NIKOH *et al.*, 2014). Existem ainda as cepas que protegem seus hospedeiros do ataque de vírus (TEIXEIRA *et al.*, 2008, HEDGES *et al.*, 2008, OSBORNE *et al.*, 2009, GLASER & MEOLA, 2010, CHROSTEK *et al.*, 2013; PIMENTEL *et al.*, 2021). Essa característica que vem sendo amplamente utilizada como método de controle de insetos vetores de doenças contagiosas em humanos como Dengue, Zika e Chicungunya (FORD *et al.*, 2019). Mosquitos experimentalmente infectados com *Wolbachia* aumentaram suas respostas imunológicas e ficaram protegidos contra vários patógenos, incluindo vírus, outras bactérias, *Plasmodium* e nematoides filariais (WONG *et al.*, 2011). Estes últimos autores sugeriram que o estudo da relação *Drosophila/Wolbachia* é um modelo promissor para entender interações entre patógenos e o sistema de defesa de insetos.

Como ocorre com outros simbiotes, as infecções por *Wolbachia* podem ser obrigatórias (NEWTON & RICE, 2020; ZUG & HAMMERSTEIN, 2015), o que ocorre quando a sobrevivência do hospedeiro depende da presença da bactéria; ou facultativas, nas quais a bactéria pode aumentar ou reduzir o valor adaptativo de seus hospedeiros (HIMLER *et al.*, 2011; JIGGINS & HURST, 2011). Em geral, o tempo de relação tende a estar relacionado ao tipo de interação, de modo que endossimbiontes obrigatórios devem ter compartilhado uma longa história evolutiva com seus

hospedeiros (BUCHNER, 1965), enquanto os facultativos devem ter se associado mais recentemente (LI *et al.*, 2017). Bactérias do gênero *Wolbachia* são predominantemente transmitidas verticalmente (das mães para a prole), mas o fato de hospedeiros filogeneticamente distantes estarem infectados por cepas semelhantes da bactéria sugere que há transmissões horizontais entre espécies (SCHILTHUIZEN & STOUTHAMER, 1997; GERTH *et al.*, 2013; BROWN & LLOYD, 2015).

Grande parte dos estudos que abordam a interação *Wolbachia*-hospedeiro envolvem a detecção da bactéria através de métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos (primers) específicos. Genes como o rRNA 16S (WERREN *et al.* 1995), o *wsp* (ZHOU *et al.*, 1998) e o ARM (SCHNEIDER *et al.*, 2014) são frequentemente utilizados para a detecção de *Wolbachia* no DNA total extraído do hospedeiro. A comparação das sequências obtidas com sequências depositadas em bancos de dados como o GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) permite a identificação da linhagem que infecta um determinado hospedeiro e a inferência das relações filogenéticas entre diferentes linhagens (GERTH *et al.*, 2013). A partir disso, é possível avaliar se espécies filogeneticamente próximas hospedam cepas de *Wolbachia* similares, o que pode indicar uma relação antiga entre bactérias e hospedeiros. De forma análoga, espécies próximas hospedando cepas distintas de *Wolbachia* são evidências de transmissão horizontal recente, compreendida como evento que ocorreu depois da diversificação dos hospedeiros.

No entanto, a detecção molecular tem falhas, uma delas decorre da baixa densidade de *Wolbachia* em alguns hospedeiros, gerando falsos negativos (ARTHOFER *et al.*, 2009; SCHNEIDER *et al.*, 2014). Outra possibilidade é que uma determinada espécie tenha sido infectada por *Wolbachia* no passado, mas a bactéria não esteja mais presente e tenha deixado fragmentos relictuais no genoma do hospedeiro (DUNNING HOTOPPET *et al.*, 2007, MORROW *et al.*, 2015), de modo que a detecção via PCR pode gerar um falso positivo, pois o gene está presente e é amplificado mesmo na ausência da bactéria.

Diante disso, a confirmação de infecção por *Wolbachia* requer a visualização da bactéria no corpo do hospedeiro. Sabe-se que essas bactérias se alojam e se reproduzem nos órgãos reprodutivos, principalmente de fêmeas, garantindo que

sejam transmitidas verticalmente para a prole. Com isso, sempre que a bactéria é detectada por métodos moleculares, é conveniente verificar sua presença nos ovários, a fim de confirmar a presença de *Wolbachia*, e não apenas de genes relictuais.

Estudos envolvendo Fluorescência por Hibridação DNA-RNA in situ - FISH evidenciaram a presença da *Wolbachia* e ajudaram a compreender o tropismo da bactéria para os órgãos reprodutivos. Frydman *et al.* (2006) e Toomey *et al.* (2013), utilizando o FISH, mostraram como *Wolbachia* invade os ovários de *Drosophila* e como se distribuem nas células do hospedeiro de modo a garantir sua presença nos ovócitos, o que garante a passagem para a próxima geração.

Drosófilas possuem dois ovários (**Fig. 1A**), cada um com 16 a 20 ovaríolos (**Fig. 1B**), os quais são compostos por uma série de subdivisões chamadas câmaras ovarianas, de tamanhos progressivamente maiores (**Fig. 1C**). Essas câmaras são revestidas por um epitélio folicular contendo um ovócito e 15 células nutridoras no interior, interconectadas por pontes citoplasmáticas intercelulares que são o resultado de citocinese incompleta. O tecido ovariano tem origem mesodérmica sendo as células foliculares derivadas do nicho de células somáticas do germário e as células nutridoras e o ovócito são derivadas do nicho células germinativas também do germário. Por fora do epitélio folicular, existe uma lâmina de tecido conjuntivo frouxo denominada túnica própria que contém fibras musculares esparsas.

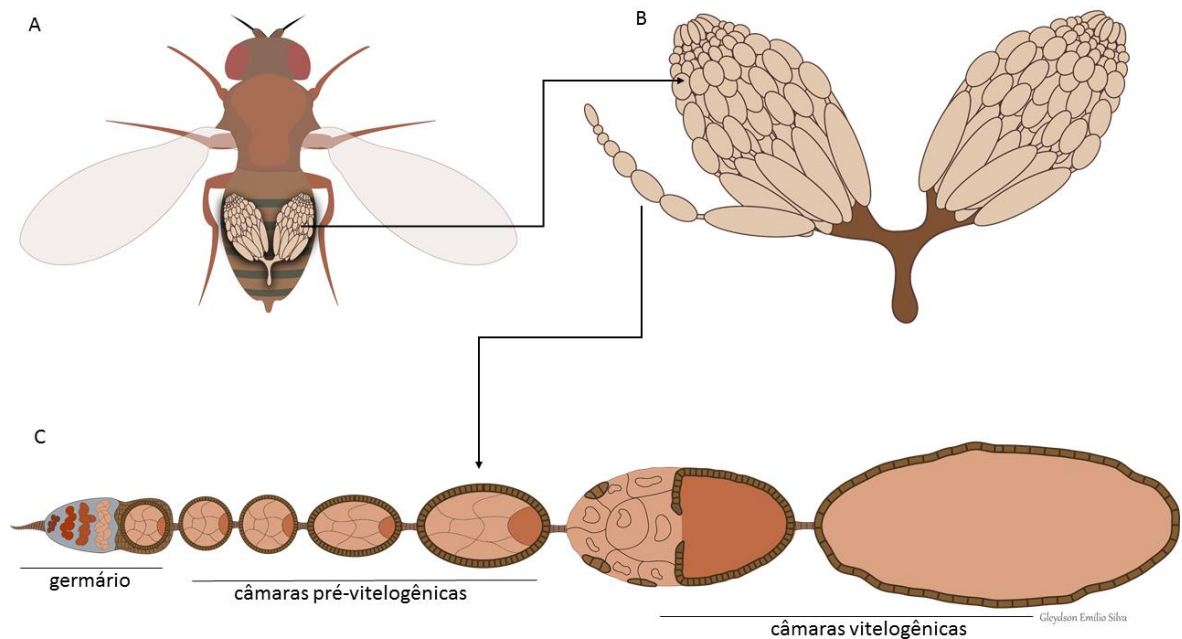


Figura 1. Esquema do aparelho reprodutor feminino de drosófilas (A) evidenciando os ovários (B) e seus ovários (C) contendo vários estágios ou regiões de desenvolvimento, iniciando no germário, passando pelas câmaras pré-vitelogênicas e, então, às câmaras vitelogênicas.

King *et al.* (1970) dividiram as etapas da ovogênese a partir do germário em 14 câmaras ou estágios, distribuídas em três regiões que se seguem: região pré-vitelogênica, formada pela primeira câmara ovariana a deixar o germário e as seis seguintes, a região vitelogênica, formada pelas câmaras de oito a 10, e região de maturação do óvulo formada pelas câmaras 11 a 14. Cada ovário contém câmaras de todas as regiões de desenvolvimento, não obrigatoriamente as 14 câmaras. O germário é composto de um nicho de células-tronco germinativas envolvido por células-tronco somáticas. O germário dá origem à primeira câmara pré-vitelogênica, composta por 16 células: o ovócito e 15 células nutridoras, revestida pelo epitélio folicular. Nas câmaras vitelogênicas, o ovócito já se encontra hipertrófico e rico em vitelo; as células nutridoras estão em processo de degeneração e o epitélio folicular apresenta células colunares. Na região de maturação do óvulo, este está em desenvolvimento formando a casca e os apêndices dorsais

Wright *et al.* (1978) descreveram a ultraestrutura de *Wolbachia* em ovários de *Culex pipiens*. Mais tarde, Wright & Barr (1980) o fizeram em várias espécies do

gênero *Aedes*. Louis & Nigro (1988) iniciaram este tipo de estudo em *Drosophila simulans*. Min & Benzer (1997) estudaram *Wolbachia* em vários tecidos de *D. melanogaster*, inclusive os ovários, utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (MET). A partir do final dos anos 1990, vários pesquisadores utilizaram a MET para estudar *Wolbachia* e sua relação com a célula hospedeira, como os trabalhos de: Szklarzewicz & Moskal (2001); Gottlieb *et al.* (2008); Zhuchova *et al.* (2008); Sachi *et al.* (2010); Strunov & Kiseleva (2014); Michalik, *et al.* (2016); Li *et al.* (2017). Miller *et al.* (2010) utilizaram a MET em seus estudos envolvendo machos de *D. paulistorum*, um drosofilídeo neotropical do grupo *Drosophila willistoni*, também estudado por Strunov *et al.* (2017), revelando que *Wolbachia* está restrita a determinadas áreas cerebrais nessa espécie, em células que se assemelham morfológicamente a bacteriócitos.

De fato, a visualização da bactéria por meio da MET pode ajudar a compreender a interação do endossimbionte com diversas organelas e estruturas da célula, tais como retículos endoplasmáticos, complexo de Golgi, mitocôndrias e envoltório nuclear. Deehan *et al.* (2021), mostraram que para combater a infecção por bactérias patogênicas, a célula inicia o processo de autofagia, que é cooptado por algumas Rickettsiales, através de diversos mecanismos que evitam o reconhecimento dessas bactérias e culminam com a manipulação da via autofágica e, conseqüentemente, da célula hospedeira.

1.2. O grupo *Drosophila saltans*

Estudos em genética de populações no Brasil se iniciaram graças às repetidas visitas do Prof. Theodosios Dobzhansky para estudar grupos neotropicais de *Drosophila*, especialmente as pertencentes aos grupos *Drosophila willistoni* e *Drosophila saltans*. No grupo *saltans*, duas espécies se destacaram nos estudos de Dobzhansky: *D. sturtevantii* e *D. prosaltans*, já que ambas foram coletadas em todas as regiões amostradas (MONTE SIÃO & MARTINS, 2020). Coletas feitas na região neotropical tipicamente resultam na amostragem de grandes quantidades de indivíduos de *D. sturtevantii*, de modo que foram consideradas como o drosofilídeo mais abundante dos neotrópicos (DOBZHANSKY & PAVAN, 1950; GOTTSCHALK *et al.*, 2007; DA MATA *et al.*, 2008; CHAVES *et al.*, 2008). Já *D. prosaltans*, apesar de comum, sempre foi

coletada em pequenas quantidades, o que promoveu a diferenciação genética das populações locais e levou os pesquisadores a considerá-la um complexo de espécies que contêm diferentes linhagens que foram utilizadas em cruzamentos para estudar mecanismos pré-cópula de isolamento reprodutivo (DOBZHANSKY & STREISINGER, 1944; HOENIGSBERG & SANTIBAÑES, 1950, MAGALHÃES & BJÖRNBERG, 1957, MAGALHÃES, 1962; BICUDO, 1973).

1.3. Interação *Wolbachia-Drosophila saltans*

Mais recentemente, Miller & Riegler (2006), estudando as relações entre as *Wolbachia* que infectam drosófilas neotropicais, verificaram que *D. sturtevantii* e *D. prosaltans* hospedam cepas distintas de *Wolbachia*. Enquanto *D. prosaltans* é infectada por cepas filogeneticamente próximas àquelas que infectam outra espécie do grupo (*D. septentriosaltans*), além de outras drosófilas neotropicais, *D. sturtevantii* hospeda cepas distantes (MATEOS *et al.*, 2006), idênticas às encontradas em *Lutzomyia shannoni* e *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) (ONO *et al.*, 2001). A partir de seus resultados, Miller & Riegler (2006) sugeriram que *D. prosaltans* e *D. septentriosaltans*, ambas pertencentes ao subgrupo *saltans* que é formado por sete espécies crípticas (MAGALHÃES, 1962), teriam herdado a bactéria de um ancestral comum. Por sua vez, *D. sturtevantii*, pertencente ao subgrupo *sturtevantii*, teria adquirido a infecção mais recentemente, a partir de um suposto evento de transmissão horizontal.

A partir de 2015, nosso grupo de trabalho do Laboratório de Bioinformática e Evolução, comandado pela profa. Karla Yotoko, do Departamento de Biologia Geral da UFV, vem investindo em estudos envolvendo a interação entre *Wolbachia* e espécies do grupo *saltans*. Conforme o esperado pelo histórico de coletas no Brasil, nosso grupo obteve sucesso na coleta de espécimes de *D. sturtevantii* e *D. prosaltans* na região da Zona da Mata mineira. De todas as linhagens isofêmea (linhagens obtidas a partir de uma única fêmea infectada coletada no campo) mantidas no laboratório, destacam-se uma linhagem de *Drosophila sturtevantii* (St8) e uma de *D. prosaltans* (Pro101), coletadas entre 2015 e 2016 na Mata da Biologia (UFV), que foram submetidas a cruzamentos envolvendo indivíduos infectados e tratados com antibióticos para avaliar o impacto da infecção por *Wolbachia* na reprodução. O

estado da infecção foi aferido, em ambos os casos, através da detecção por PCR com primers para o gene *wsp*, específico de *Wolbachia* (ZHOU *et al.*, 1998). O PCR de indivíduos infectados resulta na visualização da banda específica de tamanho esperado e o de indivíduos tratados com antibióticos não apresenta nenhuma banda (GUZMAN *et al.* em preparação; MOREIRA *et al.*, em preparação).

Guzman *et al.* (em preparação) mostraram que a infecção em Pro101 não provoca nenhum dos fenótipos reprodutivos comumente vistos nas interações *Wolbachia*-hospedeiro, como a incompatibilidade citoplasmática ou a feminização da prole; mas aumenta o valor adaptativo de fêmeas infectadas, que são mais férteis e produzem mais prole que as não infectadas. Os autores encontraram ainda que as fêmeas infectadas foram mais inseminadas quando cruzadas com machos também infectados do que quando cruzadas com machos tratados, levando os autores a concluir que a infecção perturba o sistema de reconhecimento das fêmeas, fazendo com que não reconheçam machos tratados da mesma espécie como potenciais parceiros sexuais, outro fenótipo frequentemente associado à infecção por *Wolbachia*, também observado por Koukou *et al.* (2006) e Schneider *et al.* (2019). Na contramão dessa preferência, fêmeas infectadas produziram mais descendentes com machos tratados que com machos infectados. Tal resultado foi interpretado como uma possível estratégia de aumento da prevalência da infecção a partir da imigração de uma ou poucas fêmeas infectadas, conforme anteriormente descrito por Fry *et al.*, (2004). Uma vez que a disseminação de *Wolbachia* se dá de maneira vertical (das mães para os filhos), quando a disponibilidade de machos infectados é pequena ou nula, a prevalência da infecção aumenta exponencialmente em função do valor adaptativo aumentado do casal fêmea infectada x macho não infectado.

O estudo envolvendo *D. sturtevanti* revelou que todos os indivíduos coletados entre 2015 e 2016 na Mata da Biologia da UFV estavam infectadas por *Wolbachia* (MOREIRA *et al.*, em preparação), levando ao questionamento de que, também em St8, *Wolbachia* acarretasse alguma vantagem adaptativa às fêmeas infectadas. No entanto, os resultados dos cruzamentos revelaram que a infecção, em vez de aumentar, reduz o valor adaptativo dos hospedeiros. Os autores verificaram que a cepa infectante de St8 também não produz fenótipos reprodutivos. Mais que isso, fêmeas de St8 infectadas ovipõem menos e produzem menos larvas quando comparadas às fêmeas tratadas. A infecção também retarda o desenvolvimento,

fazendo com que as larvas infectadas demorem mais tempo para empupar que as tratadas. O resultado mostrou, portanto, que a prevalência era alta apesar dos prejuízos causados pela bactéria, como uma doença que se alastra em uma população. Uma coleta posterior, feita em 2019, mostrou que a prevalência caiu de 100 para 50 %, de modo que a próxima pergunta a ser respondida em termos de acompanhamento dessa população é se a prevalência vai diminuir ainda mais até eliminar a infecção ou se oscila com o tempo. Segundo a caracterização da infecção feita via sequenciamento do gene *wsp*, todas as fêmeas coletadas, de 2015 a 2019, hospedavam a mesma cepa de *Wolbachia*.

Os trabalhos anteriores feitos com base em St8 e Pro101 testaram as diferenças entre indivíduos selvagens e tratados com antibióticos, partindo do pressuposto de que as principais consequências fenotípicas se deram pela eliminação ou redução da infecção por *Wolbachia*. Diante disso, resta saber se as diferenças observadas se devem de fato à infecção ou apenas ao tratamento com antibióticos, que pode ter eliminado outras bactérias ou provocado desarranjos na fisiologia das hospedeiras (LI *et al.*, 2014). No presente trabalho, nos propusemos a *i.* comparar os efeitos da infecção (ou do tratamento) nas duas linhagens utilizando uma única metodologia: a contagem de óvulos maduros nos ovários de St8 e Pro101 de fêmeas infectadas e tratadas com antibióticos. Além disso, utilizamos uma metodologia de PCR semi-quantitativa para *ii.* inferir se a quantidade de bactérias se altera com a idade da fêmea e com isso inferir se *Wolbachia* se reproduz ativamente nos hospedeiros. Utilizamos a microscopia de fluorescência para *iii.* averiguar a distribuição da bactéria nos ovariolos, utilizando para isso o FISH. Finalmente, utilizamos MET para *iv.* Determinar se o endossimbionte responsável pelas modificações de fenótipo em St8 possui seus três envoltórios, ou seja, as duas membranas características de *Wolbachia*, uma bactéria Gran-negativa, e o vacúolo fagocítico, ou fagossomo, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira e *v.* visualizar a distribuição e densidade da bactéria em células de distintas regiões dos ovariolos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1. Linhagens utilizadas

Para investigar detalhes da infecção de *D. sturtevanti* e *D. prosaltans* por *Wolbachia*, utilizamos duas linhagens dessas espécies: St8 e Pro101, ambas coletadas na Mata da Biologia (UFV) nos verões de 2015 e 2016. Resultados anteriores mostraram que as duas linhagens estavam naturalmente infectadas por *Wolbachia* (inferência por PCR, **seção 2.3**). As duas linhagens vêm sendo mantidas desde a coleta em câmara BOD a 23 °C, com fotoperíodo de 12h com luz e 12h de escuridão em meio de cultura. Cada 100 ml de meio contém 13,8 g de banana, 3 g de farinha de cevada, 9,5 g de xarope de glicose, 3,8 g de extrato de levedura, 0,6 g de agar-agar e 0,22 g de Nipagin.

2.2. Extração de DNA

A extração do DNA foi feita apenas em fêmeas com idade conhecida (**seção 2.5**). Para a extração, os adultos foram anestesiados com CO₂, armazenados em etanol 100 % e mantidos em geladeira até o momento da extração. O DNA total foi extraído de cada fêmea com o kit de extração Wizard Genomic (Promega A1120), segundo as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA obtido de cada amostra foi quantificado por meio de espectrofotometria de UV (NanoDrop), e diluído de modo que todos tivessem a mesma concentração final (100 ng/ µl), etapa fundamental para proceder a PCR Semi-quantitativa (**seção 2.7**).

2.3. PCR

Para aferir o status de infecção por *Wolbachia*, fizemos reações de PCR com o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega) com iniciadores específicos para esta bactéria, que amplificam o gene *wsp* (*Wolbachia surface protein*) - *wsp_F1* 5' GTC CAATARSTGATGARGAAAC 3' e *wsp_R1* 5' CYGCACCAAYAGYRCTR TAAA 3' (ZHOU *et al.*, 1998), que geram um fragmento de aproximadamente 600 pares de bases. Utilizamos o protocolo padrão, disponível no *Public databases for molecular*

typing and microbial genome diversity (<https://pubmlst.org/organisms/wolbachia-spp/protocol-single-infected>) específico para *Wolbachia*. As reações foram realizadas no termociclador Bioer (LifePro, modelo TC 96/G/H(b)A). Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1,5 % em um transluminador UV. As amostras migraram em tampão Tris-Borato EDTA - TBE 1X a 90 V por 1 h e 15 min. Os poços do gel foram preenchidos com 2 µL de reação de PCR e 2 µL de GelRed (Sigma Aldrich) + água. A presença da banda esperada de 600 pb foi interpretada como evidência da infecção em alta titulação, enquanto sua ausência foi interpretada como ausência da infecção ou como infecção em níveis não detectáveis por PCR. Como controle positivo, utilizamos o DNA de uma linhagem de *Drosophila* reconhecidamente infectada, *D. willistoni* (JS 6.3 - Reserva Biológica Jatun Sacha, Tena, Equador, 1997). Para os controles negativos, utilizamos a linhagem (D. mel 1118 de *D. melanogaster* - Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana, USA white mutant), reconhecidamente não infectada; uma reação de extração sem mosca, apenas água (branco da extração) e uma reação de PCR sem DNA, com água novamente (branco do PCR). As duas linhagens-controle foram gentilmente cedidas pelo Dr. Wolfgang Miller, Universidade Médica de Viena.

2.4. Tratamento com Antibióticos

Para compreender os efeitos da infecção, foi necessário tratar as linhagens St8 e Pro101, naturalmente infectadas, com antibióticos, de modo a comparar os efeitos da infecção em um mesmo *background* genético. Testes preliminares revelaram que Pro101 respondeu ao tratamento com Tetraciclina, enquanto St8 respondeu ao tratamento com Rifampicina, o que significa que as linhagens se recuperaram mais rapidamente a um ou outro tratamento.

A linhagem Pro101 foi dividida em duas linhagens, que de agora em diante serão chamadas de Pw+ e Ptet. A primeira foi mantida infectada e a segunda foi submetida ao tratamento com tetraciclina (0,03 g / 100 ml), adicionada ao meio de cultura (LI *et al.*, 2014). Para tanto, as fêmeas foram colocadas para ovipor no meio com o antibiótico. As larvas se desenvolveram e os poucos adultos produzidos foram transferidos para um novo meio de cultura, ainda com antibióticos. O tratamento foi

repetido por quatro gerações. Os adultos da quinta geração foram então transferidos para tubos contendo meio de cultura sem antibióticos e mantidos nesse ambiente para ovipor. A linhagem foi mantida em meio sem antibióticos por mais cinco gerações e depois testada com a reação de PCR descrita na **seção 2.3** para verificar se houve a redução da infecção a níveis não detectáveis. A partir de então, foi utilizada em cruzamentos e outras avaliações. Essas gerações em meio de cultura sem antibióticos são essenciais para mitigar os efeitos da redução da viabilidade dos espermatozoides dos machos tratados (ZHE & ZHE, 1996) e da redução na produção de progênie em geral observada na quinta geração de tratamento (POINSOT & MERÇOT, 1997).

A linhagem St8 foi tratada com a mesma metodologia, com exceção do antibiótico adicionado ao meio de cultura, que foi a Rifampicina (0,01 g / 100 ml). A partir do tratamento, as linhagens foram identificadas como Stw+ e StR.

2.5. Determinação da idade dos espécimes

Para comparar os efeitos da infecção em fêmeas de diferentes idades, monitoramos diariamente (a cada 24 h) os tubos de criação contendo larvas e pupas das quatro linhagens em estudo (Stw+, StR, Pw+ e Ptet) em busca de adultos que, quando detectados, foram transferidos para tubos novos marcados com a data da emergência. Estes adultos foram mantidos nesses tubos de criação em câmara BOD a 23 °C, com fotoperíodo de 12 h com luz e 12 h de escuridão, e posteriormente utilizados nos procedimentos subsequentes em até 15 dias.

2.6. Contagem de óvulos

Dissecamos os ovários de fêmeas com diferentes idades (de 5 a 15 dias, dissecadas de 2 em 2 dias) das quatro linhagens em estudo (St8w+, St8R, Pw+ e Ptet). Os ovários foram retirados de fêmeas anestesiadas em CO₂, mergulhados em tampão PBS (0,1 M, pH 7,2), posicionados em lâminas histológicas e cobertos com lamínula e então fotografados em microscópio Olympus CX40, no aumento de 40X, com o auxílio de um celular iPhone X posicionado em um adaptador. As imagens foram visualizadas

no monitor de computador para a contagem apenas dos óvulos com casca e os apêndices dorsais formados, isto é, maduros (**Fig. 2**). Foram obtidas imagens de pelo menos 20 fêmeas de cada idade em cada linhagem. Em seguida checamos a localização das bactérias nos ovaríolos utilizando o FISH (**seção 2.9**). Na sequência, os ovários foram processados para MET (**seção 2.10**).

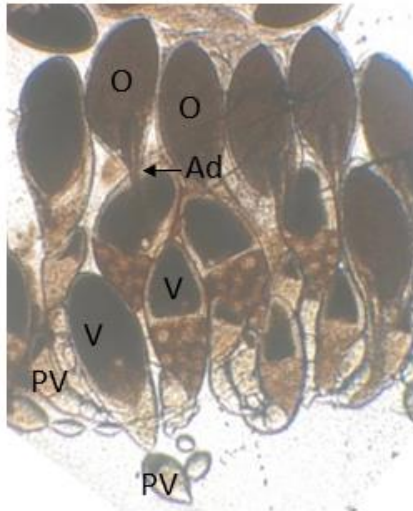


Figura 2. Micrografia de um ovário de St8 de cinco dias infectado por *Wolbachia* mostrando óvulos (O), com seus apêndices dorsais (Ad); câmaras vitelogênicas (V) e pré-vitelogênicas (PV). Aumento de 40X.

2.7. PCR Semi-quantitativa

Para investigar o aumento ou redução da infecção com a idade das fêmeas, utilizamos a metodologia da PCR semi-quantitativa (MACHTELINCKX *et al.*, 2009) como descrito no item **2.3**, modificando o número de ciclos em cada reação. Essa metodologia se baseia no fato de que o aumento do número de ciclos aumenta a probabilidade de que um DNA molde seja amplificado, ainda que esteja em concentração muito baixa. É necessário considerar ainda que quanto maior a quantidade de DNA amplificado, maior a ligação com o intercalante e mais brilhante é a banda visualizada no gel de agarose iluminado com luz UV. Após a amplificação do primeiro fragmento, o número de fragmentos dobra a cada ciclo. O brilho máximo detectável no gel de agarose é atingido após 30 ou 35 ciclos, quando é alcançado o ponto saturação da intercalação contida no corante (GelRed). Com isso, utilizamos a reação descrita na **seção 2.3** com 35 ciclos para selecionar as fêmeas a serem avaliadas (utilizamos apenas as fêmeas infectadas) e depois utilizamos reações com

20, 25 e 30 ciclos para comparar a intensidade das infecções entre fêmeas de diferentes idades. Espera-se que amostras com menos bactérias só apresentem bandas a partir de 30 ciclos, enquanto amostras com maior titulação já apresentem bandas com 20 ciclos. Inicialmente, esta etapa foi feita com fêmeas de três e 15 dias para testar o método. A **Figura 3** mostra os resultados preliminares, evidenciando que, de fato, as bandas estão ausentes em quase todas as reações feitas com apenas 20 ciclos, apresentam um brilho fraco, porém variável com 25 e mais forte com 30. Com a constatação de que a maioria das amostras não apresentaram bandas com 20 ciclos e apresentaram bandas com brilho similar com 30 ciclos, ou seja, não permitiram distinguir entre mais ou menos infectadas, optamos por repetir o procedimento utilizando apenas a reação de 25 ciclos utilizando fêmeas de três, nove e 15 dias das duas linhagens infectadas em estudo, St8w+ e Pw+.

Por se tratar de uma avaliação comparativa, não quantitativa, utilizamos um marcador de peso molecular (**Fig. 4**) e comparamos o brilho da banda de referência (de 1000 pares de bases) com o brilho das bandas obtidas por PCR. Para tanto, montamos o gel com 2 µl do marcador e 2 µl de cada produto de PCR. Após fotografados, os géis foram avaliados utilizando o programa *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>), que mede a densidade óptica (absorbância) do intercalante contido no corante (GelRed). Quanto maior a quantidade de DNA, maior a incorporação do corante e, portanto, maior o brilho da banda. Por sua vez, quanto maior o brilho da banda, maior a quantidade de *Wolbachia* infectando cada fêmea. Com isso, comparamos a absorbância da banda de 1000 pares de bases do marcador (**Fig. 4**) com a absorbância dos fragmentos amplificados do gene *wsp* das amostras em estudo amplificadas em reações de 25 ciclos de PCR utilizando uma regra de três simples, onde a banda de 1000 pb do corante tem sempre o valor 1,0, de modo que bandas menos brilhantes tiveram valores menores que 1,0 e bandas mais brilhantes, maiores que 1,0.

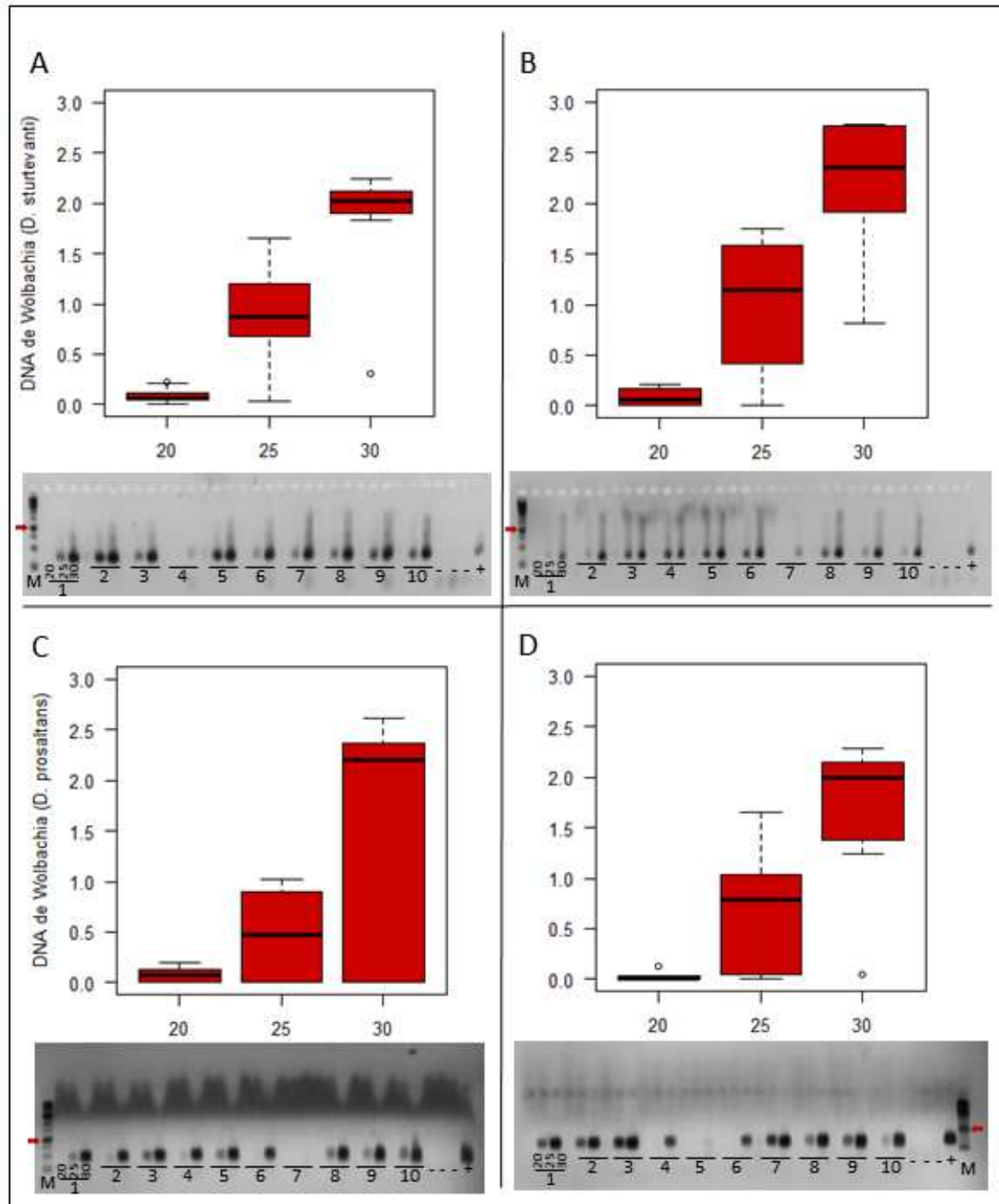


Figura 3. PCR semi-quantitativa das amostras de: A e B) *D. sturtevantii* de três e 15 dias de idade, respectivamente; C e D) *D. prosaltans* de três e 15 dias de idade, respectivamente. M é o marcador padrão de peso molecular (seta vermelha indica a banda utilizada como padrão de referência), o brilho dessa banda foi considerado 1,0. O DNA de cada indivíduo (1 – 10) foi amplificado em três reações de PCR com 20, 25 e 30 ciclos (eixo X). Em todos os géis foram ainda aplicados os controles negativos (-): fêmea de *D. melanogaster* w1118 reconhecidamente não infectada, extração sem amostra e PCR sem DNA, nessa ordem; e o controle positivo (+): fêmea de *D. willistoni*, JS 6.3 reconhecidamente infectada por *Wolbachia* – (seção 2.3).

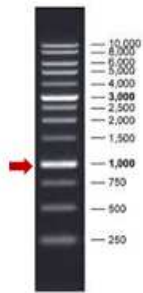


Figura 4. Marcador de peso molecular Kasvi K9-1000L com destaque para a banda de 1000 pares de bases (seta vermelha), utilizada como padrão para a comparação do brilho dos produtos amplificados de PCR.

2.8. Análises estatísticas

Todas as comparações feitas nesse trabalho basearam-se em análises de variância (ANOVA) em modelos lineares generalizados (glm), considerando a distribuição adequada a cada conjunto de dados com o programa R.

2.9. Distribuição de *Wolbachia* nos ovários - FISH

Ovários de fêmeas de três e 15 dias das linhagens St8 e Pro101 foram investigados quanto à localização das bactérias, utilizando uma metodologia baseada em Strunov *et al.* (2017) e Strunov & Kiseleva (2014). Os ovários foram dissecados em PBS estéril e fixados por 20 min em solução de formaldeído a 4 %. Após a fixação, o material foi lavado três vezes em PBX (PBS com 1,5 % de TRITON) e depois armazenado em Etanol 70% a 4 °C até ser utilizado para FISH. Todos os reagentes foram preparadas com água tratada com DEPC (Dietil pirocarbonato) para eliminar as RNAases, evitando a degradação do RNA. Para a hibridação com as sondas de RNA 16S, específicas para *Wolbachia* (W1, Cy3-5'-AATCCGGCCGARCCGACCC3'; e W2, Cy3-5'-CTTCTGTGAGTACCGTCATTATC-3') (HEDDI *et al.*, 1999), o material fixado foi lavado por três vezes com tampão de lavagem (solução de citrato de sódio salino - SSC 2X, 10% Formamida Deionizada) pré-aquecido a 37 °C. Após as lavagens, foram adicionados 50 µl de tampão de hibridação (solução SSC 2X com 10% de Dextrano Sulfato e 10% de Formamida deionizada) em cada amostra, contendo 0,25 µl de cada uma das sondas, w1 e w2. Cada amostra foi deixada em banho-Maria por uma noite (8-12 h) e posteriormente lavada com tampão de lavagem por três vezes e com solução SSC 2X por mais duas vezes. Após este procedimento, foram adicionadas

duas gotas de 4', 6-diamidino-2-fenilindol, dicloridrato - DAPI com meio de montagem (Roti-Mount FluorCare - DAPI) em cada amostra, que em seguida foram montadas em lâminas histológicas para posterior visualização e captura das imagens em microscópio de fluorescência Olympus BX53 do Beagle – Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Biologia Animal, da UFV, campus de Viçosa ou microscópio confocal LSM 880 da Zeiss do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, campus de Belo Horizonte – CAPI-UFMG. Finalmente, as imagens foram editadas com o auxílio do software FIJI (SCHINDELIN *et al.*, 2012).

2.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os ovários de moscas de nove dias de St8 foram dissecados em PBS (0,1 M, pH 7,4) e fixados em solução fixadora de Karnovsky (Paraformaldeído 4% e glutaraldeído 5% no mesmo PBS) por pelo menos 2,5 h. Após três lavagem por 5 min cada com PBS, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% por 1 h, então lavadas rapidamente em água destilada e contrastada com solução aquosa de acetato de uranila a 1% por 12 h a 4 °C. Após esse tempo, as amostras foram desidratadas em quatro banhos de 10 min cada com etanol a 30%, 50%, 70% e 96%, mais um de 20 min a 100% e, então, dois banhos de acetona pura de 20 min cada. Após a desidratação, as amostras foram incluídas em resina Epon 812. Secções ultrafinas (~ 60 nm de espessura) foram obtidas com um ultramicrótomo (Leica UC6) do Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, campus de Belo Horizonte, CM-UFMG. As seções foram montadas em grids e contrastadas com acetato de uranila aquoso a 3% e citrato de chumbo (Reynolds 1963). Algumas amostras foram contrastadas apenas com citrato de chumbo, uma vez que apresentavam acetato de uranila acrescentado em etapa anterior. Em seguida foram examinadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão, Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI, operando a 120 kV, também do CM-UFMG.

3. RESULTADOS

3.1. Contagem de ovos

As **Figuras 5 e 6** mostram a produção de óvulos em St8 e Pro101 contabilizados nos ovários de fêmeas infectadas e tratadas de diferentes idades.

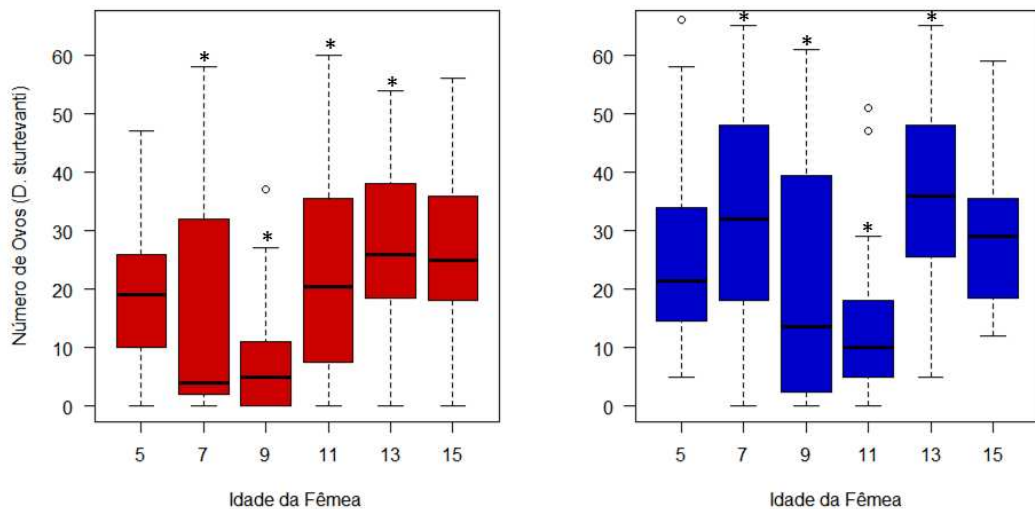


Figura 5 BoxPlot do número de óvulos contados a partir de ovários dissecados de fêmeas infectadas (vermelho) e tratadas (azul) de *D. sturtevantii* de diferentes idades (5, 7, 9, 11, 13 e 15 dias). Diferenças significativas entre fêmeas infectadas e não infectadas de uma mesma idade foram marcadas com um asterisco.

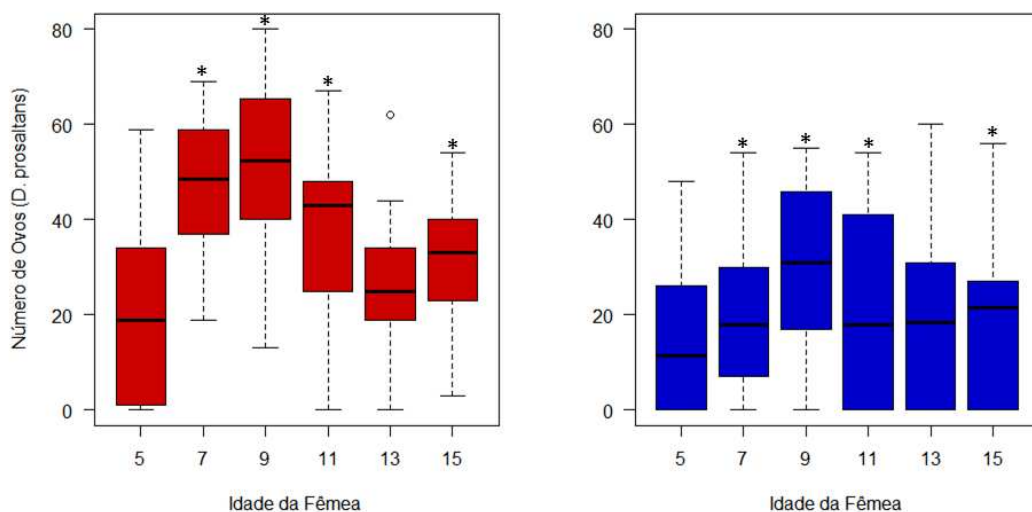


Figura 6 BoxPlot do número de óvulos contados a partir de ovários dissecados de fêmeas infectadas (vermelho) e tratadas (azul) de *D. prosaltans* de diferentes idades (5, 7, 9, 11, 13 e 15 dias). Diferenças significativas entre fêmeas infectadas e não infectadas de uma mesma idade foram marcadas com um asterisco.

No cômputo total, fêmeas tratadas com antibióticos produziram mais óvulos em St8 ($p = 0.02452$) que as fêmeas infectadas. Em Pro101, as fêmeas infectadas produziram mais óvulos ($p = 1.887e^{-10}$). Especificamente, encontramos diferenças significativas aos sete ($p = 0,01728$), nove ($p = 0,04412$), 11 ($p = 0,007593$) e 13 dias ($p = 0.005527$) em St8 (**Figura 5**), enquanto em Pro101 (**Figura 6**) foram encontradas diferenças significativas aos sete ($p = 0.0001359$), nove ($p = 0.0001115$), 11 ($p = 0.00941$) e 15 dias ($p = 0.01017$). O efeito da infecção em Pro101 foi sempre no sentido de aumentar a produção de óvulos, enquanto em St8 foi em reduzir, exceto aos 11 dias, quando fêmeas tratadas produziram significativamente menos ovos que as fêmeas infectadas. O cálculo da significância total e o que considerou apenas as fêmeas de cada idade foi feito com base na distribuição de quase-Poisson, uma modificação da distribuição de Poisson (adequada para dados de contagem) quando há excesso de zeros nas estimativas.

3.2. PCR Semiquantitativa

A intensidade de infecção não se alterou significativamente em St8 quando consideramos fêmeas de três, nove e 15 dias (**Fig. 7**), apesar de aos 15 dias a variação ser mais evidente (fêmeas pouco infectadas e muito infectadas). Ainda, aos nove dias, em um dos indivíduos foi possível detectar um *outlier* (amostra 26, **fig. 7B** – círculo aberto mostrado em **7C**).

Em Pro101 fica evidente que aos nove dias a intensidade de infecção é maior que aos três ou 15 dias (**Fig. 8**). Esse resultado condiz com o apresentado na **Figura 6** que mostra que o pico de produção de ovos em Pro101 infectadas se deu aos nove dias.

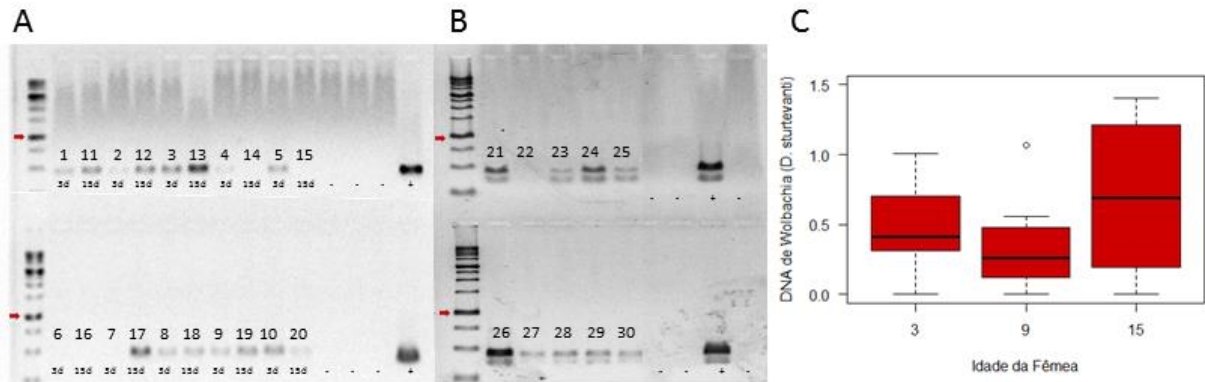


Figura 7 PCR (25 ciclos) do DNA de *Wolbachia* (*wsp*) amplificado a partir de amostras de *D. sturtevantii* com diferentes idades. **A)** Fêmeas de três (1–10) e quinze (11–20) dias alternadas; **B)** Fêmeas de nove dias (21-30). Em A e B, a primeira canaleta mostra o marcador de peso molecular, cuja banda de 1000 pares de bases (seta vermelha) foi utilizada como padrão, de modo que o brilho dessa banda em cada gel foi considerado como 1,0. **C)** Boxplot da quantidade de DNA de *Wolbachia* amplificada em fêmeas de três, nove e quinze dias ($p = 0.1234$). Em todos os géis foram ainda aplicados três controles negativos e um controle positivo ver **item 2.3** dos métodos).

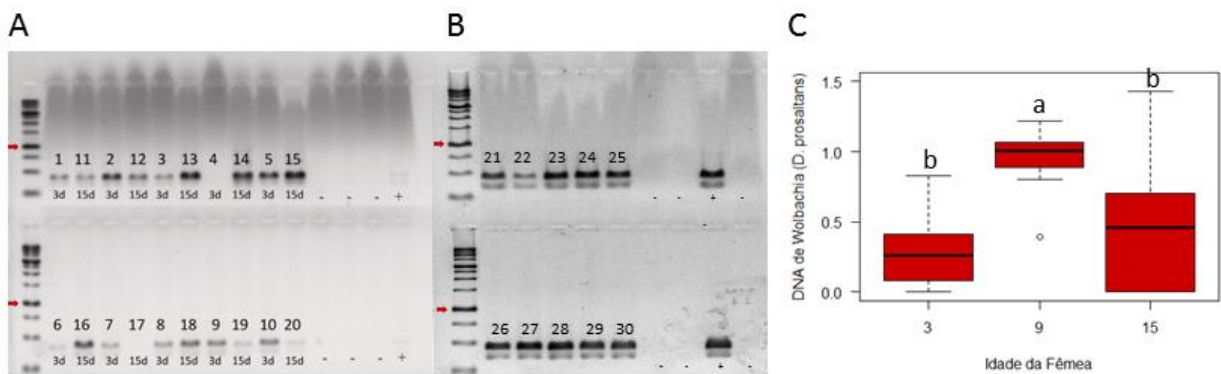


Figura 8 PCR (25 ciclos) do DNA de *Wolbachia* (*wsp*) amplificado a partir de amostras de *D. prosaltans* com diferentes idades. **A)** Fêmeas de três (1 – 10) e quinze (11 – 20) dias alternadas; **B)** Fêmeas de nove dias (21-30). Em A e B, a primeira canaleta mostra o marcador de peso molecular, cuja banda de 1000 pares de bases (seta vermelha) foi utilizada como padrão, de modo que o brilho dessa banda em cada gel foi considerado como 1,0. **C)** Boxplot da quantidade de DNA de *Wolbachia* amplificada em fêmeas de três, nove e quinze dias ($p = 0,0001476$). Em todos os géis foram ainda aplicados três controles negativos e um controle positivo ver **item 2.3** dos métodos).

3.3. Visualizando a infecção nos ovaríolos

A microscopia de fluorescência mostra que, em St8 há uma grande densidade de bactérias nas três principais regiões dos ovaríolos: germário, câmaras pré-vitelogênicas e vitelogênicas. Ovarios de fêmeas com três (**Fig. 9A**) e 15 dias (**Fig. 9B**) diferem na quantidade de óvulos produzidos: com três dias há poucos óvulos ($\bar{x} = 8,47 \pm 0,59$), pois, a maioria dos ovaríolos estão em desenvolvimento, enquanto com 15 dias há bem mais óvulos ($\bar{x} = 27,25 \pm 0,23$). Contudo, não se observou diferença na distribuição das bactérias nos ovarios com três ou 15 dias. Por outro lado, em fêmeas de três dias de Pro101 (**Fig. 9C**) a infecção foi evidente apenas nos germários, enquanto wolbachias espalhadas em outras regiões dos ovaríolos só foram observadas em fêmeas aos 15 dias (**Fig. 9D**).

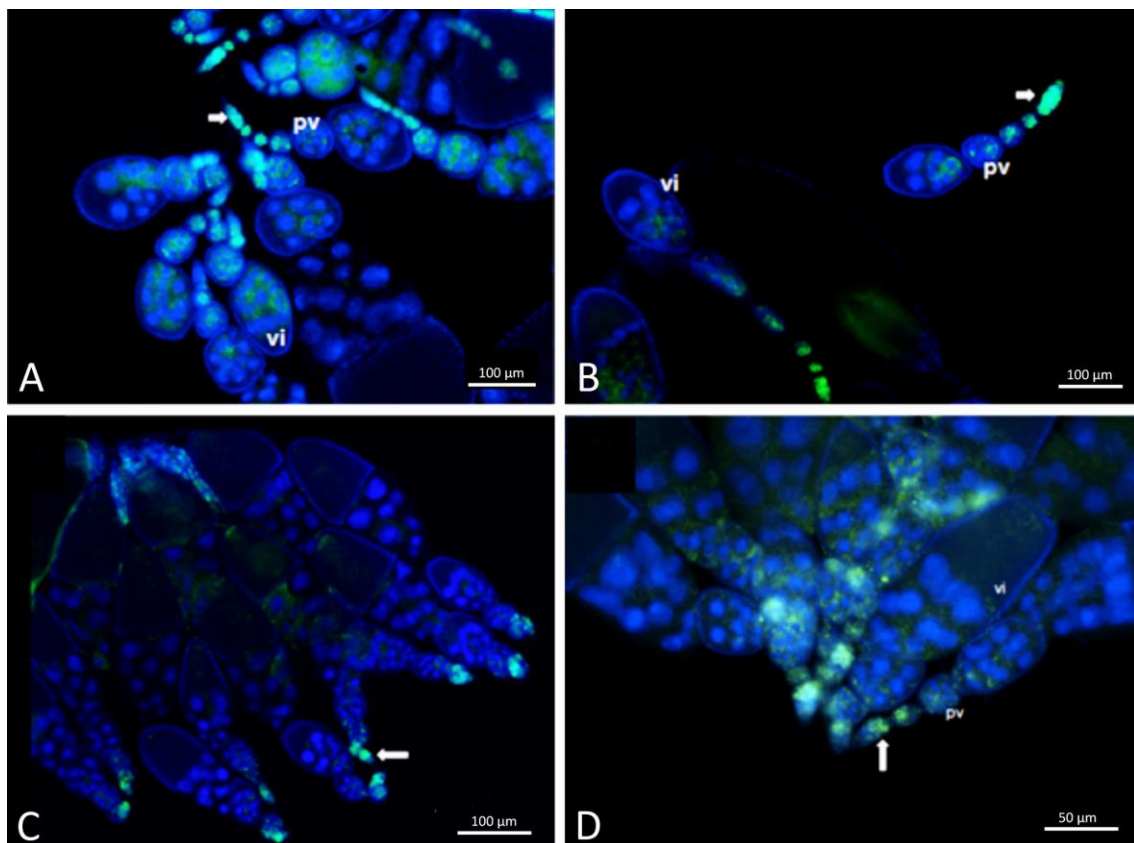


Figura 9 – Ovaríolos de fêmeas de St8 (A, B) e Pro101 (C, D) com três (A, C) e 15 (B, D) dias de idade observados ao microscópio de fluorescência. Observe a diferença na distribuição de bactérias (sondas W1 e W2 em verde) entre St8 (A) e Pro101 (C) já nos três dias de idade. A cor azul mostra DNA corado com DAPI. Germários (setas); câmara pré-vitelogênica (pv); câmara vitelogênica (vi).

3.4. Visualizando *Wolbachia* nas células dos ovários

O endossimbionte *Wolbachia* foi identificado através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) em células germinativas de ovários de St8 de nove dias, confirmando os resultados do PCR e do FISH. A **Figura 10** mostra três *wolbachias* em seu formato cocoide. Em seu citoplasma observamos a alternância de regiões com alta eletrodensidade e regiões com baixa eletrodensidade. O reconhecimento dessa bactéria se dá pela observação de seus três envoltórios (**Fig. 10B**), o mais externo é o vacúolo fagocítico, ou fagossomo, derivado da membrana plasmática da célula do hospedeiro e os dois mais internos são as membranas lipoproteicas típicas de uma bactéria Gran-negativa.

A partir do reconhecimento da forma e da ultraestrutura da *Wolbachia* passou-se ao estudo de sua distribuição nas regiões e câmaras do ovário. Utilizando a microscopia de fluorescência, reconhecemos as três principais regiões do ovário da ST8, regiões de interesse desse estudo. A **Figura 11A** mostra o germário, onde se inicia a ovogênese e as câmaras pré-vitelogênicas e vitelogênicas de St8. A **Figura 11B** mostra parte de um ovário observado ao microscópio confocal, evidenciando a presença de *Wolbachia* e os núcleos das células presentes nos ovários. Entre as células dos ovários são observados núcleos de células foliculares, formando o epitélio folicular, revestindo a região pré-vitelogênica e núcleos de células nutridoras, no interior da câmara. Em muitas células observamos uma concentração maior de *Wolbachia* em torno do núcleo.

O germário apresenta em sua região periférica um conjunto de células somáticas que darão origem ao epitélio folicular. Em meio a essa região do germário, através do MET, observamos uma célula morfologicamente similar a bacteriócito, densamente infectada por *Wolbachia*, vizinha à membrana basal (**Fig. 12A**). Além de ocupar a região periférica do germário, células semelhantes a bacteriócitos foram observadas no interior do germário, onde se encontram as células germinativas (**Fig. 12B**). Essas células que se assemelham a bacteriócitos estavam intensamente infectadas por *Wolbachia* em torno de seu grande núcleo com formato irregular e nucleolo evidente. No citoplasma, encontramos bactérias em diferentes formas e

estágios metabólicos. É tão alta a densidade de *Wolbachia* que quase não foi possível visualizar organelas celulares.

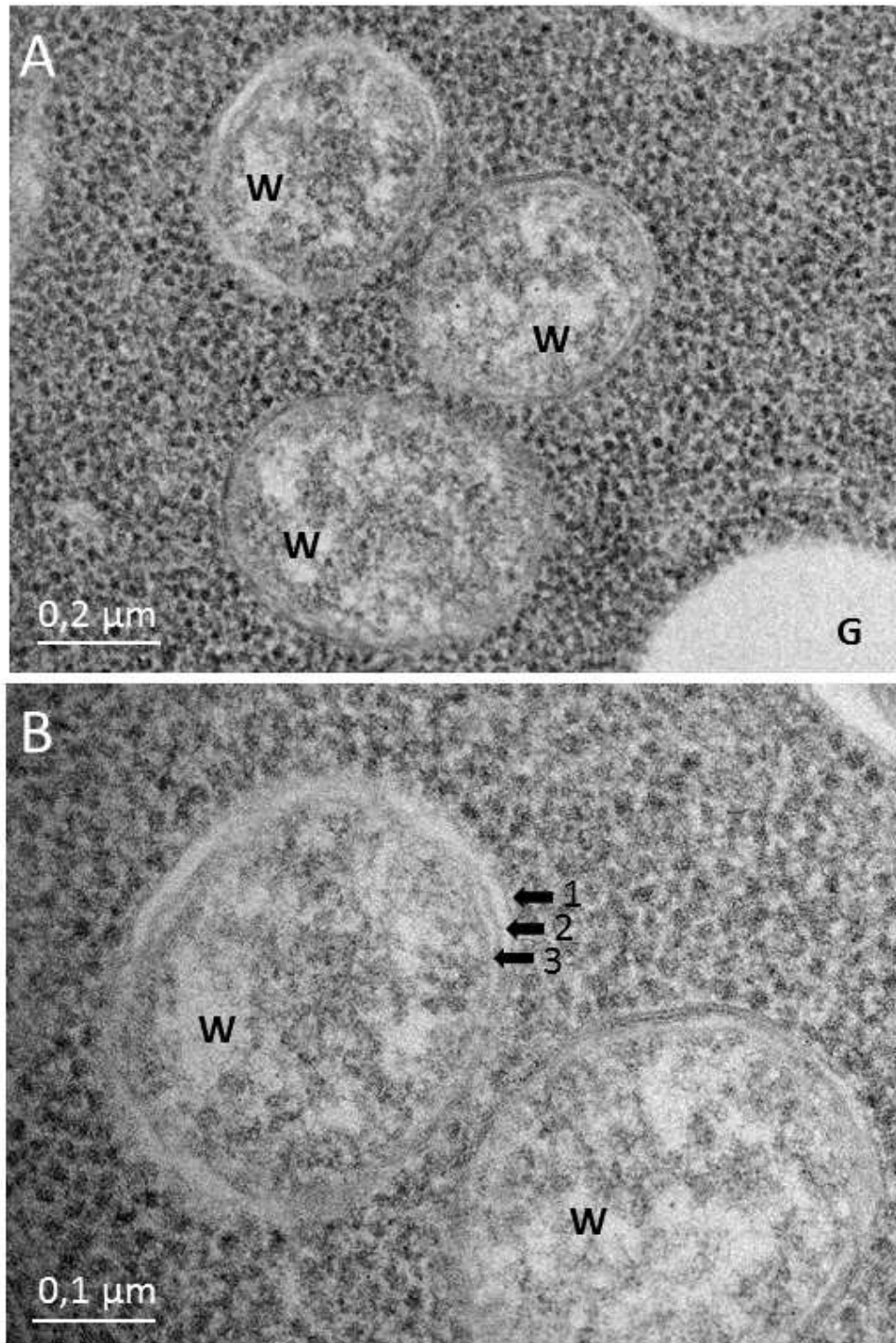


Figura 10. **A.** Ultramicrografia de uma região de célula nutridora ovariana de St8 com nove dias mostrando três wolbachias (W) em formato cocoide. Grânulo de vitelo (G). **B.** Detalhe dos três envoltórios delimitando a bolsa membranosa de uma *Wolbachia*. 1 – vesícula fagocítica ou fagossomo. 2 - Membrana externa da *Wolbachia*. 3 – Membrana interna da *Wolbachia*.

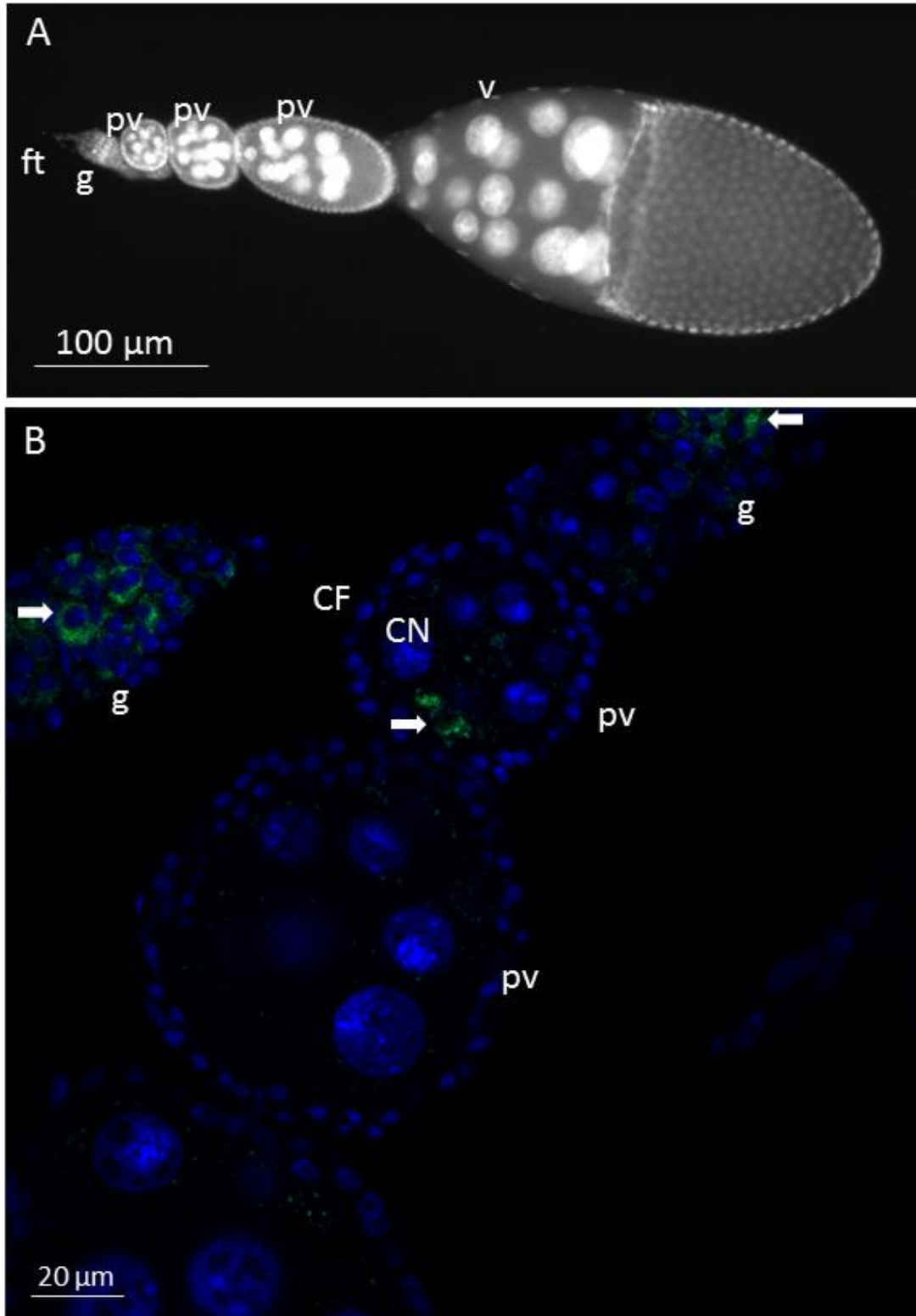


Figura 11. Micrografias de ovaríolos de St8 em microscopia de fluorescência **A.** Um ovaríolo corado com DAPI, mostrando o germário (g) com seu filamento terminal (ft) e as câmaras pré-vitelogênicas (pv) e vitelogênica (v). **B.** Ovaríolos de três dias corados com DAPI (azul) e as sondas W1 e W2 (verde) visto em microscópio confocal. Observe alta densidade de *Wolbachia* em torno dos núcleos das células no germário e em uma célula na câmara prévitelogênica (seta). Célula folicular (CF); célula nutridora (CN).

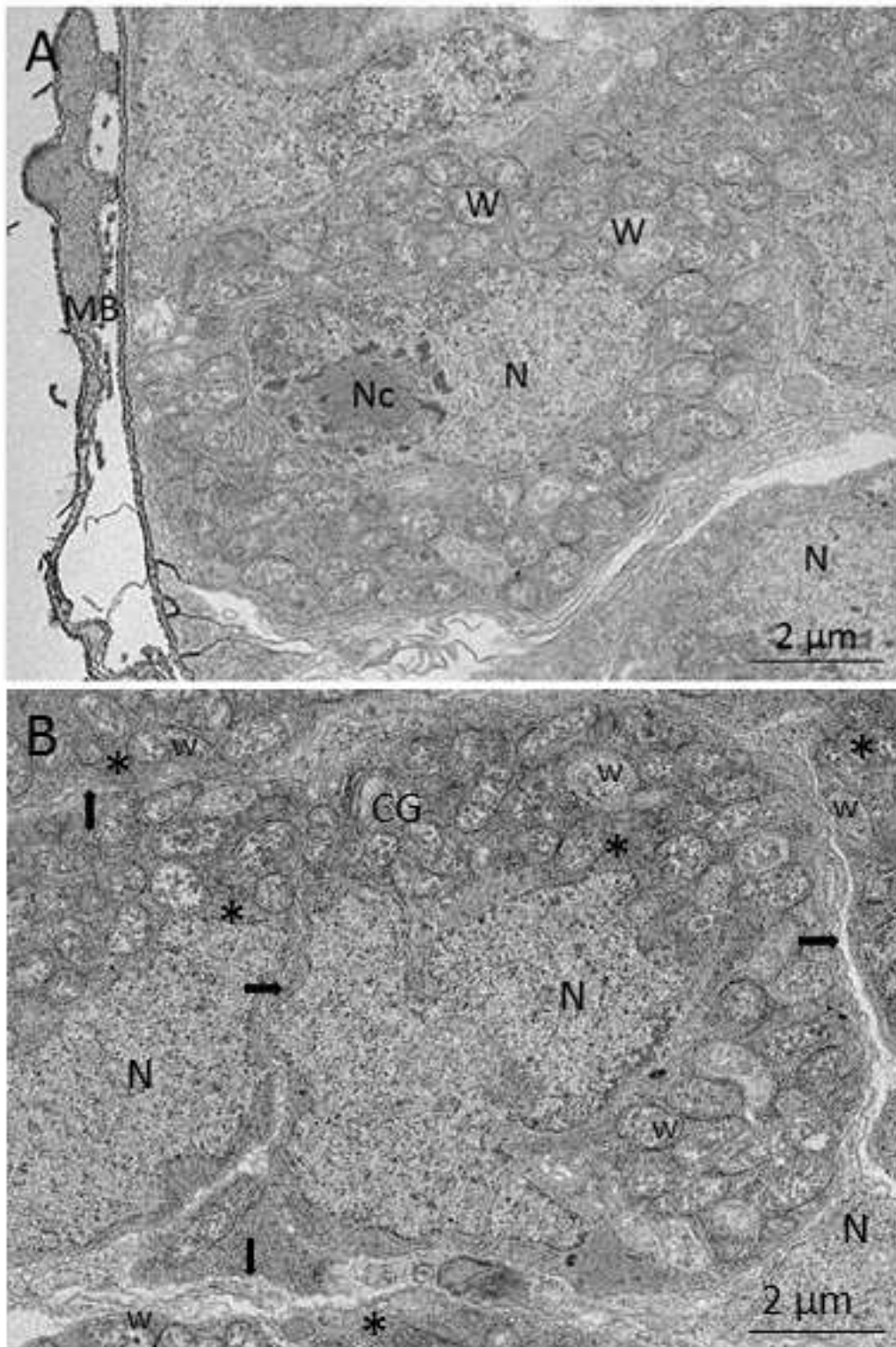


Figura 12. A. Ultramicrografia de uma célula similar a um bacteriócito, localizado na região periférica do germário, densamente povoado por *Wolbachia* (W). Membrana basal (MB); núcleo (N); nucleolo (Nc). **B.** Células similares a bacteriócitos densamente infectados por *Wolbachia* no interior do germário de fêmeas St8 de nove dias de idade. Os asteriscos indicam os bacteriócitos. As setas mostram os limites entre as células. Complexo de Golgi (CG).

Na região pré-vitelogênica, observamos uma câmara em estágio inicial em corte transversal (**Fig. 13A**). As células foliculares são mais achatadas e não apresentam *Wolbachia*, enquanto as células nutridoras, com seus grandes núcleos, apresentam *Wolbachia* em diferentes formas, principalmente no formato cocoide típico. Observamos também uma ponte citoplasmática, estrutura resultante de citocinese incompleta, que permite a transferência de conteúdo citoplasmático de uma célula para outra até a transferência final para o ovócito em desenvolvimento. A ponte citoplasmática é observada em detalhe mostrando os anéis de actina na periferia da mesma (**Fig. 13B**). Observa-se na região da ponte uma grande quantidade de mitocôndrias e não se observa *Wolbachia* nessa região.

Durante a vitelogênese, conseguimos distinguir o ovócito das células nutridoras e foliculares. Nas câmaras vitelogênicas iniciais, o ovócito passa por intenso crescimento e acúmulo de grãos de vitelo. Observamos no citoplasma do ovócito várias wolbachias com formato cocoide e bastonete, o que indica a reprodução dessa bactéria (**Fig. 14A**). Revestindo o ovócito, observamos muitas células foliculares com núcleos grandes e nucléolo evidente. No citoplasma dessas células, observamos muitos retículos endoplasmáticos e não observamos *Wolbachia*. No limite entre o ovócito e as células foliculares, observamos prolongamentos citoplasmáticos indicando a transferência de substâncias que farão parte do vitelo do óvulo e formarão sua casca. Durante o desenvolvimento do ovócito, observamos wolbachias próximas aos túbulos do retículo endoplasmático e vários grãos de vitelo com diferentes eletrodensidades, indicando composição química diversa (**Fig. 14B**).

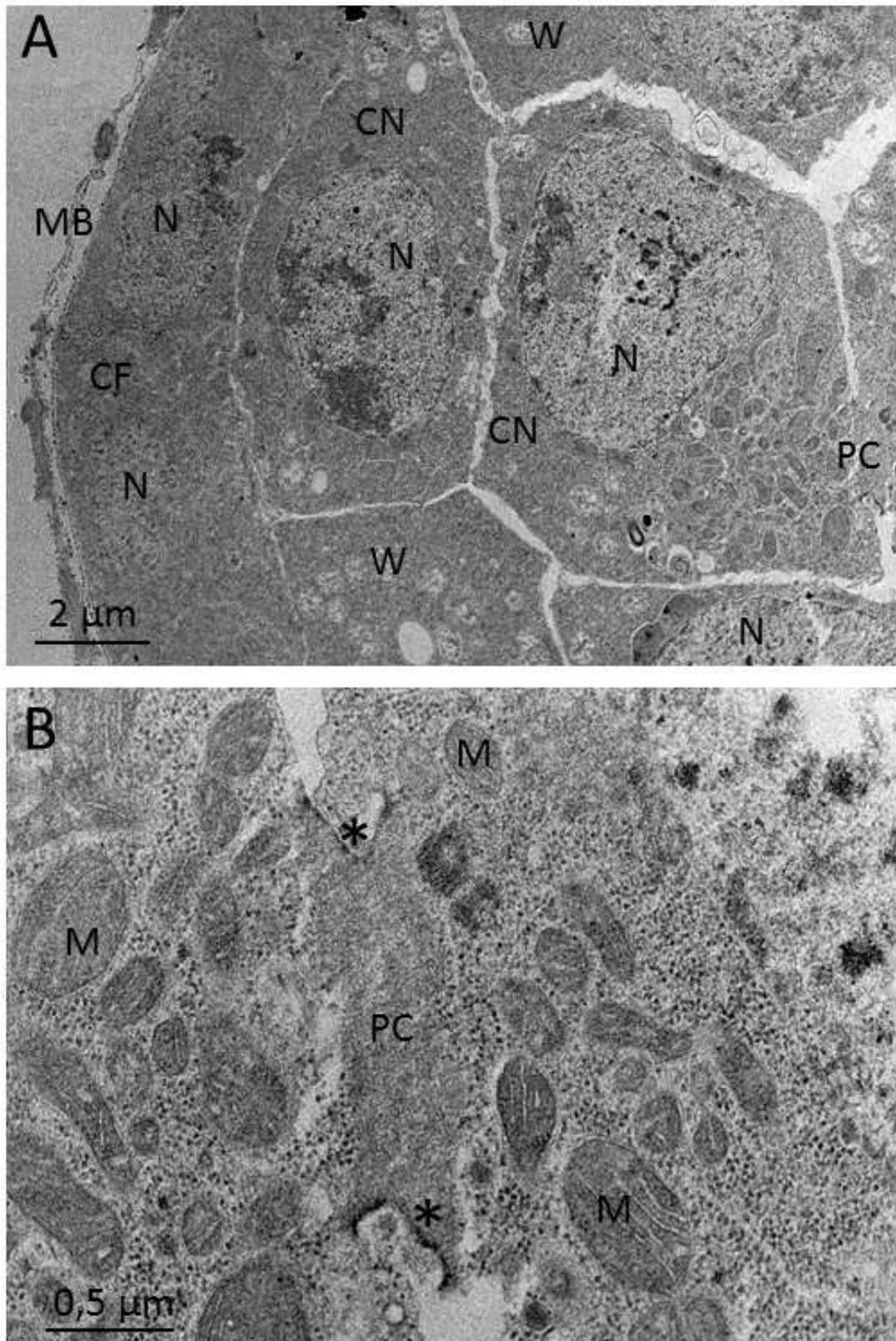


Figura 13. Ultramicrografia de câmara pré-vitelogênica de fêmeas St8 de nove dias de idade. **A.** Células nutritoras (CN) infectadas por *Wolbachia* (W). Membrana Basal (MB); células foliculares (CF); Núcleo (N); Ponte Citoplasmática (PC). **B.** Ampliação da região da Ponte Citoplasmática (PC) com seus respectivos anéis de actina indicados por asteriscos; Mitocôndria (M).

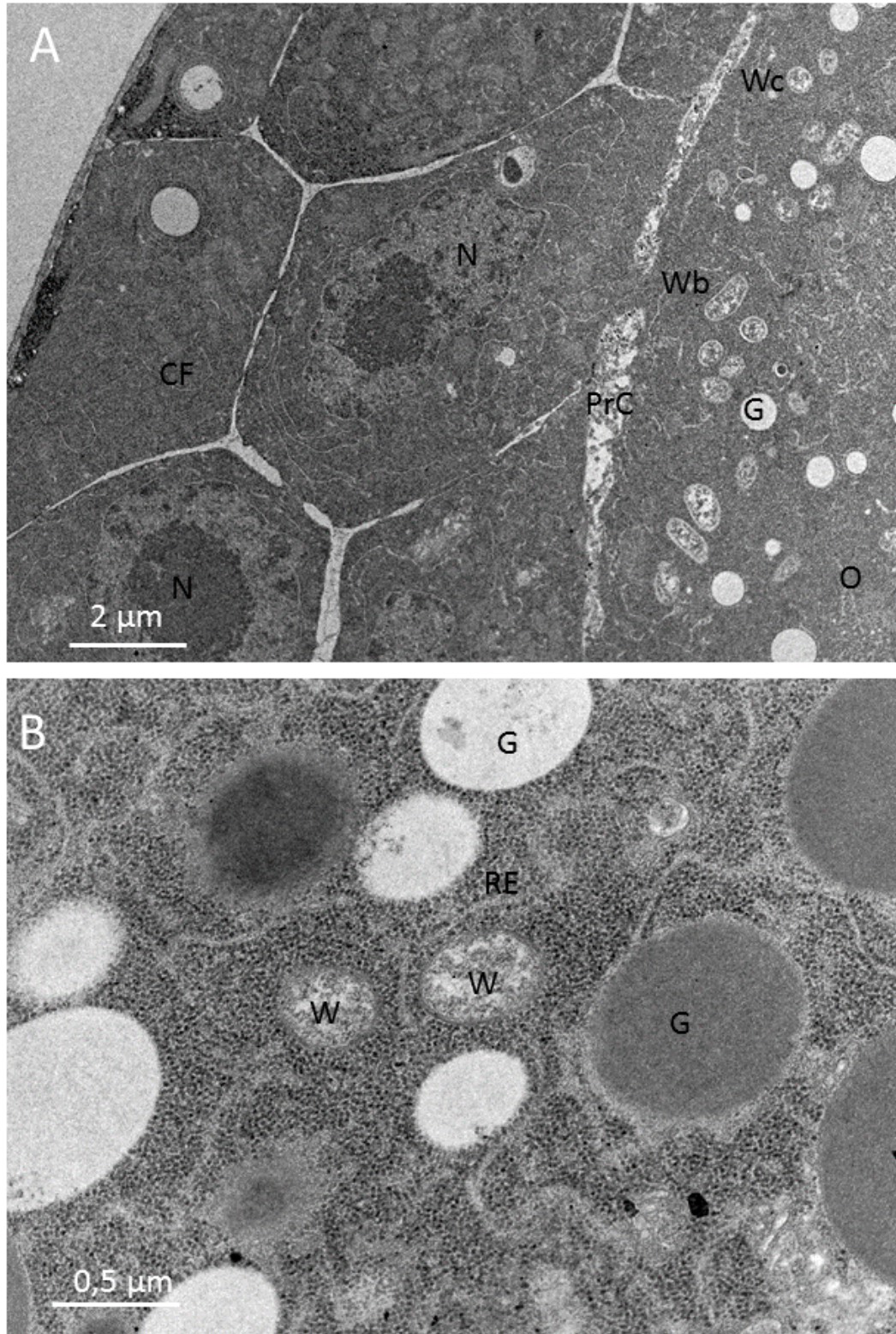


Figura 14. Ultramicrografia de câmara vitelogênica de fêmeas St8 de nove dias de idade com **A.** ovócito (O) densamente infectado por *Wolbachia*, em forma cocoide (Wc) e de bastonete (Wb). Célula Folicular (CF); Grão de Vitelo (G); Núcleo (N); Prolongamento Citoplasmático (PrC) **B.** Ovócito na câmara vitelogênica mostrando *Wolbachia* (W) entre grãos de vitelo (G) com diferentes eletrodensidades. Retículo Endoplasmático (RE).

Observaram-se wolbachias em processo de divisão celular em todas as regiões do ovaríolo. A forma de bastonete adquirida pela *Wolbachia* indica que vai iniciar a divisão celular. Observamos *Wolbachia* em mitose tanto em células semelhantes ao bacteriócito no germário, quanto em células nutridoras e no ovócito no início da vitelogênese. No entanto, não observamos bactérias em mitose em ovócitos em estágio mais avançado de vitelogênese. A reprodução da *Wolbachia* indica alta atividade metabólica dessa bactéria e é fundamental para que atinja o ovócito. Em células nutridoras, observou-se as etapas da divisão celular dessa bactéria. De início, observa-se a forma de bastonete com discreta constrição citoplasmática na região mediana da célula bacteriana (**Fig. 15A**). Na sequência, a constrição citoplasmática aumenta tornando-se mais evidente (**Fig. 15B**), até que acontece a separação por completo de duas novas células em formato cocoide (**Fig. 15C**).

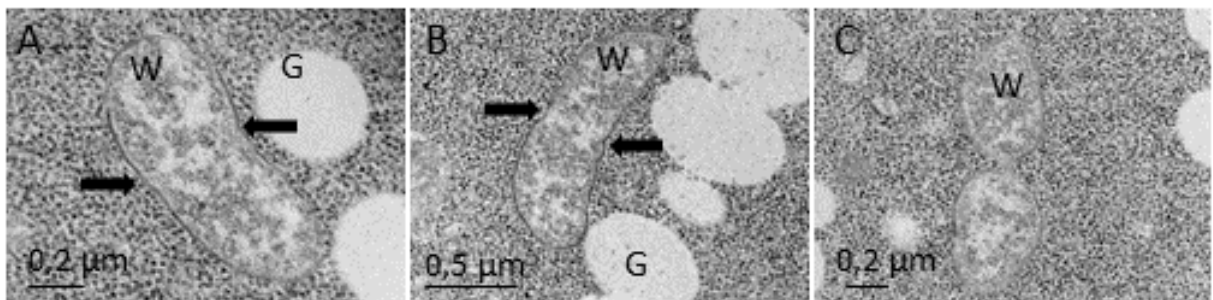


Figura 15. Ultramicrografias de células nutridoras evidenciando wolbachias em mitose. **A.** *Wolbachia* (W) em formato de bastonete no início da constrição (setas). Grão de vitelo (G). **B.** *Wolbachia* com constrição mais avançada (setas). **C.** *Wolbachia* com constrição quase total, voltando ao formato cocoide.

Nas células semelhantes a bacteriócitos, observamos alta densidade de *Wolbachia* em diferentes formas e eletrodensidades (**Fig. 16A**). Essas variações indicam estágios diferentes do metabolismo bacteriano e sua resposta às defesas da célula hospedeira. Também observamos interações entre a *Wolbachia* e as estruturas e organelas celulares. O endossimbionte se posiciona próximo, e muitas vezes adere, à face externa do envoltório nuclear, geralmente próximo a um poro nuclear. É comum também a aproximação e a adesão com mitocôndrias (**Fig. 16B**).

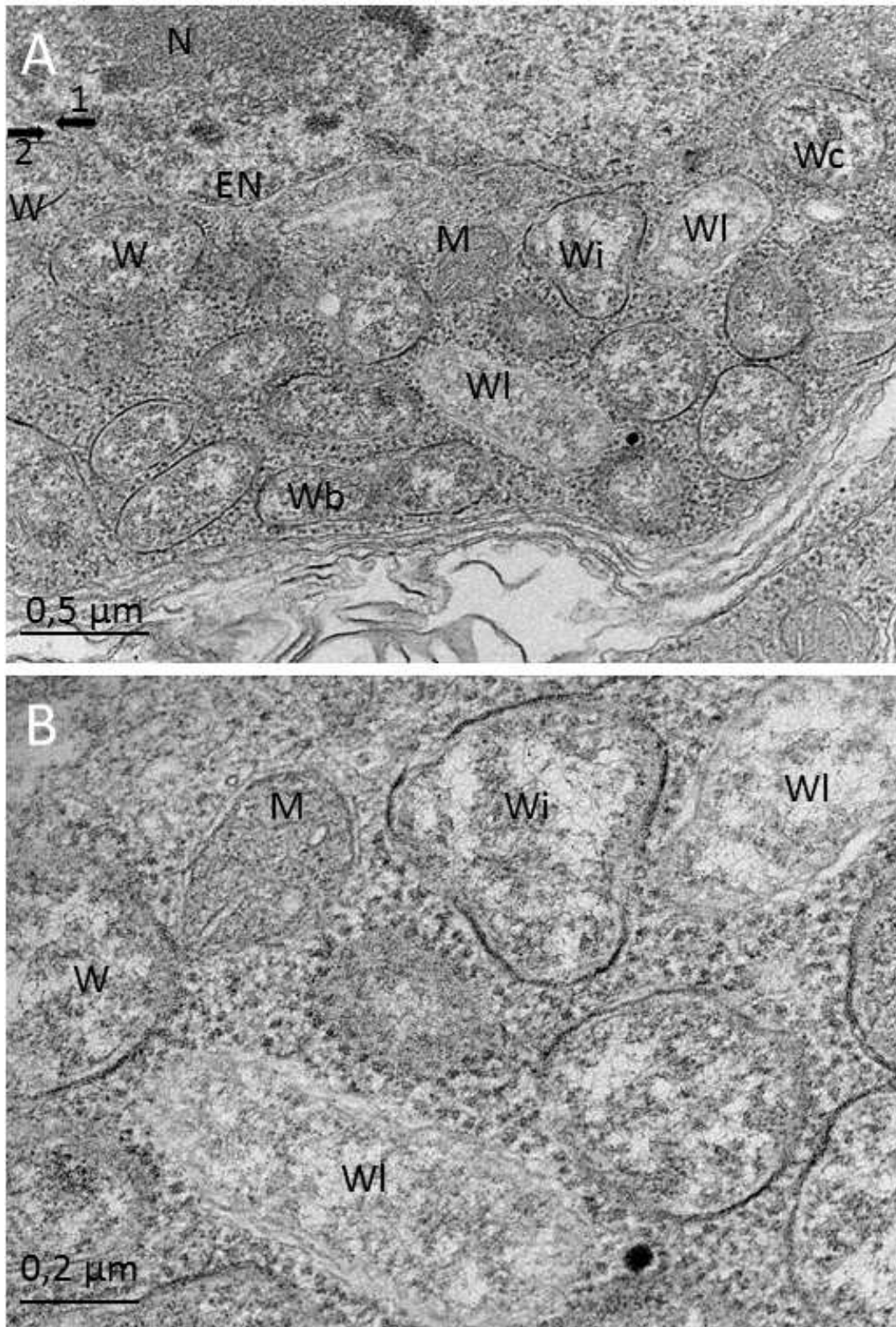


Figura 16. Ultramicrografia do germário de St8 de nove dias evidenciando **A.** Célula semelhante a bacteriócito com wolbachias de diversos formatos e eletrodensidades. Formato cocoide (Wc); Formato indefinido (Wi); Formato bastonete (Wb); Baixa eletrodensidade (WI). Duas wolbachias (W) em contato com a face externa (seta 1) do envoltório nuclear. Face interna do envoltório nuclear (seta 2). **B.** Interação de *Wolbachia* (W) com mitocôndria (M).

Como foi falado anteriormente, é comum a interação da *Wolbachia* com determinadas estruturas e organelas da célula hospedeira. Essas interações são obrigatórias para a relação do endossimbionte e sua célula hospedeira. Essas interações são observadas em todas as células desse estudo, como no ovócito, onde observamos duas wolbachias de formato cocoide próxima aos túbulos de um retículo endoplasmático (**Fig. 17A e B**). Outra interação observada foi entre a *Wolbachia* e o complexo de Golgi vista em célula nutridora (**Fig. 17C e D**).

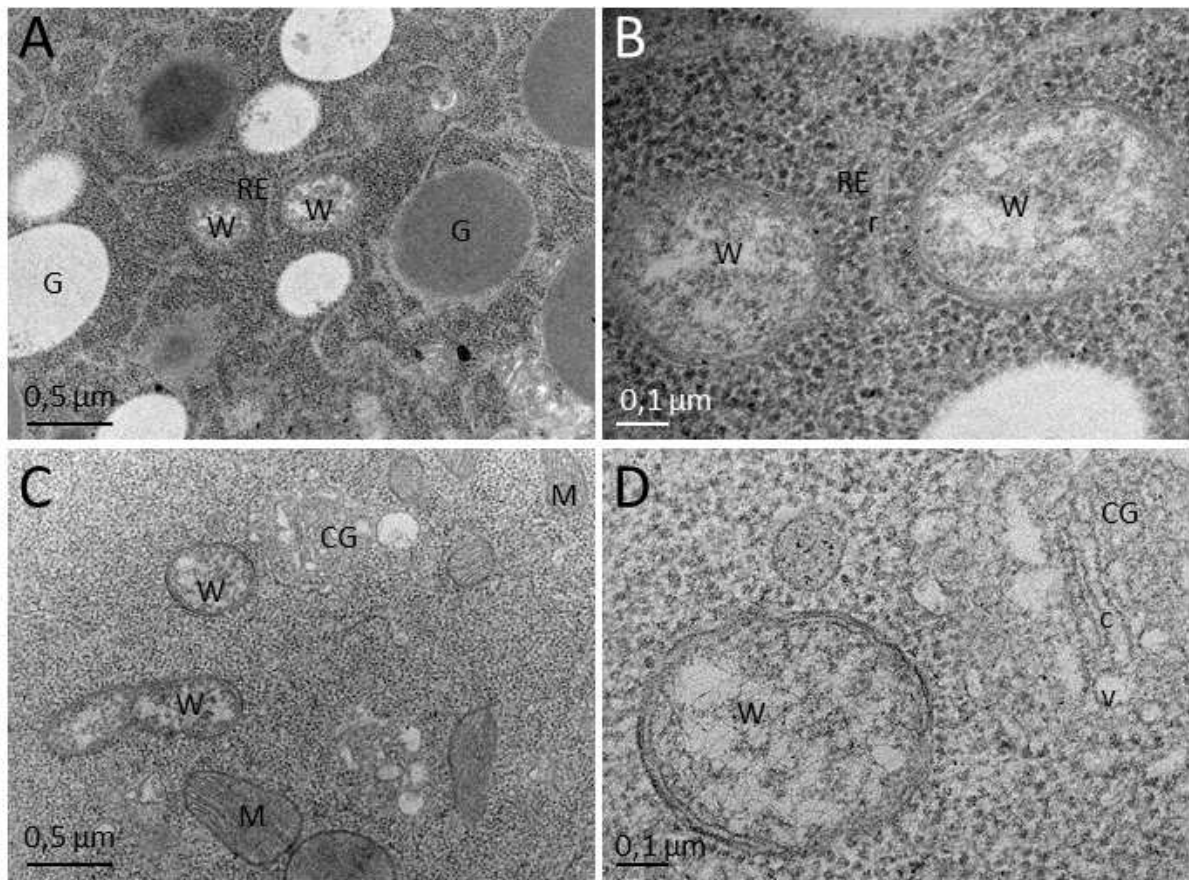


Figura 17. **A.** Ultramicrografia do ovócito de St8 de nove dias de duas wolbachias e vários grãos de Vitelo (G) com eletrodensidades diferentes. **B.** Proximidade de *Wolbachia* (W) com o retículo endoplasmático (RE). Ribossomos (r). **C.** Ultramicrografia de célula nutridora evidenciando uma *Wolbachia* (W) de formato cocoide próxima a um complexo de Golgi (CG). Logo abaixo uma *Wolbachia* em mitose. Mitocôndria (M). **D.** detalhe da aproximação da *Wolbachia* ao Complexo de Golgi (CG), com suas cisternas (c) e vesículas (v).

Também observamos em células semelhantes ao bacteriócitos, wolbachias com formato irregular e secretando vesículas. Esse fenômeno é uma resposta da bactéria ao ambiente da célula hospedeira. Observa-se *Wolbachia* com vesícula ainda

em seu citoplasma (**Fig. 18A**) bem como a bactéria com a vesícula externa a seus envoltórios (**Fig. 18B**).

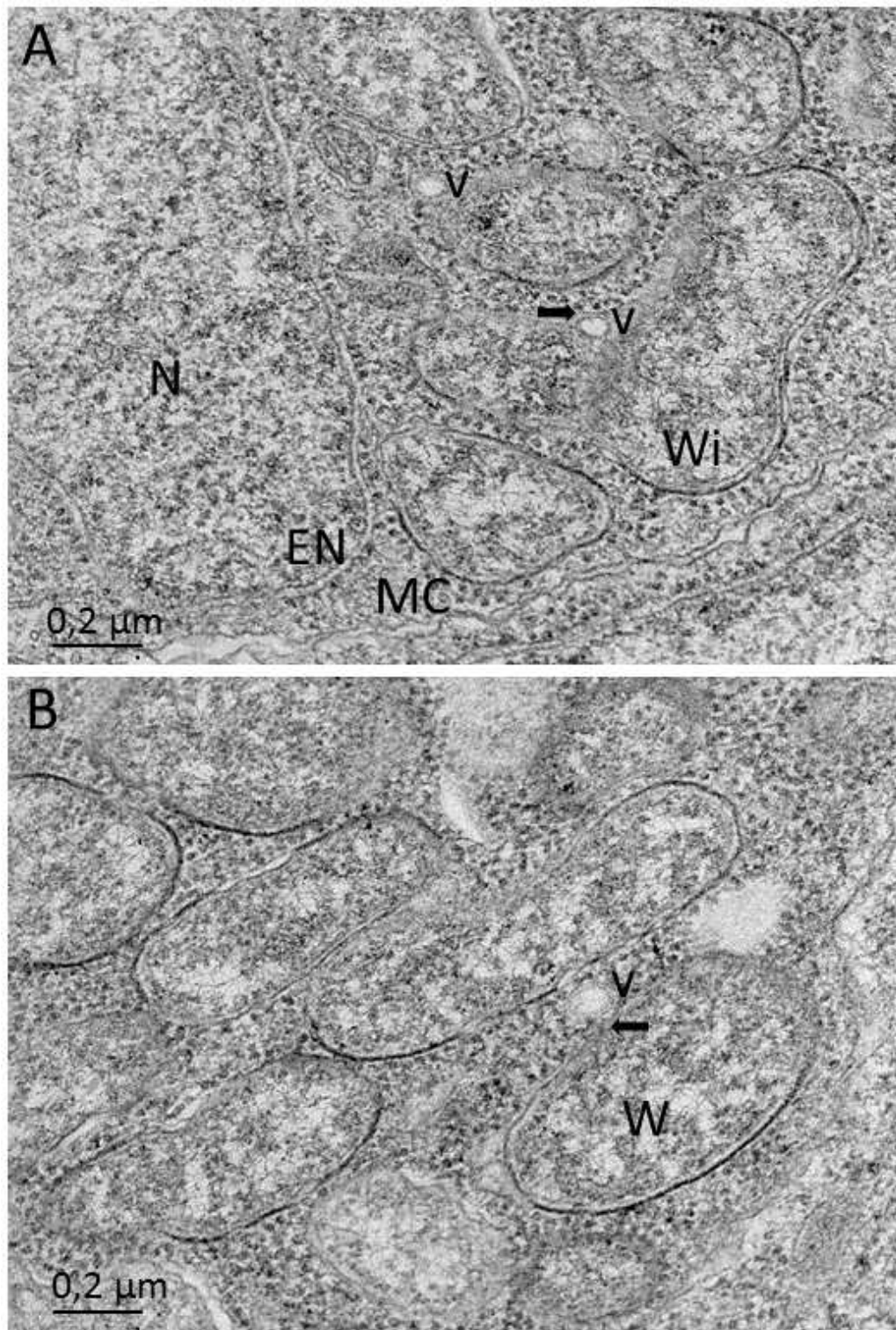


Figura 18. Ultramicrografia de parte de uma célula do germário de St8 de nove dias evidenciando vesículas (v) internas (**A**) e externas (**B**) às wolbachias. Núcleo (N); Envoltório nuclear (EN); *Wolbachia* (W); Membrana citoplasmática (MC). As setas indicam os envoltórios da *Wolbachia*.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que as infecções por *Wolbachia* em *Drosophila prosaltans* (linhagem Pro101) e *Drosophila sturtevanti* (St8) alteram o valor adaptativo das hospedeiras em relação à produção de óvulos. De fato, trabalhos anteriores já mostraram, embora com outras medidas, que a infecção aumenta o valor adaptativo de Pro101 (GUZMAN *et al.* em preparação) enquanto reduz o valor adaptativo de St8 (MOREIRA *et al.*, em preparação). No caso de Pro101, chama a atenção o fato de que muitas fêmeas tratadas apresentaram zero ovos em todas as idades, evidenciado pela **Figura 6**, onde o primeiro quartil coincide com zero (ou seja, pelo menos 25 % das fêmeas não tinham ovos em seus ovários) em cinco, 11, 13 e 15 dias. Esse resultado sugere que o tratamento com antibióticos (ou a retirada de *Wolbachia*) resulta na não produção de ovos em grande parte das fêmeas de Pro 101. Resultados semelhantes foram encontrados em *Drosophila mauritiana* (FAST *et al.* 2011), e em *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) (GUO *et al.*, 2018). Zug & Hammerstein (2015) argumentaram que *Wolbachia* pode utilizar este mecanismo para incrementar a produção de ovos, e com isso, o valor adaptativo do hospedeiro.

A PCR semiquantitativa também mostrou diferenças na relação de *Wolbachia* com as duas espécies de *Drosophila* em estudo. As sequências do *wsp* encontradas em St8 e Pro101 (GUZMAN *et al.* em preparação e MOREIRA *et al.*, em preparação) são filogeneticamente próximas às cepas encontradas por Miller & Riegler (2006) em espécimes de *D. sturtevanti* e *D. prosaltans*, respectivamente. Segundo estes últimos autores, a relação parasita-hospedeiro em *D. prosaltans* deve ser mais antiga que em *D. sturtevanti*, que deve ter sido infectada em um evento recente de transmissão horizontal. Nossos resultados permitem inferir que em St8, onde a infecção é prejudicial, o sistema de defesa do hospedeiro não foi capaz de controlar a intensidade da infecção, que se manteve igualmente alta aos três, nove e 15 dias. Em Pro101, por outro lado, a maior intensidade da infecção de *Wolbachia* (ou mais DNA molde de *Wolbachia*) foi observada em fêmeas de 9 dias, justamente a idade em que apresentaram mais óvulos nos ovários. É importante ressaltar que as fêmeas utilizadas para a extração de DNA não foram as mesmas utilizadas para a contagem de óvulos. Com isso, se aos nove dias há uma produção maior de óvulos em Pro101 e ao mesmo tempo a infecção é aumentada nesse período, podemos inferir que as

bactérias se concentram nas células reprodutivas. Já em St8, o fato de não termos encontrado correlação entre o número de óvulos maduros e a intensidade da infecção pode significar que outros tecidos do hospedeiro também estejam densamente infectados, o que seria mais uma evidência de uma relação prejudicial entre a *Wolbachia* e o hospedeiro. Essa questão deve ser respondida em trabalhos futuros, envolvendo a investigação da infecção em outros tecidos do hospedeiro, que não foi foco do presente trabalho.

A microscopia de fluorescência mostrou claramente a presença de *Wolbachia* em todas as regiões dos ovaríolos nas duas linhagens estudadas. Cabe ressaltar, no entanto, que em ambas foram observadas infecções particularmente altas nos germários, no caso de St8 aos três e aos 15 dias, o que pode indicar uma constante entrada de bactérias por essa região dos ovaríolos. No caso de Pro101, a concentração de bactérias no germário foi maior aos três que aos 15 dias, indicando que a entrada por esta via foi maior em fêmeas mais jovens. Ainda em Pro101, observa-se as bactérias mais espalhadas pelas diferentes regiões dos ovaríolos nas fêmeas de 15 dias. Considerando que cada ovaríolo é composto por regiões de tamanho crescente no sentido anteroposterior (**Fig. 1**), a presença de *Wolbachia* em todas as regiões indica que a bactéria invade os ovários, muito provavelmente pelo germário, e se mantém em suas células ao longo do desenvolvimento ovariano de modo a estar presente no ovócito (SERBUS *et al.*, 2008). Isso garante a passagem da bactéria para a próxima geração, o que é fundamental para a transferência vertical da qual depende para se manter no hospedeiro.

Através do MET, observamos a ultraestrutura da *Wolbachia* em células nutridoras no ovaríolo de ST8 e reconhecemos os três envoltórios típicos de *Wolbachia* (**Fig. 10**). Esses envoltórios são tipicamente encontrados em endossimbiontes bacterianos Gran-negativos, especialmente Rickettsiales, a ordem de proteobactérias na qual está a *Wolbachia*. Os três envoltórios correspondem às duas membranas bacterianas (interna e externa, típicas das bactérias Gran-negativas), e à membrana do vacúolo fagocítico (fagossomo) inicialmente formado a partir da membrana plasmática da célula hospedeira. Fagossomos são bolsas membranosas que se originam pela fagocitose induzida, provocada por *Rickettsia* (SAHNI *et al.*, 2013; CREASEY & ISBERG, 2014). Em geral, os fagossomos têm a função de digerir materiais ou patógenos fagocitados por células especializadas, mas

em infecções por Rickettsiales, essas bolsas membranosas são comumente compreendidas como uma estratégia do endossimbionte para manter-se camuflado do sistema de defesa do inseto hospedeiro (YANO *et al.*, 2008; VALLET-GELY *et al.*, 2008).

A imagem de fluorescência obtida com o microscópio confocal permite visualizar agregados de *Wolbachia* nos germários de St8 e em torno de um único núcleo em uma câmara pré-vitelogênica, sugerindo que o endossimbionte migre para o entorno do núcleo do ovócito. Ferree *et al.* (2005) descreveram a relação da *Wolbachia* com microtúbulos do citoesqueleto e o uso de proteínas motoras, mostrando a migração desse endossimbionte em direção ao núcleo do ovócito. A relação com o citoesqueleto e outras estruturas celulares também foi estudada por Kumar & Valdivia, (2009) e Creasey & Isberg, (2014).

Em relação aos agregados nos germários, o MET revelou a presença de células densamente ocupadas por *Wolbachia*, que guardam muitas semelhanças com células descritas como bacteriócitos. Essas células são em geral associadas a relações mutualísticas, normalmente nutricionais, entre insetos e endossimbiontes (SHIGENOBU *et al.*, 2000; AKMAN *et al.*, 2002). Hosokawa *et al.* (2010) encontraram células similares a bacteriócitos contendo *Wolbachia* nos ovários de *Cimex lectularius* (Hemiptera, Cimicidae). Estes autores consideram que se trata de mutualismo nutricional, uma vez que o tratamento com antibióticos resultou em crescimento mais lento e esterilidade do hospedeiro, que foram neutralizados pela suplementação de vitaminas do complexo B no meio de cultura. Ainda em 2010, Sacchi *et al.* observaram células similares a bacteriócitos nos ovários de *Drosophila melanogaster* e *Zygnidia pulula* (Hemiptera), duas espécies distantes de insetos, que não apresentaram qualquer evidência de mutualismo nutricional, levando os autores a propor que células similares a bacteriócitos podem também estar envolvidas na infecção dos ovários dos insetos para garantir a passagem dos endossimbiontes para a próxima geração.

Bactérias endossimbiontes são parte integral da biologia celular e desenvolvimento dos insetos. Elas são transmitidas verticalmente, e, durante a embriogênese de muitos insetos, invadem células especializadas dos hospedeiros, conhecidas como bacteriócitos (HEDDI *et al.*, 2005). Em alguns casos, os bacteriócitos se concentram em um órgão específico, denominado bacterioma,

localizado no abdome e próximo aos ovários. Sacchi *et al.*, (1985) observaram que em *Blattella germanica* (Blattodea), os bacteriócitos migram do corpo adiposo para uma região próxima aos ovários, onde se aglomeram e posteriormente penetram nos ovariolos e aderem aos ovócitos. Szklarzewicz & Moskal (2001) observaram um processo parecido em *Aleurochiton aceris* (Hemiptera: Aleyrodinea), onde os bacteriócitos, chamados de micetócitos, migram para a região dos ovários, atravessam o epitélio folicular e alcançam a superfície dos ovócitos.

Em estudos utilizando FISH e MET em *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) (GOTTLIEB *et al.*, 2008), *Coelostomidia wairoensis* (Hemiptera: Coelostomidiidae) (DHAMI *et al.*, 2012), *Puto superbus* (Hemiptera: Coccoomorpha) (SZKLARZEWICZ *et al.*, 2018) e outras cochonilhas (MICHALIK *et al.*, 2016), os bacteriócitos, encontrados no abdome e deslocados para os ovários, abrigam, além de *Wolbachia*, outros endossimbiontes. Em 2017, Li *et al.* relataram um evento de transmissão horizontal de *Wolbachia* mediada por plantas de algodão, no qual fêmeas de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), sem *Wolbachia*, foram infectadas pelo contato com as *Wolbachia* que estavam no floema das folhas dessa cultura. Os autores encontraram bacteriócitos densamente preenchidos por *Wolbachia* no abdome das fêmeas e verificaram a infecção na próxima geração, o que os levou a concluir que os bacteriócitos, contendo wolbachias oriundas do sistema digestório, invadiram as células germinativas. Segundo Sacchi *et al.* (2010), o fato de bacteriócitos abrigarem as bactérias nos germários garante o bom funcionamento das outras células, que de outra forma poderia ser comprometido pelas *Wolbachia*. Masson *et al.* (2016) argumentaram que os bacteriócitos são parte de um sistema que protege os simbiontes do sistema de defesa do hospedeiro e ao mesmo tempo controlam a população do simbionte de modo que não se tornem prejudiciais.

Em uma região do germário de St8, observamos pelo menos cinco células semelhantes a bacteriócitos densamente infectadas por *Wolbachia* (**Fig. 12B**). Esses bacteriócitos se encontram no interior do germário, sugerindo que os bacteriócitos (ou as wolbachias) se dirigem para esta região, que contém células germinativas que darão origem às células nutridoras e ao ovócito. De fato, em fases posteriores do desenvolvimento dos ovariolos, não observamos *Wolbachia* em células foliculares, mas em células nutridoras e no ovócito, reforçando a hipótese que essas bactérias migrem diretamente dos bacteriócitos para as células germinativas. As células

nutridoras e os ovócitos estão interconectados por pontes citoplasmáticas. Essas pontes garantem a passagem do citoplasma, incluindo os endossimbiontes, das células nutridoras até o ovócito, fenômeno iniciado nas câmaras pré-vitelogênicas e intensificado nas vitelogênicas.

Encontramos indícios de que *Wolbachia* se reproduz ao longo de todo o desenvolvimento dos ovaríolos. Bactérias em forma de bastonete foram observadas nos bacteriócitos, nas células nutridoras da região pré-vitelogênica e nos ovócitos em início de vitelogênese. Durante a divisão, a bactéria passa da forma cocoide para a forma de bastonete, que é seguida pela constrição citoplasmática e depois a divisão propriamente dita.

Dentro dos bacteriócitos, observamos *Wolbachia* de tamanho relativamente aumentado e com eletrodensidade menor que as demais (**Fig. 16**). Segundo Masson *et al.* (2016), durante o controle da infecção, que é feita pela atividade bacteriostática de peptídeos produzidos pelos bacteriócitos, é comum observar o aumento do tamanho das bactérias. Essas observações estão de acordo com a argumentação de Masson *et al.* (2016), em que os bacteriócitos protegem os simbiontes ao mesmo tempo que controlam a sua população.

Nossas imagens de MET revelaram ainda a interação de *Wolbachia* com vários componentes das células hospedeiras, como o envoltório nuclear (**Fig. 16A**), mitocôndrias (**Fig. 16B**), retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Essas associações são atribuídas à construção e manutenção do fagossomo, que requerem a interação com componentes fundamentais da célula hospedeira, como a via secretora formada por retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (VORONIN *et al.*, 2004 ; CHO *et al.*, 2011 ; FISCHER *et al.* 2014; FATTOUH *et al.* 2019) ou mitocôndrias (SINAI *et al.*, 1997). O contato com o retículo pode indicar a transferência de nutrientes do hospedeiro para a *Wolbachia* ou mesmo a transferência de toxinas e outras secreções da bactéria para a célula hospedeira, utilizando a rede de túbulos do retículo (ROY, 2002).

Nossos resultados sugerem também que *Wolbachia* transfere substâncias diretamente para o citoplasma de células hospedeiras de St8. Foram visualizadas vesículas, a serem secretadas e já secretadas pela bactéria. A secreção extracelular de produtos é o principal mecanismo pelo qual bactérias Gram-negativas se

comunicam e interagem com as células hospedeiras. As secreções dessas vesículas desempenham papéis no estabelecimento de um nicho de colonização, modulando a defesa e a resposta do hospedeiro (KUEHN & KESTY, 2006).

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem refletir a respeito da interação entre *Wolbachia*, um endossimbionte que como tal depende de uma célula hospedeira para sua sobrevivência e reprodução, e *D. sturtevanti*, um drosofilídeo neotropical que não depende de *Wolbachia* para nenhuma de suas funções vitais, uma vez que há registros de indivíduos não infectados, inclusive no município de Viçosa, coletados em 2019 (MOREIRA *et al.*, em preparação). De fato, a interação entre insetos e *Wolbachia* pode variar de parasitismo a mutualismo, passando por quase todas as nuances entre estes dois extremos (NEWTON & RICE, 2021). Há registros de interações que num período tão curto quanto 20 anos, passaram de prejudiciais a benéficas (WEEKS *et al.* 2007), mostrando que a adaptação da bactéria aos hospedeiros pode ser explicada mais em termos fisiológicos do que propriamente evolutivos.

Nosso estudo está de acordo com a hipótese de que a infecção é danosa em termos de produção de ovos quando comparamos espécimes de St8 infectados e tratados com antibióticos. No entanto, cabe enfatizar que em nenhuma idade a ausência de ovos foi significativa entre as fêmeas infectadas, apesar da redução no número total de ovos (**Figura 5**). Num estudo anterior, Moreira *et al.* (em preparação), quantificou a transmissão vertical da bactéria em St8 e mostrou mais de 95 % de transmissão vertical. De fato, espécimes dessa espécie coletadas no Panamá em 1998 e 1999 hospedam cepas muito similares de *Wolbachia*, muito provavelmente oriundas do mesmo evento de transmissão horizontal que as coletadas em Viçosa em 2015, 2016 e 2019.

Em nosso trabalho, a observação de estruturas similares a bacteriócitos nos germários de fêmeas St8 pode ser o primeiro registro dessas células em ovários de uma *Drosophila* neotropical. Antes desse trabalho, essa estrutura só foi encontrada por Strunov *et al.* (2017), no cérebro de *D. paulistorum*, e por Sacchi *et al.* (2010), nos ovários de *D. melanogaster*. Como esses últimos autores viram a mesma estrutura em insetos muito distintos, podemos predizer que outras espécies de *Drosophila* também podem apresentá-los. A partir de nossos resultados, propomos que a entrada

em bacteriocitos, que se dirigem aos ovários, seja uma estratégia utilizada tanto por endossimbiontes mutualísticos, conforme relata grande parte dos artigos publicados no tema, quanto daqueles que não oferecem benefícios para os hospedeiros. Neste caso, podemos presumir que a *Wolbachia* encontrada em St8 utiliza mecanismos gerais de interação, que evoluíram no sentido de garantir a presença de endossimbiontes sem prejudicar os hospedeiros, conforme proposto por Masson *et al.* (2016). Com isso, essa *Wolbachia*, que aparentemente não fornece qualquer vantagem ao hospedeiro, garante o transporte para a próxima geração manipulando o hospedeiro para assegurar, de modo egoísta, sua própria sobrevivência e reprodução.

5. CONCLUSÕES

- O tratamento com antibióticos reduz o valor adaptativo em St8 e aumenta em Pro101.
- Em St8, a quantidade de bactérias permanece igual dos três aos quinze dias, enquanto em Pro101 há um aumento aos nove dias, que coincide com o período de maior produção de óvulos nessas fêmeas. Esse resultado sugere concentração da infecção nos ovários de Pro101 e infecção generalizada em St8.
- Em St8, a infecção parece estar espalhada por todo o ovariolo, independente da idade das fêmeas enquanto em Pro101 há uma maior concentração nos germários aos três dias que aos 15 dias, o que permite inferir que haja entrada contínua de bactérias nos ovariolos de St8, talvez pela infecção generalizada sugerida para esta linhagem.
- O MET mostrou os três envoltórios de Rickettsiales, ordem à qual as *Wolbachia* pertencem. Junto com o PCR de um gene específico (*wsp*) e as sondas de rRNA 16S específico de *Wolbachia*, este resultado reforça a hipótese de que St8 está de fato infectado pela bactéria.

- O MET mostrou células densamente infectadas por *Wolbachia*, em estruturas similares a bacteriócitos nos germários, o que sugere que as bactérias invadam o tecido reprodutivo por meio dessa célula. Em células das câmaras vitelogênicas como nos ovócitos, as *Wolbachia* se encontravam em menor densidade. Não foram detectadas wolbachias nas células foliculares dos ovariolos, sugerindo que as bactérias se dirigem diretamente às células germinativas.
- Apesar de termos confirmado que a infecção causa prejuízos a St8, chama a atenção a presença de bacteriócitos, que são estruturas típicas de interações mutualísticas com endossimbiontes. Este resultado pode ajudar a explicar porque *Wolbachia* infecta tantas espécies de insetos e porque as filogenias de cepas da bactéria raramente convergem com as filogenias de hospedeiros. Nossa hipótese é a de que *Wolbachia* utiliza sistemas comuns aos hospedeiros para infectar o maior número de espécies possível sem necessariamente co-evoluir com os diferentes grupos, explicando a alta incidência de transmissão horizontal entre espécies.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos, cabe perguntar em estudos próximos, se a infecção por *Wolbachia* pode ter alguma vantagem em termos de proteção contra vírus em seus hospedeiros no ambiente natural. É fato que algumas fêmeas não estão infectadas naturalmente e é fato também que entre 2015 e 2016 a prevalência da infecção era de 100%. Como fizemos apenas comparações entre indivíduos tratados e não tratados da mesma linhagem isofêmea, é possível que essa linhagem já estivesse livre da infecção por vírus por causa da *Wolbachia* e nossa comparação foi feita entre linhagens não acometidas por doenças virais. Com isso, será necessário fazer um estudo de cruzamentos envolvendo uma linhagem infectada e uma não infectada coletadas na mesma população com o objetivo de confirmar o caráter exclusivamente deletério da infecção em St8.

Registramos *Wolbachia* também nos ovários de *D. prosaltans*, como mostra a **figura 19**. Apesar dos poucos registros, encontramos *Wolbachia* nas células

foliculares dessa espécie, enquanto registramos *Wolbachia* principalmente nas células germinativas de *D. sturtevantii*. Devido ao pequeno número de registros obtidos em *D. prosaltans*, ainda não é possível afirmar que se trate de uma diferença consistente. Sabemos, no entanto, que a cepa que infecta *D. sturtevantii* prejudica o hospedeiro (MOREIRA *et al.*, em preparação), enquanto a que infecta *D. prosaltans* parece aumentar o valor adaptativo das fêmeas infectadas (GUZMAN *et al.* em preparação). A contagem dos óvulos nos ovários feita no presente trabalho confirma esses resultados. Os diferentes fenótipos induzidos em *D. sturtevantii* e *D. prosaltans* permitem indagar sobre diferenças no nível de infecção dos ovários bem como das estratégias que garantem a presença da bactéria na próxima geração.

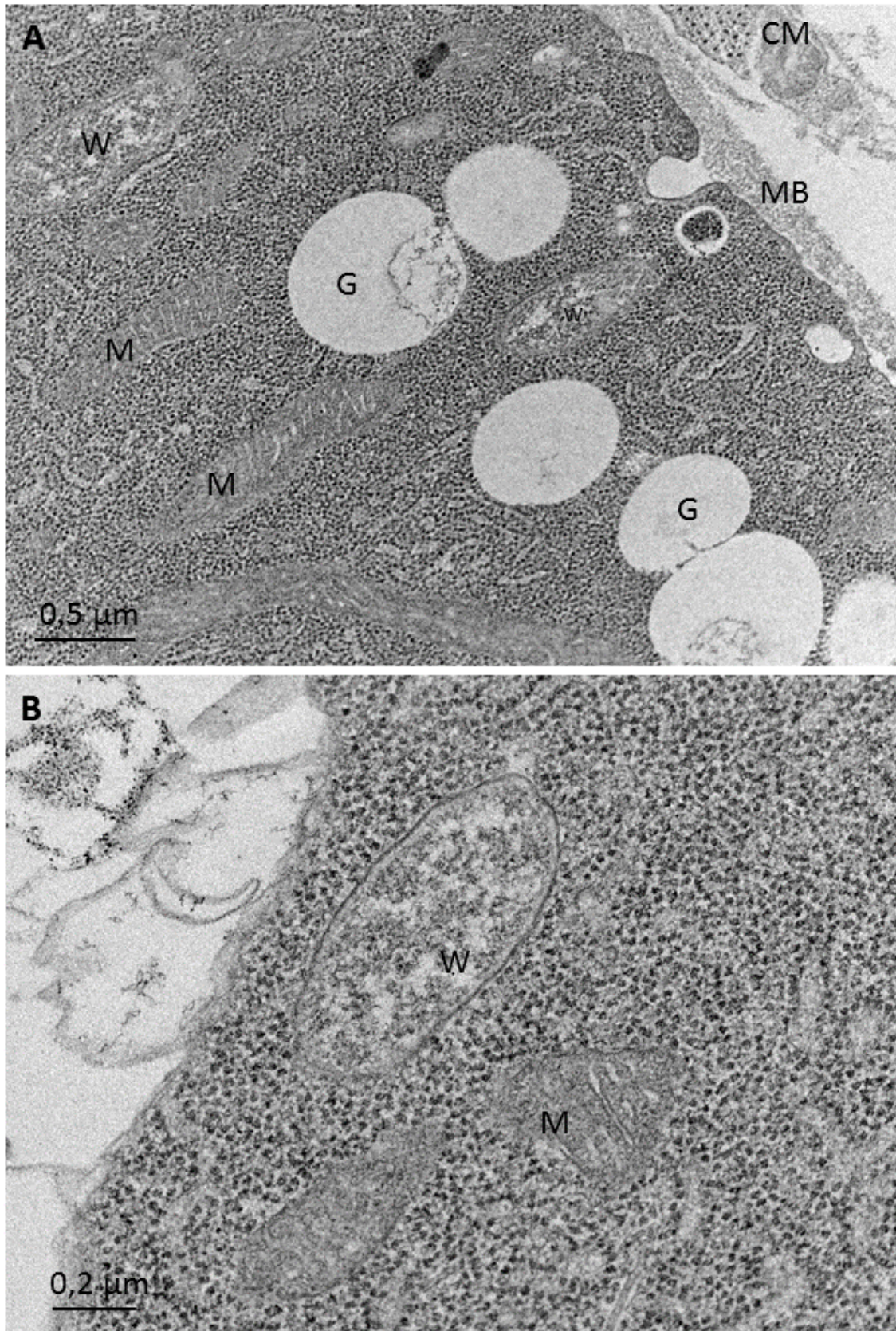


Figura 19 Ultramicrografia de células foliculares de câmara vitelogênica em Pro101 de nove dias. Em **A** observa-se duas wolbachias com formato de bastonete. *Wolbachia* (W); Célula muscular (CM); Membrana basal (MB); Mitocôndria (M) e Grãos de vitelo (G). Em **B** observa-se uma *Wolbachia* próxima a uma mitocôndria.

7. REFERÊNCIAS

- AKMAN, L., YAMASHITA, A., WATANABE, H. OSHIMA, K., SHIBA, T., HATTORI, M., AKSOY, S. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. **Nat Genet.**, 32, 402–407, 2002.
- ARTHOFFER, W., RIEGLER, M., SCHNEIDER, D., KRAMMER, M., MILLER, W.J., STAUFFER, C. Hidden *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). **Mol. Ecol.** 18, 3816–30, 2009.
- BICUDO, H. E. M. C. Reproductive Isolation in the *Saltans* Group of *Drosophila*. I. The *Saltans* Subgroup. **Genetica**, 44 (3): 313–29, 1973.
- BROWN, A.N., LLOYD, V. K. Evidence for horizontal transfer of *Wolbachia* by a *Drosophila mite*. **Exp. Appl. Acarol.** 66, 301–11, 2015.
- BUCHNER P. (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. John Wiley and Sons: New York, NY, USA.
- CHAVES, N. B., TIDON, R. Biogeographical aspects of drosophilids (diptera, drosophilidae) of the brazilian savanna. **Revista Brasileira de Entomologia** 52, 2008.
- CHO, K. O., KIM, G. W., LEE, O. K. *Wolbachia* bacteria reside in host Golgi-related vesicles whose position is regulated by polarity proteins. **PLoS ONE**, 6(7): e22703, 2011.
- CHROSTEK, E., MARIALVA, M., ESTEVES, S., WEINERT, L., MARTINEZ, J., JIGGINS, F., TEIXEIRA, L. *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. **PLoS Genet** 9, 2013.
- CREASEY, E. A., ISBERG, R. R. Maintenance of Vacuole Integrity by Bacterial Pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, 17C (1):46-52, 2014.
- DA MATA, R. A., MCGEOCH, M., TIDON, R. Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the brazilian savanna. **Biodiversity and Conservation**17, 2008.
- DEEHAN, M., LIN, W., BLUM, B., EMILI, A., FRYDMAN, H. Intracellular Density of *Wolbachia* Is Mediated by Host Autophagy and the Bacterial Cytoplasmic Incompatibility Gene *cifB* in a Cell Type-Dependent Manner in *Drosophila melanogaster*. **mBio**, 12 (1), e02205-20, 2021
- DHAMI, M. K., TURNER, A. P., DEINES, P., BEGGS, J. R., TAYLOR, M. W. Ultrastructural and molecular characterization of a bacterial symbiosis in the ecologically important scale insect family Coelostomidiidae. **FEMS Microbiol Ecol.**, 81(3):537-46, 2012.
- DOBZHANSKY, T., PAVAN, C. Local and seasonal variations in relative frequencies of species of *Drosophila* in Brazil. **Journal of Animal Ecology**19, 1–14, 1950.

- DOBZHANSKY, T., STREISINGER, G. Experiments on Sexual Isolation in *Drosophila*: II. Geographic Strains of *Drosophila Prosaltans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 30 (11): 340–45, 1944.
- DUNNING HOTOPP, J.C., CLARK, M.E., OLIVEIRA, D.C., FOSTER, J.M., FISCHER, P., MUÑOZ TORRES, M.C., GIEBEL, J.D., KUMAR, N., ISHMAEL, N., WANG, S., INGRAM, J., NENE, R.V., SHEPARD, J., TOMKINS, J., RICHARDS, S., SPIRO, D.J., GHEDIN, E., SLATKO, B.E., TETTELIN, H., WERREN, J.H. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. **Science** 317, 1753–6, 2007.
- FAST, E. M.; TOOMEY, M. E.; PANARAM, K.; DESJARDINS, D.; KOLACZYK, E. D.; FRYDMAN, H. M. *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche. **Science**, 334 (6058), 990–2, 2011.
- FATTOUH, N., CAZEVIEILLE, C., LANDMANN, F. *Wolbachia* endosymbionts subvert the endoplasmic reticulum to acquire host membranes without triggering ER stress. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007218>, 2019.
- FERREE, P. M., FRYDMAN, H. M., LI, J. M., CAO, J., WIESCHAUS, E., SULLIVAN, W. *Wolbachia* Utilizes Host Microtubules and Dynein for Anterior Localization in the *Drosophila* Oocyte. **Plos Pathog**, 1(2): e14, 2005.
- FISCHER, K., BEATTY, W.L., WEIL, G.J., FISCHER, P.U. High pressure freezing/freeze substitution fixation improves the ultrastructural assessment of *Wolbachia* endosymbiont-filarial nematode host interaction. **PLoS ONE**, 9: e86383, 2014.
- FORD, S. A., ALLEN, S.L., OHM, J.R., SIGLE, L. T., SEBASTIAN, A., ALBERT, I., CHENOWETH, S. F., MCGRAW, E. A. Selection on *Aedes aegypti* alters *Wolbachia*-mediated dengue virus blocking and fitness. **Nat Microbiol**, 4, 1832–1839, 2019.
- FRY, A. J., PALMER, M. R., RAND, D. M. Variable Fitness Effects of *Wolbachia* Infection in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, 93 (4): 379–89, 2004.
- FRYDMAN, H., LI, J., ROBSON, D., WIESCHAUS, E. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. **Nature** 441, 509–512, 2006.
- GERTH, M., RÖTHE, J., BLEIDORN, C. Tracing horizontal *Wolbachia* movements among bees (*Anthophila*): a combined approach using multilocus sequence typing data and host phylogeny. **Mol. Ecol.** 22, 6149–62, 2013.
- GLASER, R., MEOLA, M. The Native *Wolbachia* Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. **PloS One** 5, 2010.
- GOTTLIEB, Y., GHANIM, M., GUEGUEN, G., KONTSEDALOV, S., VAVRE, F., FLEURY, F., ZCHORI-FEIN, E. Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. **FASEB J.**, 22(7):2591-9, 2008.

- GOTTSCHALK, M. S., DE TONI, D. C., VALENTE, V. L., HOFMANN, P. R. Changes in Brazilian Drosophilidae (diptera) assemblages across an urbanisation gradient. **Neotropical Entomology** 36, 848–862, 2007.
- GUZMAN, Y. C. S., MOREIRA, M. M., BOUZADA-DIAS, L., YOTOKO, K. *Fitness benefits and Wolbachia* settling strategies of wAu-like infection in Neotropical *Drosophila* (Saltans subgroup). Em preparação.
- GUO, Y., HOFFMANN, A. A., XU X. Q., ZHANG X., HUANG H. J., JU J. F., GONG J. T., HONG X. Y. *Wolbachia*-induced apoptosis associated with increased fecundity in *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). **Insect Mol Biol**, 27(6):796-807, 2018.
- HEDDI, A., GRENIER, A.M., KHATCHADOURIAN, C., CHARLES, H., NARDON, P. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. **Proc Natl Acad Sci**, 96: 6814–6819, 1999.
- HEDDI, A., VALLIER, A., ANSELME, C., XIN, H., RAHBE, Y., WÄCKERS, F. Molecular and cellular profiles of insect bacteriocytes: mutualism and harm at the initial evolutionary step of symbiogenesis. **Cell Microbiol**, 7(2):293-305, 2005.
- HEDGES, L., BROWNLIE, J., O'NEILL, S., JOHNSON, K. *Wolbachia* and virus protection in **Insects Science** 322, 2008.
- HIMLER, A. G., ADACHI-HAGIMORI, T., BERGEN, J. E., KOZUCH, A., KELLY, S. E., TABASHNIK, B. E., CHIEL, E., DUCKWORTH, V.E., DENNEHY, T. J., ZCHORIFEIN, E., HUNTER, M. S. Rapid Spread of a Bacterial Symbiont in an Invasive Whitefly Is Driven by Fitness Benefits and Female Bias. **Science**. 8, 332(6026):254-6. 2011.
- HOENIGSBERG, H. F., SANTIBANEZ, S. K.. 1960. Intraspecific Sensory Discrimination in *Drosophila Aequinoctialis* Dobzhansky and *Drosophila Prosaltans* Duda. **Zeitschrift Für Tierpsychologie**, 17 (2): 133–40,1960.
- HOSOKAWA, T., KOGA, R., KIKUCHI, Y., MENG, X. Y., FUKATSU, T. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. **PNAS** 107 (2): 769-774, 2010.
- JIGGINS, F. M., HURST, G. D. Microbiology Rapid insect evolution by symbiont transfer. **Science**. 8, 332(6026):185-6. 2011.
- KING, R. C. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. **Academic Press, New York**, 227 pp., 1970.
- KOUKOU, K., PAVLIKAKI, H., KILIAS, G., WERREN, J. H., BOURTZIS, K., ALAHOTIS, S. N. Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. **Evolution**, 60(1), 87–96, 2006.
- KUEHN, M. J., KESTY, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host–pathogen interaction. **Genes & Development**, 19:2645–2655, 2006.
- KUMAR, Y., VALDIVIA, R. H. Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. **Cell Host Microbe**, 5(6):593-601, 2009.

- LI, S. J., AHMED, M. Z., LV, N., SHI, P. Q., WANG, X. M., HUANG, J. L., QIU, B. L. Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. **The ISME Journal**. 11, 1019–1028, 2017.
- LI, Y.-Y. Y., FLOATE, K. D., FIELDS, P. G., PANG, B. –P. P. Review of Treatment Methods to Remove *Wolbachia* Bacteria from Arthropods. **Symbiosis**, 62, 1–15, 2014.
- LOUIS, C., NIGRO, L. Ultrastructural evidence of *Wolbachia rickettsiales* in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility. **Journal of Invertebrate Pathology**, 54, 39-44, 1989.
- MACHTELINCKX, T., VAN LEEUWEN, T., VANHOLME, B., GEHESQUIÈRE, B., DERMAUW, W., VANDEKERKHOVE, B., GHEYSEN, G. AND DE CLERCQ, P. *Wolbachia* induces strong cytoplasmic incompatibility in the predatory bug *Macrolophus pygmaeus*. **Insect Molecular Biology**, 18: 373-381, 2009.
- MAGALHÃES, L. E. Notes on the Taxonomy, Morphology, and Distribution of the *Saltans* Group of *Drosophila*, with Descriptions of Four New Species. **Studies in Genetics**, 2, 135–54, 1962.
- MAGALHÃES, L. E., BJÖRNBERG, A. J. S. Estudo Da Genitália Masculina de *Drosophila* Do Grupo *Saltans* (Diptera). **Revista Brasileira de Biologia**, 17 (4): 435–50, 1957.
- MASSON, F., ZAIDMAN-RÉMY, A., HEDDI, A. Antimicrobial peptides and cell processes tracking endosymbiont dynamics. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, 371(1695), 2016.
- MATEOS, M., CASTREZANA, S. J., NANKIVELL, B. J., ESTES, A. M., MARKOW, T. A., MORAN, N. A. Heritable endosymbionts of *Drosophila*. **Genetics** 174(1), 363–376, 2006.
- MICHALIK, K., SZKLARZEWICZ, T., KALANDYK-KOŁODZIEJCZYK, M., JANKOWSKA, W., MICHALIK, A. Bacteria belonging to the genus *Burkholderia* are obligatory symbionts of the eriococcids *Acanthococcus aceris* Signoret, 1875 and *Gossyparia spuria* (Modeer, 1778) (Insecta, Hemiptera, Coccoidea). **Arthropod Struct Dev.**, 45(3):265-72, 2016.
- MILLER, W. J., EHRMAN, L., SCHNEIDER, D. Infectious speciation revisited: Impact of symbiont depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. **PLoS Pathogens**, (6) 12, e1001214, 2010.
- MILLER, W. J., RIEGLER, M. Evolutionary dynamics of wAu-like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. **Appl. Environ. Microbiol** 72, 826–35, 2006.
- MIN, K. T., BENZER, S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. **PNAS U S A**, 94(20):10792-10796, 1997
- MONTE SIÃO, J., F., MARTINS, L. A. P. Dobzhansky and Dreyfus's Group: The Introduction of Natural Population Genetics Studies in Brazil (1943–1960). **Perspectives on Science** 28 (2):244-276, 2020.

- MOREIRA, M. M., GUZMAN, Y.C.S., DIAS, L.P.B., ALMEIDA, J.P.P., YOTOKO, K. Em preparação. Stochastic and deterministic mechanisms modulating *Wolbachia* prevalence in *Drosophila sturtevantii*.
- MORROW, J. L., FROMMER, M., ROYER, J.E., SHEARMAN, D. C., RIEGLER, M. *Wolbachia* pseudogenes and low prevalence infections in tropical but not temperate Australian tephritid fruit flies: manifestations of lateral gene transfer and endosymbiont spillover? **BMC Evol. Biol.** 15, 202, 2015.
- NEWTON, I. L. G., RICE, D. W. The Jekyll and Hyde Symbiont: Could *Wolbachia* Be a Nutritional Mutualist? **Journal of Bacteriology**, 202(4), 2020.
- NIKOH, N., HOSOKAWA, T., MORIYAMA, M., OSHIMA, K., HATTORI, M., & FUKATSU, T. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111(28), 10257–10262, 2014.
- OSBORNE, S., LEONG, Y., O'NEILL, S., JOHNSON, K. Variation in Antiviral Protection Mediated by Different *Wolbachia* Strains in *Drosophila simulans*. **Plos Pathog** 5, 2009.
- ONO, M., BRAIG, K. R., MUNSTERMANN, L. E., FERRO, C., O'NEILL, S. L. *Wolbachia* Infections of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). **J. Med. Entomol.**, 38, 237-241, 2001.
- PIMENTEL, A. C., CESAR, C. S., MARTINS, M., & COGNI, R. The Antiviral Effects of the Symbiont Bacteria *Wolbachia* in Insects. **Frontiers in immunology**, 11, 626329, 2021.
- POINSOT, D., MERÇOT, H. *Wolbachia* Infection in *Drosophila simulans*: Does the Female Host Bear a Physiological Cost? **Evolution**, 51 (1): 180–86, 1997.
- ROY, C. R. Exploitation of the endoplasmic reticulum by bacterial pathogens. **Trends in Microbiology**, 10, 418–424, 2002.
- SACCHI, L., GENCHI, M., CLEMENTI, E., NEGRI, I., ALMA, A., OHLER, S., SASSERA, D., BOURTZIS, K., BANDI, C. Bacteriocyte-like cells harbour *Wolbachia* in the ovary of *Drosophila melanogaster* (Insecta, Diptera) and *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera). **Tissue and Cell**, 42(5):328-33, 2010.
- SACCHI, L., GRIGOLO, A., LAUDANI, U. Behavior of Symbionts during Oogenesis and Early Stages of Development in the German Cockroach, *Blattella germanica* (Blattodea). **Journal of Invertebrate Pathology**, 46, 139-152, 1985.
- SAHNI, S. K., NARRA, H. P., SAHNI, A., WALKER, D. H. Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. **Future Microbiol**, 8(10):1265-1288, 2013.
- SCHILTHUIZEN, M., STOUTHAMER, R. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma wasps*. **Proc. Biol. Sci.**, 264, 361–6, 1997.
- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J., WHITE, D. J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P.,

- CARDONA, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, 9(7), 676-682, 2012.
- SCHNEIDER, D. I., EHRMAN, L., ENGL, T., KALTENPOTH, M., HUA-VAN, A., LE ROUZIC, A., MILLER, W. J. Symbiont-Driven Male Mating Success in the Neotropical *Drosophila paulistorum* Superspecies. **Behavior Genetics**, 49(1), 83–98. 2019.
- SCHNEIDER, D. I., KLASSON, L., LIND, A. E., MILLER, W. J. More than fishing in the dark: PCR of a dispersed sequence produces simple but ultrasensitive *Wolbachia* detection. **BMC Microbiol.** 14, 121, 2014.
- SERBUS, L. R., CASPER-LINDLEY C., LANDMANN F., SULLIVAN, W. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. **Annu Rev Genet.** 42:683-707, 2008.
- SHIGENOBU, S., WATANABE, H., HATTORI, M., SAKAKI, Y., ISHIKAWA, H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera sp.* **APS Nature**, 407:81–86, 2000.
- SINAI, A. P., WEBSTER, P. JOINER, K. A. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. **Journal of Cell Science**, 110, 2117–2128, 1997.
- STRUNOV, A., KISELEVA, E. *Drosophila melanogaster* brain invasion: pathogenic *Wolbachia* in central nervous system of the fly. **Insect Sci**, 23(2): 253-64. 2014.
- STRUNOV, A., SCHNEIDER, D. I., ALBERTSON, R., MILLER, W. J. Restricted distribution and lateralization of mutualistic *Wolbachia* in the *Drosophila* brain. **Cellular Microbiology** 19(1), e12639, 2017.
- SZKLARZEWICZ, T., KALANDYK-KOŁODZIEJCZYK, M., MICHALIK, K. JANKOWSKA, W., MICHALIK, A. Symbiotic microorganisms in *Puto superbus* (Leonardi, 1907) (Insecta, Hemiptera, Coccoomorpha: Putoidea). **Protoplasma**, 255, 129–138, 2018.
- SZKLARZEWICZ, T., MOSKAL, A. Ultrastructure, distribution, and transmission of endosymbionts in the whitefly *Aleurochiton aceris* Modeer (Insecta, Hemiptera, Aleyrodinea). **Protoplasma**, 218. 45-53, 2010.
- TEIXEIRA, L., FERREIRA, A., ASHBURNER, M. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. **Plos Biol.** 6, 2008.
- TOOMEY, M. E., PANARAM, K., FAST, E. M., BEATTY, C., FRYDMAN, H. M. Evolutionarily conserved *Wolbachia*-encoded factors control pattern of stem-cell niche tropism in *Drosophila* ovaries and favor infection. **PNAS**, 110 (26), 10788-10793, 2013.
- VALLET-GELY, I., LEMAITRE, B., BOCCARD, F. Bacterial strategies to overcome insect defences. **Nat Rev Microbiol.**, 6(4):302-13, 2008.
- VORONIN, D., COOK, D. A. N., STEVEN, A., TAYLOR, M. J. Autophagy regulates *Wolbachia* populations. **PNAS**, 109 (25) E1638-E1646, 2012.

- VORONIN, D. A., DUDKINA, N. V., KISELEVA, E. V. A new form of symbiotic bacteria *Wolbachia* found in the endoplasmic reticulum of early embryos of *Drosophila melanogaster*. **Dokl Biol Sci**, 396, 227–229, 2004.
- WEEKS, A. R., TURELLI, M., HARCOTBE, W.R., REYNOLDS, K.T., HOFFMANN, A. A. From Parasite to Mutualist: Rapid Evolution of *Wolbachia* in Natural Populations of *Drosophila*. **PLoS Biol**, 5(5): e114, 2007.
- WERREN, J.H., BALDO, L., CLARK, M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nat. Rev. Microbiol.** 6, 741–51, 2008.
- WERREN, J.H., ZHANG, W., GUO, L.R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proc. R. Soc. Lond. B** 261, 55-71, 1995.
- WONG, Z. S., HEDGES, L. M., BROWNLIE, J. C., JOHNSON, K. N. *Wolbachia*-Mediated Antibacterial Protection and Immune Gene Regulation in *Drosophila*. **PLoS ONE**, 6(9) e 25430, 2011.
- WRIGHT, J. D., BARR, A. R. The ultrastructure and symbiotic relationships of *Wolbachia* of mosquitoes of the *Aedes scutellaris* group. **Journal of Ultrastructure Research**, 72 (1), 52-64, 1980.
- WRIGHT, J. D., SJOSTRAND, F. S., PORTARO, J. K., BARR, A. R. The ultrastructure of the rickettsia-like microorganism *Wolbachia pipientis* and Associated virus-like bodies in the mosquito *Culex pipiens*. **Journal of Ultrastructure Research**, 63 (1), 79-85, 1978.
- YANO, T., MITA, S., OHMORI, H., OSHIMA, H., FUJIMOTO, Y., UEDA, R., TAKADA, H., GOLDMAN, W. E., FUKASE, K., SILVERMAN, N., YOSHIMORI, T., KURATA, S. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. **Nat Immunol**, 9, 908–916, 2008.
- ZEH, J. A., ZEH, D. W. The Evolution of Polyandry I: Intragenomic Conflict and Genetic Incompatibility. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 263 (1377): 1711–17, 1996.
- ZHOU, W., ROUSSET, F., O'NEIL, S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. **Proc Biol Sci**. 265(1395):509-515, 1998.
- ZHUKOVA, M. V., VORONIN, D. A., KISELEVA, E. V. High temperature initiates changes of *Wolbachia* ultrastructure in the ovaries and early embryos of *Drosophila melanogaster*. **Tsitologiya**, 50(12):1050-60, 2008.
- ZUG, R., HAMMERSTEIN, P. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. **Biol Rev**, 90: 89-111, 2015.