

**Factores reguladores de la densidad de
Wolbachia en poblaciones argentinas de mosquitos
vectores de patógenos.**

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Naturales.

LIC. CHUCHUY, AILEN

LA PLATA, 2022

DIRECTORAS:

MICIELI, MARÍA VICTORIA

RODRIGUERO, MARCELA SILVINA

LUGAR DE TRABAJO: **CENTRO DE ESTUDIOS PARASITOLÓGICOS Y
DE VECTORES (CEPAVE), (UNLP-CONICET).**



Índice

Resumen en español	1
Resumen en inglés	3
0. Introducción general	5
0.1. Estrategias de control de culícidos.....	7
0.2. <i>Wolbachia</i> , una herramienta para el biocontrol de mosquitos	9
0.3. Estrategias reproductivas de <i>Wolbachia</i> en artrópodos	10
0.3.1. Matanza masculina (androcidio)	10
0.3.2. Partenogénesis telitóquica	11
0.3.3. Feminización	11
0.3.4. Incompatibilidad Citoplasmática (IC)	12
0.4. Diversidad de <i>Wolbachia</i>	14
0.5. Transferencia horizontal: capacidad de <i>Wolbachia</i> para cambiar de una especie hospedadora a otra.....	16
0.6. Estrategias de control mediadas por <i>Wolbachia</i>	17
0.7. Protección antiviral mediada por <i>Wolbachia</i> en mosquitos	20
0.8. Objetivos específicos.....	26
0.9. Hipótesis de trabajo	26
1. Capítulo 1. Detección de <i>Wolbachia</i> en poblaciones naturales de <i>Aedes albifasciatus</i>, <i>Aedes fluviatilis</i>, <i>Aedes albopictus</i> y complejo <i>Culex pipiens</i> de Argentina	27
1.1. Introducción	27
1.1.1. Infección con <i>Wolbachia</i> en poblaciones naturales de mosquitos	27
1.1.2. Antecedentes en Argentina	30
1.2. Materiales y Métodos	34
1.2.1. Descripción del área de muestreo	34
1.2.2. Colección de culícidos	35
1.2.2.1. <i>Aedes albifasciatus</i>	35
1.2.2.2. Complejo <i>Culex pipiens</i> y <i>Strelkovimermis spiculatus</i>	37

1.2.2.3. <i>Aedes albopictus</i> y <i>Aedes fluviatilis</i>	40
1.2.3. Extracción de ADN de mosquitos	42
1.2.4. Identificación del complejo <i>Culex pipiens</i> a nivel específico.....	42
1.2.5. Detección de <i>Wolbachia</i>	44
1.2.5.1. Análisis de datos	45
1.2.6. Identificación de cepas de <i>Wolbachia</i> y análisis filogenético	45
1.3. Resultados	48
1.3.1. Identificación a nivel específico del complejo <i>Culex pipiens</i>	48
1.3.2. Detección de <i>Wolbachia</i>	49
1.3.2.1. <i>Aedes albifasciatus</i>	49
1.3.2.2. Complejo <i>Culex pipiens</i> y <i>Strelkovimermis spiculatus</i>	50
1.3.2.3. <i>Aedes fluviatilis</i>	51
1.3.2.4. <i>Aedes albopictus</i>	52
1.3.3. Identificación de cepas de <i>Wolbachia</i> y análisis filogenético	55
1.4. Discusión	58
2. Capítulo 2. Determinación de los niveles de variación de la densidad de <i>Wolbachia</i> de acuerdo al tejido en el que se aloja la infección y la edad del insecto en <i>Aedes albopictus</i>	64
2.1. Introducción	64
2.2. Materiales y Métodos	66
2.2.1. Cuantificación de la densidad de las cepas wAlbA y wAlbB a través de un ensayo de PCR en tiempo real	66
2.2.1.1. Colección de individuos de <i>Aedes albopictus</i>	67
2.2.1.2. Diseño de cebadores de los genes Actina y <i>wsp</i> de las cepas wAlbA y wAlbB. 68	
2.2.1.3. Evaluación del desempeño de los cebadores para PCR en tiempo real a través de PCR de punto final	70
2.2.1.4. Confección de la curva estándar.....	70
2.2.1.5. Ensayo de PCR en tiempo real para la comparación de la densidad bacteriana entre soma y ovario	72
2.2.1.6. Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa wAlbB en función de la longevidad de los machos	73

2.2.1.7. Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de las cepas wAlbA y wAlbB en función de la longevidad de las hembras	74
2.2.1.8. Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de las cepas wAlbA y wAlbB en hembras con alimentación sanguínea vs. hembras alimentadas con pasas de uva	74
2.3. Resultados	75
2.3.1. Cuantificación de la densidad de las cepas wAlbA y wAlbB a través de un ensayo de PCR en tiempo real	75
2.3.1.1. PCR convencional con los cebadores de PCR en tiempo real	75
2.3.1.2. Eficiencia de los cebadores	76
2.3.1.3. Ensayo PCR en tiempo real para la comparación de la densidad bacteriana entre soma y ovario	80
2.3.1.4. Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa wAlbB en función de la longevidad de los machos	81
2.4. Discusión	83
3. Capítulo 3. Influencia de la temperatura ambiental en la prevalencia de la infección con <i>Wolbachia</i> en <i>Aedes fluviatilis</i> y complejo <i>Culex pipiens</i>	86
3.1. Introducción	86
3.2. Materiales y métodos	87
3.2.1. Colecta de mosquitos	87
3.2.2. Extracción de ADN	88
3.2.3. Prevalencia de <i>Wolbachia</i> en las larvas de <i>Aedes fluviatilis</i> y del complejo <i>Culex pipiens</i> según la temperatura.....	88
3.3. Resultados	89
3.3.1. Colecta de individuos	89
3.3.2. Prevalencia de <i>Wolbachia</i> en las larvas de <i>Aedes fluviatilis</i> y del complejo <i>Culex pipiens</i> según la temperatura.....	90
3.4. Discusión	92

4. Capítulo 4: Caracterización biológica y de la competencia vectorial de <i>Aedes albopictus</i> infectado con <i>Wolbachia</i>	94
4.1. Introducción.....	94
4.2. Materiales y métodos.....	96
4.2.1. Mosquitos y recolección de datos ambientales.....	96
4.2.2. Relevamiento de <i>Aedes albopictus</i>	96
4.2.3. Características del ciclo de vida en condiciones de laboratorio y parámetros demográficos	97
4.2.4. Ensayos de competencia vectorial del virus dengue y Chikungunya.....	99
4.3. Resultados.....	100
4.3.1. Relevamiento de <i>Aedes albopictus</i>	100
4.3.2. Características del ciclo de vida en condiciones de laboratorio y parámetros demográficos	101
4.3.3. Ensayo de competencia vectorial del virus dengue y Chikungunya.....	101
4.4. Discusión.....	105
Conclusiones generales y perspectivas futuras	108
Anexos	110
Bibliografía	137
Apéndice	171

Abreviaturas

°C: grados Centígrados

♀: hembra

♂: macho

Ae.: género *Aedes*

An.: género *Anopheles*

BLAST: "Basic Local Alignment Searching Tool"

cm: centímetros

Cq: Ciclo de cuantificación, o *quantification cycle* por sus siglas en inglés

Cx.: género *Culex*

D.: género *Drosophila*

DNA: ácido desoxirribonucleico

DPI: día post-infección

EDTA: etilendiamino-tetraacetato disódico---
Ácido etilendiaminotetraacético, agente quelante

F1: filial 1

g: gramos

IC: Incompatibilidad Citoplasmática

ICB: Incompatibilidad Citoplasmática Bidireccional

ICU: Incompatibilidad Citoplasmática Unidireccional

m s.n.m: metros sobre el nivel de mar

ml: mililitros

MLST: *multilocus system typing*

mm: milímetros

mM: milimolar

nm: nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONGs: Organización No Gubernamental

p/v: peso en volumen

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

rpm: revoluciones por minuto

S.: género *Strelkovimermis*

SBF: suero bovino fetal

TBE: tris-borate-EDTA

Tm: temperatura de fusión

UFP: unidad formadora de placa

µg: microgramos

µl: microlitros

µM: micromolar

χ²: Chi cuadrado

Resumen en español

La creciente expansión de los mosquitos (Diptera: Culicidae) vectores ha convertido a las enfermedades arbovirales, cuyos agentes patogénicos son transmitidos por estos insectos, en una amenaza mundial para la salud pública, lo que lleva a la necesidad urgente del control eficaz de dichas poblaciones. En comparación con las estrategias de control que implican organismos modificados genéticamente o el uso de insecticidas químicos que han generado resistencia en poblaciones de mosquitos, la bacteria intracelular *Wolbachia*, que evita que los virus se repliquen dentro de éstos, se considera una estrategia de biocontrol ecológica, segura para humanos y potencialmente rentable para reemplazar la población objetivo y de esta manera controlar las enfermedades arbovirales. Para proporcionar información que permita comprender hasta qué punto *Wolbachia* podría modular la competencia vectorial e informar sobre la utilidad del uso de infecciones heterólogas (transinfecciones) de esta bacteria para el control biológico se plantearon los siguientes objetivos: (1) Detección de la infección con *Wolbachia* en poblaciones de *Aedes albifasciatus*, *Aedes fluviatilis*, *Aedes albopictus* y complejo *Culex pipiens* de Argentina, determinación de su prevalencia y caracterización molecular de las cepas halladas; (2) Determinación de los niveles de variación de la densidad de *Wolbachia* de acuerdo al tejido en el que se aloja la infección y la edad del insecto en *Ae. albopictus*, (3) Determinación de la influencia de la temperatura ambiental en la prevalencia de la infección con *Wolbachia* y (4) Caracterización biológica y de la competencia vectorial de las especies de importancia sanitaria que se hallen infectadas con *Wolbachia*.

Se llevó a cabo la colecta de individuos de *Ae. albifasciatus* y complejo *Cx. pipiens* en la provincia de Buenos Aires, y *Ae. fluviatilis* y *Ae. albopictus* en la provincia de Misiones. *Aedes albifasciatus* fue la única especie en la que no se detectó la presencia de *Wolbachia*. En las restantes se detectaron cuatro cepas: wAlbA y wAlbB en *Ae. albopictus*, wFlu en *Ae. fluviatilis* y wPip en el complejo *Cx. pipiens*. Todas resultaron fijadas o cercanas a la fijación y se agruparon en el supergrupo B, con excepción de wAlbA, la cual pertenece al supergrupo A. *Aedes albopictus* fue la única en la que se halló un polimorfismo en la infección, detectándose individuos no infectados, con

infección simple (wAlbA o wAlbB) o superinfectados (wAlbA y wAlbB), siendo estos últimos los más frecuentes.

Se determinó la densidad de las cepas de *Wolbachia* de *Ae. albopictus*, revelándose diferencias en cuanto a la localización en los tejidos somático y ovárico de las hembras, y una constancia de la densidad de wAlbB en función de la longevidad de los machos.

Además, se estudió si la temperatura ambiental influye en la prevalencia de *Wolbachia* en larvas de *Ae. fluviatilis* y del complejo *Cx. pipiens*. Los resultados indicaron que no fue posible establecer una relación entre la temperatura y la frecuencia de infección con la bacteria en estas especies.

Por último, se estudiaron los parámetros poblacionales y la competencia vectorial de *Ae. albopictus*, especie de mosquito que presentó un polimorfismo en la infección con *Wolbachia*. La medición de sus parámetros poblacionales indicaron una baja tasa de eclosión de huevos, alta supervivencia larval y mayor longevidad del sexo femenino, el cual también resultó en mayor proporción respecto al masculino; se evaluó la competencia vectorial para los virus dengue y Chikungunya, concluyéndose que *Ae. albopictus* es poco competente para la transmisión de ambos. Estos resultados se consideran un antecedente para evaluar, en estudios futuros, si estos parámetros pueden estar alterados por la presencia de *Wolbachia*.

Esta tesis aportó información sobre las cepas de *Wolbachia* halladas en poblaciones naturales argentinas de mosquitos que pueden ser utilizadas en el futuro en infecciones heterólogas. Además, se incrementó el conocimiento sobre la biología de una población de *Ae. albopictus* infectada con *Wolbachia* en un área de reciente introducción como Argentina.

Resumen en inglés

The increasing spread of mosquito (Diptera: Culicidae) vectors has made mosquito-borne arboviral diseases a global threat to public health, leading to the urgent need for effective control of such populations. In comparison with control strategies involving genetically modified organisms or chemical insecticides that have generated resistance in mosquito populations, the intracellular bacterium *Wolbachia*, which prevents virus replication in mosquitoes, is considered an environmentally friendly, human-safe, and potentially cost-effective biocontrol strategy to replace target populations and thus control arboviral diseases. In order to understand if *Wolbachia* could modulate vector competence leading to the use of heterologous infections (transinfections) of this bacterium for biological control the following objectives were defined: (1) Detection of *Wolbachia* infection in populations of *Ae. Albifasciatus*, *Ae. Fluviatilis*, *Ae. Albopictus* and *Cx. pipiens* complex from Argentina and subsequent determination of its prevalence and typing; (2) Determination of the levels of variation of the density of *Wolbachia* according to the tissue in which the infection is lodged and the age of the insect in *Ae. Albopictus*, (3) Determination of the influence of environmental temperature on the prevalence of infection with *Wolbachia* and (4) Biological characterization and vector competence of the species of sanitary importance found to be infected by *Wolbachia*.

Individuals of *Ae. Albifasciatus* and *Cx. pipiens* complex were collected in the province of Buenos Aires, and *Ae. Fluviatilis* and *Ae. Albopictus* in the province of Misiones. *Aedes albifasciatus* was the only uninfected species. In the remainder, four strains were detected: wAlbA and wAlbB in *Ae. Albopictus*, wFlu in *Ae. Fluviatilis* and wPip in the *Cx. pipiens* complex. All strains were fixed or close to fixation and clustered within supergroup B, with exception of wAlbA, which belonged to supergroup A. *Aedes albopictus* was the only mosquito polymorphic for *Wolbachia* infection, with uninfected, single infected (wAlbA or wAlbB) or superinfected (wAlbA and wAlbB) individuals, the latter being the most frequent.

Wolbachia density comparison between strains of *Ae. Albopictus* revealed differences regarding the location either in the somatic or ovarian tissues of females, and constancy of wAlbB density as a function of male longevity.

In addition, influence of environmental temperature on *Wolbachia* prevalence in larvae of *Ae. Fluviatilis* and the *Cx. pipiens* complex were studied. Results indicated no relationship between temperature and infection frequency in these species.

Finally, population parameters and vector competence of *Ae. Albopictus* were studied. Population parameters were studied and indicated low hatching eggs rates, high larval survival and higher female longevity and a biased sex-ratio toward female. Vector competence for dengue and Chikungunya viruses were evaluated, concluding that *Ae. Albopictus* is mildly competent for transmission of both pathogens. These results provide information for future studies to assess whether these parameters may be modified by the presence of *Wolbachia* infection.

This thesis provided information on *Wolbachia* strains found in natural populations of mosquitoes from Argentina that might be used in heterologous infections in the future. In addition, knowledge about biology of an *Ae. Albopictus* population infected with *Wolbachia* was increased in an area of recent introduction such as Argentina.

0. Introducción General

Los mosquitos son los insectos más peligrosos del mundo, ocasionan entre 700.000 y 2.5 millones de muertes humanas al año. Esto se debe a que son portadores y transmisores de agentes patogénicos (virus y parásitos) causantes de enfermedades devastadoras, siendo la malaria la que produce la mayor cantidad de muertes por año, alrededor de 600.000 personas al año mueren por esta enfermedad (Gates, 2014; Kamerow, 2014). Existen más de 3.500 especies de mosquitos y se encuentran en todas las regiones del mundo excepto la Antártida (Gates, 2014). Entre los parásitos transmitidos por mosquitos se encuentran los nematodos del género *Wuchereria* y *Brugia* que producen filariasis linfática en humanos, *Dirofilaria immitis* Leidy conocida como la filaria del corazón de los perros (Thanchomnang et al., 2013), y el protozoo *Plasmodium* causante de la malaria (Manguin et al., 2010). Aunque se conocen más de 80 virus diferentes transmitidos por mosquitos, la mayoría de los casos en humanos son el resultado de la infección con el virus del dengue y otros *Flavivirus*¹ estrechamente relacionados (Sinkins, 2013). Se estima que el 40% de la población mundial vive en áreas de riesgo de infecciones por dengue en más de 100 países (Jeffries & Walker, 2016). Otras *enfermedades arbovirales*² transmitidas por mosquitos importantes a nivel mundial que representan uno de los principales problemas de salud pública son la fiebre amarilla, fiebre del Valle del Rift, chikungunya, Zika, encefalitis Japonesa y fiebre del Nilo Occidental (Yen & Failloux, 2020; Gubler, 2002).

En la Argentina los vectores que presentan mayor importancia sanitaria son las especies del complejo *Culex pipiens* L. y *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.), siendo las especies del complejo *Cx. pipiens* responsables de la transmisión del virus de la encefalitis de San Luis y fiebre del Nilo Occidental. En cuanto a la encefalitis de San Luis se reportaron casos de infecciones agudas, el brote más grande se reportó en Córdoba durante el año 2005 y luego en el 2011 se registró un brote en San Juan, además se han identificados casos aislados en varias provincias de Argentina (Área de Vigilancia de la Salud–Dirección de Epidemiología., 2015). El virus de la fiebre del Nilo Occidental

¹Género de virus ARN pertenecientes a la familia *Flaviviridae*. Son virus con envoltura que contienen una única cadena de ARN de polaridad positiva. Causa numerosas enfermedades en animales y humanos, las más conocidas son la fiebre amarilla, dengue y fiebre de Zika.

²Causadas por todos los virus que se transmiten al ser humano o a otros vertebrados por ciertas especies de artrópodos hematófagos, especialmente insectos (moscas y mosquitos) y arácnidos (garrapatas).

se reportó por primera vez en 2004 en aves silvestres en múltiples localidades del centro y norte del país (Batallán et al., 2021). Respecto a *Ae. aegypti* es el vector principal en el país del virus dengue, Chikungunya, Zika y fiebre amarilla urbana.

A mediados del siglo XX, las autoridades de salud de los países de América, junto con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), llevaron a cabo importantes campañas de erradicación del mosquito *Ae. aegypti* con el fin de dar respuesta a la epidemia de fiebre amarilla ocurrida entre 1850 y 1870 (Zambrini, 2011). En 1963 fue considerado erradicado de Argentina hasta el año 1986, cuando el Ministerio Nacional de Salud Pública reportó su reinfestación en el norte del país. En 1991 llegó a la región templada del país, donde se lo detectó en Quilmes (provincia de Buenos Aires) (Campos, 1993).

Argentina estuvo libre de dengue por más de 80 años, hasta que el agente patógeno fue reintroducido en 1998 como consecuencia de la importación de casos de dengue de áreas epidémicas de la enfermedad y de un control insuficiente del vector (Natiello et al., 2008). Desde entonces, se han producido tres grandes epidemias de dengue en 2009, 2016 y 2020 durante las cuales se vio afectado el norte y centro del país, habiéndose también detectado brotes en la provincia de Buenos Aires (Boletín Integrado de Vigilancia N°500 - SE24, 2020; Boletín Integrado de Vigilancia N°314 - SE24, 2016; Zambrini, 2011).

Hasta el momento, en la Argentina hubo antecedentes de circulación de los cuatro serotipos de dengue (Boletín Integrado de Vigilancia N°500 - SE24, 2020; Boletín Integrado de Vigilancia N°314 -SE24, 2016). La situación futura de esta enfermedad en Argentina podría empeorar debido a la circulación de más de un serotipo en simultáneo, lo que aumentaría el riesgo de formas graves de dengue en todo el país. Además, durante el año 2016 se registraron brotes de Chikungunya y Zika, principalmente afectando el norte y centro de Argentina (Boletín Integrado de Vigilancia N° 340 – SE51, 2016). Este escenario se puede complejizar aún más dado que, el cambio climático previsto para las próximas décadas aumenta las posibilidades de la expansión de la distribución del vector primario de estos patógenos en el país (Rubio et al., 2020; Zanotti et al., 2015; Vezzani & Carbajo, 2008). A esto se suma la

presencia de *Aedes albopictus* (Skuse) en Argentina, detectado por primera vez en 1998 (Rossi et al., 1999). Este mosquito invasor es nativo de los bosques de Asia y se ha expandido en todo el mundo (Benedict et al., 2007). Aunque este mosquito juega un papel relativamente menor en comparación con *Ae. aegypti* en la transmisión de dengue, su presencia en Argentina implica un riesgo potencial para la salud humana en el contexto epidemiológico de la región con respecto a la circulación y transmisión de dengue, fiebre amarilla y otros arbovirus relacionados, debido a su potencial para actuar como vector puente³ (Gratz, 2004).

0.1. Estrategias de control de culícidos

Actualmente existen vacunas para fiebre amarilla, la cual es ampliamente utilizada y efectiva (WHO, 2014), y para dengue, la cual no es muy efectiva en la seroprotección para los 4 serotipos del virus por lo cual no se recomienda su uso en áreas no endémicas como la Argentina (Schwartz et al., 2015). Asimismo, no existen vacunas para otros arbovirus transmitidos por mosquitos como el virus Zika y Chikungunya, por lo que el tratamiento de los síntomas de dichas enfermedades constituye el único método para reducir la morbilidad o prevenir la mortalidad en pacientes infectados. Esto conduce a que la prevención de la transmisión de dichos virus dependa del control del mosquito vector (Jeffries & Walker, 2016). Si bien el Ministerio de Salud de Argentina, en conjunto con la intervención de los gobiernos provinciales y locales, así como ONGs, unen esfuerzos y recursos para bajar la abundancia de los mosquitos vectores, en algunas regiones del país persisten índices de infestación capaces de desarrollar un brote de las enfermedades anteriormente mencionadas (Bisset Lazcano et al., 2014). La mayoría de las estrategias para el control de mosquitos se basan en el uso de insecticidas químicos, los cuales tienen un efecto no deseado sobre las especies no objetivo y además, aumentan el riesgo de que las especies objetivo desarrollen resistencia (Brühl et al., 2020). Esto ha ocasionado un aumento en el interés de aplicar un manejo integrado de plagas, utilizando controladores biológicos solos o en combinación con insecticidas (Kroeger et al., 2013). Una alternativa segura a los insecticidas químicos para el control de mosquitos son las bacterias entomopatógenas

³ Mosquitos con un patrón de alimentación variable, zoofágicos (que se alimentan con sangre de algún vertebrado no humano) y también con sangre humana (antropofágicos).

Bacillus thuringiensis subsp. *Israelensis* Barjac (Bti) y *Lysinibacillus sphaericus* (Meyer & Neide) (antes *Bacillus sphaericus* o Bs). Estas bacterias son activas contra las etapas larvales de los insectos y actúan liberando toxinas insecticidas y factores de virulencia (Derua et al., 2018; Caragata & Walker, 2012). Debido a la alta especificidad de su toxicidad por las larvas de dípteros, el Bti es seguro para las especies no objetivo, y la salud humana. Además, muestra baja persistencia en el medio ambiente y no registra resistencia en las poblaciones de mosquitos (Despres et al., 2011). Otra alternativa es el uso de peces larvívoros, algunos de los más utilizados se encuentran dentro de los géneros *Gambusia* y *Poecilia* (Nieva et al., 2010). En Argentina fue evaluado el uso de *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns) para el control de estados inmaduros de especies del complejo *Cx. pipiens* en zanjas de desagüe domiciliario (Tranchida et al., 2010).

Un enfoque novedoso relativamente reciente es el uso de la bacteria endosimbiótica *Wolbachia pipientis* Hertig (de aquí en más "*Wolbachia*", como se denomina a esta especie corrientemente en la literatura por pertenecer a un género monotípico). Existen dos formas de uso de esta bacteria en estrategias de control: la supresión de la población del vector mediante la *Técnica del Insecto Incompatible (TII)* y la *sustitución de la población del vector por individuos infectados con Wolbachia* (Yen & Failloux, 2020). Ambas estrategias se desarrollan con mayor detalle en el apartado *0.6. Estrategias de control mediadas por Wolbachia*. En los últimos años, el biocontrol basado en *Wolbachia* se ha convertido en un método muy prometedor porque es amigable con el ambiente, seguro para los humanos y potencialmente rentable (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011).

Hace más de 10 años existe un proyecto llamado "**World Mosquito Program**" (<https://www.worldmosquitoprogram.org/>) (y conocido en sus inicios como "**Eliminate Dengue**"), el cual utiliza la bacteria *Wolbachia* para prevenir la transmisión del virus dengue mediante la técnica de sustitución de la población del vector por individuos infectados con *Wolbachia* (Jeffries & Walker, 2016). Este programa se inició en Cairns, Australia, donde luego del monitoreo a largo plazo observaron que en los sitios donde hay altos niveles de *Wolbachia* no ha habido evidencia de transmisión local de dengue

(Ritchie, 2018). Actualmente su rango de acción se ha extendido a 11 países de Oceanía, Asia y América Latina.

0.2. *Wolbachia*, una herramienta para el biocontrol de mosquitos

Wolbachia es una bacteria gram-negativa intracelular obligada (endosimbiótica), lo que significa que se replica exclusivamente dentro de las células hospedadoras, y se transmite verticalmente a través del citoplasma del huevo. Fue reportada por primera vez en los tejidos reproductivos del mosquito *Culex pipiens* por el entomólogo Marshall Hertig y el patólogo Samuel Wolbach en 1924 (Hertig & Wolbach, 1924) y posteriormente fue denominada *Wolbachia pipientis* (Hertig, 1936). Esta bacteria pertenece a la familia Anaplasmataceae, orden Rickettsiales, subdivisión $\alpha 2$ de la clase Proteobacteria (Bordenstein et al., 2009; Werren et al., 2008; Fitzpatrick et al., 2006). Es la bacteria intracelular más común que se ha descrito: estudios recientes estimaron que *Wolbachia* infecta naturalmente más del 40% de las especies de artrópodos (Weinert et al., 2015; Zug & Hammerstein, 2012). Además, se ha reportado en un gran número de nematodos filariales de la familia Onchocercidae (Ferri et al., 2011) y en nematodos parásitos de plantas (Haegeman et al., 2009).

En los artrópodos la transmisión vertical de *Wolbachia* propició la evolución de un comportamiento conocido como *parasitismo reproductivo* (Werren et al., 1995b). Este comportamiento ocasiona una distorsión de la reproducción del hospedador mediante diversas estrategias que resultan en el aumento de la cantidad de hembras infectadas en la siguiente generación, y por consiguiente en el incremento de su propia frecuencia, lo que constituye una estrategia egoísta. Dentro de las diferentes formas de manipulación reproductiva se encuentran la *muerte de los machos* (androcidio) (Hurst & Jiggins, 2000), la *partenogénesis telitóquica* (Stouthamer & Kazmer, 1994), la *feminización* (Rousset et al., 1992) y la *incompatibilidad citoplasmática* (Cordaux et al., 2012) (ver más abajo). Por esta razón, la bacteria se localiza necesariamente en las gónadas, garantizando el acceso necesario a las células de la línea germinal (Frydman et al., 2006). En los nematodos, *Wolbachia* se comporta como mutualista, ya que causa beneficios en la fertilidad y en el desarrollo larvario de los hospedadores. Además, aportan compuestos esenciales como los nucleótidos, el hemo y la riboflavina al

hospedador (Foster et al., 2005). A pesar de la antigua asociación intracelular con el clado hospedador, el pequeño tamaño del genoma (0.9–1.6 Mb) y la dependencia de la replicación intracelular, el género *Wolbachia* desarrolló estilos de vida principalmente como parásitos reproductivos en artrópodos y mutualistas en nematodos filariales (Bordenstein et al., 2009).

Esta bacteria infecta de forma natural algunas especies de mosquitos que son importantes vectores de enfermedades humanas, incluyendo *Ae. albopictus* (Sinkins et al., 1995a; Wright & Barr, 1980), como se comentó previamente es vector de virus del dengue y del virus Chikungunya, y *Culex quinquefasciatus* Say y *Cx. pipiens*, ambos vectores de virus del Nilo Occidental (Rasgon & Scott, 2003; Hertig & Wolbach, 1924) y de la encefalitis de San Luis (Flores et al., 2010). Recientemente se ha encontrado la infección natural en dos poblaciones de *Ae. aegypti* (Kulkarni et al., 2019), y sólo se ha registrado una única población infectada de *Anopheles gambiae* Giles (Baldini et al., 2014), aunque se han logrado transinfecciones estables en *Ae. aegypti* y *Anopheles stephensi* Liston (Hoffmann et al., 2014a; Bian et al., 2013a; Xi et al., 2005).

0.3. Estrategias reproductivas de *Wolbachia* en artrópodos

0.3.1. Matanza masculina (androcidio)

Se ha descrito en Coleoptera, Diptera, Lepidoptera y Pseudoescorpionida (Werren et al., 2008). Esta alteración reproductiva consiste en la muerte de los machos principalmente durante la embriogénesis. Esto resulta ventajoso cuando las hermanas infectadas se benefician con la muerte de sus hermanos. Este proceso se denomina compensación de aptitud física, y puede reducir la competencia entre hermanos, aumentando así el alimento disponible para las hembras (que son las únicas que pueden transmitir la bacteria a la próxima generación) a través del consumo de los machos muertos, lo que mejora su crecimiento y/o reduce las tasas de endogamia.

La manera en que la bacteria es capaz de reconocer el sexo embrionario y producir la matanza de los machos es aún desconocida (Rodríguez, 2013; Engelstädter & Hurst, 2009; Werren et al., 2008; Hurst & Jiggins, 2000) (Figura 1).

0.3.2. Partenogénesis telitóquica

Hasta el momento se ha comprobado en especies haplo-diploides, esto quiere decir que los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados (haploides) (Ma & Schwander, 2017). En este caso las hembras infectadas con *Wolbachia* producen descendientes femeninos a partir de huevos no fertilizados que pueden transmitir la bacteria a su descendencia. Esto es producido por la duplicación del genoma del ovocito (e.g. Stouthamer & Kazmer, 1994) (Figura 1).

0.3.3. Feminización

Este fenómeno se describió por primera vez en isópodos (Bouchon et al., 1998), y se ha descubierto en varios insectos (Werren et al., 2008). La feminización convierte un macho genético en una hembra funcional. De esta manera, las hembras infectadas pueden producir hasta un 90% de individuos del sexo femenino y así aumentar la frecuencia relativa de las hembras infectadas en la población (Rodríguez, 2013) (Figura 1).

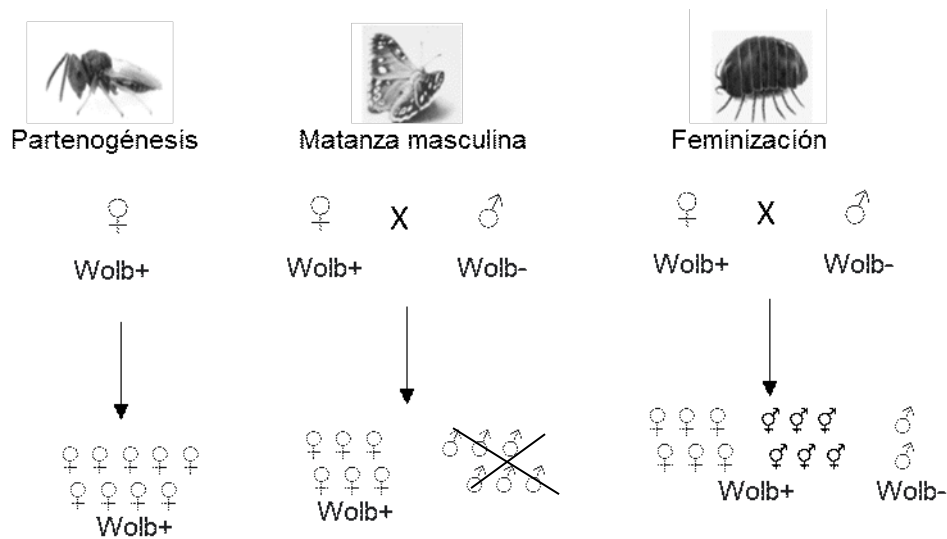


Figura 1. Alteraciones reproductivas producidas por *Wolbachia* que distorsionan la relación de sexos. De izquierda a derecha se observa la *partenogénesis*, la *matanza masculina* y la *feminización*. Extraído y modificado de Landmann (2019). Wolb+=individuos infectados con *Wolbachia*; Wolb-=individuos no infectados.

Estas tres alteraciones reproductivas distorsionan la relación de sexos, sesgando la población hacia el sexo femenino. Por último, resta la incompatibilidad citoplasmática, que se considera una esterilidad condicional, la cual aumenta la frecuencia de las hembras infectadas y se encuentra documentada en varias especies de mosquitos (Sinkins, 2004).

0.3.4. Incompatibilidad Citoplasmática (IC)

Es el fenotipo inducido por *Wolbachia* más frecuentemente en artrópodos. La incompatibilidad citoplasmática es una forma de parasitismo reproductivo que aumenta la proporción de individuos infectados con una cepa de *Wolbachia* en una población hospedadora dada al suprimir la reproducción de aquellas hembras que no están infectadas o que están infectadas con una cepa diferente de la bacteria.

En el cuadro más simple de IC, los embriones resultantes del cruzamiento de hembras no infectadas con machos infectados mueren rápidamente después de la fertilización; esto conduce a una disminución del *fitness* de las hembras no infectadas. En contraste, los huevos de hembras infectadas son “inmunes” a este efecto letal de la infección masculina y se desarrollan normalmente en adultos infectados, de manera que la prevalencia de la infección tiende a incrementarse. Una muerte embrionaria similar se observa en los cruzamientos entre machos y hembras que están infectados con diferentes cepas de *Wolbachia* (Tortosa et al., 2010). Este fenómeno se denomina IC bidireccional (ICB), en contraposición a la IC unidireccional (ICU) de la que se habló antes (Figura 2).

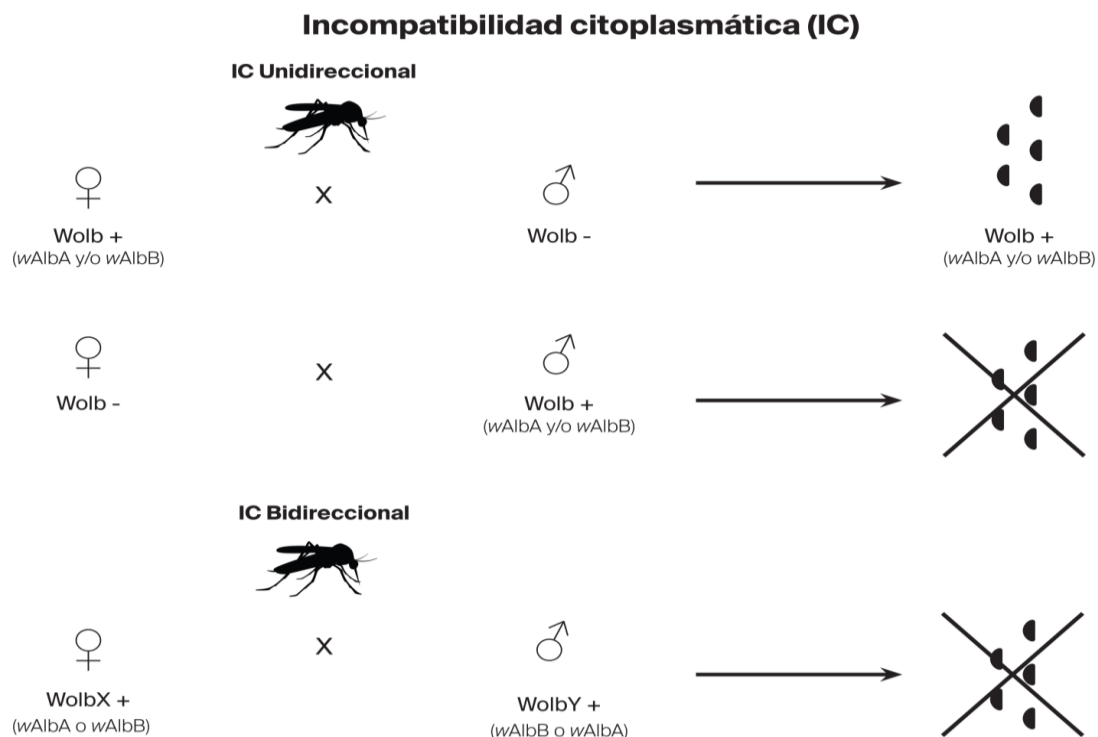


Figura 2. Incompatibilidad citoplasmática producida por *Wolbachia*. IC unidireccional, en el primer escenario produce descendencia infectada con la cepa de *Wolbachia* de la hembra y en el segundo escenario, produce muerte embrionaria; en la IC bidireccional no hay descendencia. Wolb+=individuos infectados con *Wolbachia*; Wolb-=individuos no infectados.

El mecanismo por el cual *Wolbachia* induce IC aún no está caracterizado. Generalmente se acepta que involucra la modificación del esperma interfiriendo con el proceso de la cariogamia. Esto se denomina acción de modificación de *Wolbachia* (función *mod*). Existe un componente de rescate proporcionado por *Wolbachia* en el óvulo (función *resc*), que restaura la cariogamia pro-nuclear normal, resultando en cruzamientos compatibles entre machos y hembras (Werren, 1997). Se ha sugerido que las funciones *mod* y *resc* interactúan de una manera “llave y cerradura”, con una inhibición directa del factor *mod* (la cerradura) por el factor *resc* (la llave) (Ferree & Sullivan, 2006; Poinso et al., 2003). En un trabajo reciente sobre las cepas *wMel* (cuyo hospedador es *Drosophila melanogaster* Meigen) y *wPip* (cuyo hospedador es *Cx. pipiens*) se han identificado los genes responsables de la inducción de IC (*cifA* y *cifB*) (Beckmann et al., 2017). Ambos genes se localizan en el profago WO, un fago temperado integrado en el genoma de *Wolbachia* (Bordenstein & Bordenstein, 2011),

lo cual tiene implicancias en su transmisión debido a los frecuentes eventos de *transferencia horizontal*⁴ de dicho profago entre cepas de *Wolbachia* (Chafee et al., 2009; Bordenstein & Wernegreen, 2004).

La IC imparte una ventaja reproductiva a las hembras infectadas y es el mecanismo más común para que *Wolbachia* invada y se expanda en las poblaciones naturales de muchos insectos, alcanzando frecuencias poblacionales muy altas (Walker et al., 2009; Turelli & Hoffmann, 1991); esto convierte a *Wolbachia* en un microorganismo con enorme potencial en las estrategias de reemplazo de poblaciones naturales de muchos insectos plagas (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011). Existen varios factores que pueden influir en la expresión de la IC en insectos como la densidad de *Wolbachia* (Bordenstein et al., 2006), el tipo de cepa (Sakamoto et al., 2005; Sasaki & Ishikawa, 2000), y el genotipo del hospedador (Sasaki et al., 2005; McGraw et al., 2001).

0.4. Diversidad de *Wolbachia*

El género *Wolbachia* forma un clado monofilético que comprende linajes mutualistas y parásitos que muestran la diversidad de asociaciones simbióticas.

Las filogenias del género *Wolbachia* reconstruidas en base a diversos genes han dividido al mismo en varios supergrupos denominados con las letras A – S (Lefoulon et al., 2020; Landmann, 2019). Los supergrupos A y B incluyen las cepas de *Wolbachia* que infectan artrópodos (Werren et al., 1995b). Los supergrupos C, D y J infectan nematodos filariales (Bandi et al., 1998). El supergrupo E es más pequeño y es específico de colémbolos (*Collembola*) (Czarnetzki & Tebbe, 2004; Vandekerckhove et al., 1999). Los miembros del supergrupo F infectan tanto artrópodos (ácaros, gorgojos, termitas, grillos entre otros artrópodos) como nematodos filariales (Lo et al., 2002; Casiraghi et al., 2001), el supergrupo H infecta un género de termitas (Bordenstein & Rosengaus, 2005). Actualmente se han añadido los supergrupos I, K y L que se encuentran en pulgas, arañuelas y un nematodo parásito de plantas, respectivamente (Augustinos et al., 2011; Haegeman et al., 2009; Ros et al., 2009); También los supergrupos M, N y O, que infectan áfidos (Bing et al., 2014) y P y Q que infectan

⁴Fenómeno de intercambio genético no ligado a la reproducción, en el que el material genético se transfiere entre organismos sin relación de descendencia.

ácaros (Glowska et al., 2015). Los supergrupos G y R, que infectan arañas nativas de Australia (Rowley et al., 2004) y arañas de cueva (Wang et al., 2016), respectivamente (Figura 3), resultaron espurios y por lo tanto fueron suprimidos, considerándose hoy día como parte de los supergrupos B (Baldo & Werren, 2007) y A (Gerth, 2016). Las relaciones entre estos supergrupos no están firmemente establecidas (Bordenstein et al., 2009), y al menos para los artrópodos es evidente una discordancia entre la filogenia de los hospedadores y la de *Wolbachia*, lo que sugiere que a escalas de tiempo evolutivos ha ocurrido transferencia horizontal de esta bacteria entre especies en numerosas ocasiones (Landmann, 2019). Si bien aún no se han descubierto los mecanismos moleculares por los cuales sucede la transferencia horizontal, es probable que la capacidad de *Wolbachia* para ocupar y moverse a través de los tejidos somáticos del hospedador como el intestino, y quizás incluso el entorno extracelular, como la hemolinfa, sean un componente clave en la transferencia (Pietri et al., 2016).

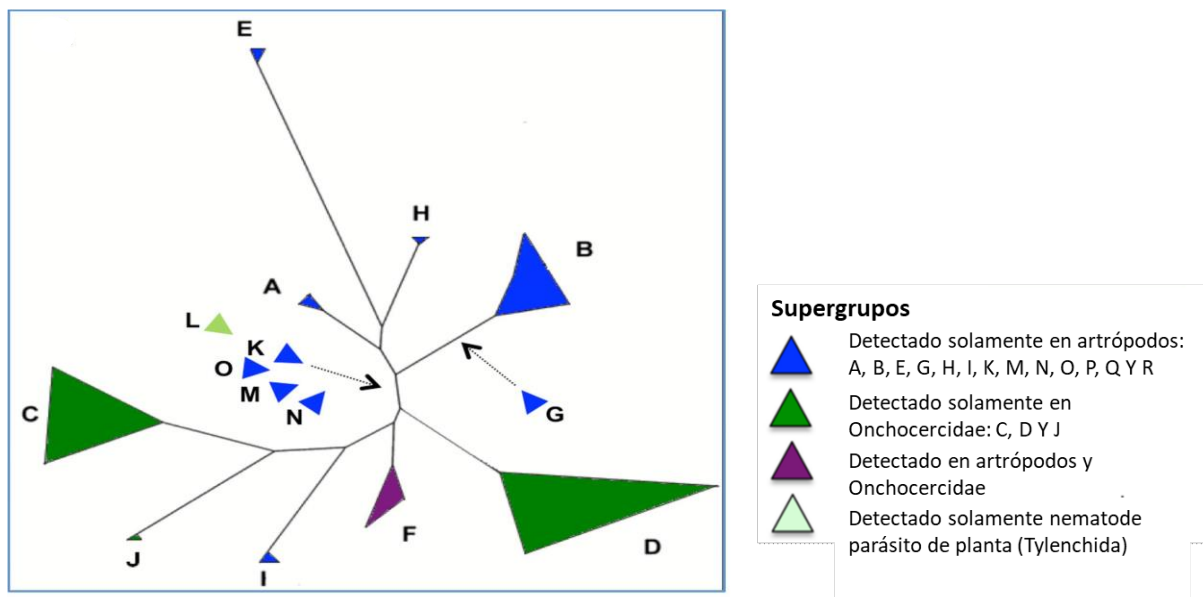


Figura 3. Diversidad de *Wolbachia*. Árbol filogenético no enraizado de los supergrupos de *Wolbachia*. El tamaño del triángulo representa la diversidad descrita dentro de cada supergrupo. Extraído y modificado de Landmann (2019).

Para la designación de los diferentes supergrupos inicialmente se han utilizado un gen del ciclo celular denominado *ftsZ* (Werren et al., 1995b) y un gen de una proteína

de superficie de *Wolbachia* (*wsp*) (Zhou et al., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que las secuencias de este último gen son altamente recombinantes (Baldo et al., 2006a, 2005; Casiraghi et al., 2005). La estructura génica del gen *wsp* consta de cuatro regiones hipervariables (HVR) intercaladas con regiones conservadas. La extensa recombinación intra e intergénica y una fuerte selección diversificadora en este gen hacen que no sea adecuado para la caracterización de las cepas de manera confiable (Baldo et al., 2005), aunque ha probado ser complementario e informativo si no se usa por sí solo (Baldo et al., 2006b).

La creciente lista de especies de artrópodos infectados, han llevado a desarrollar un sistema estándar de tipificación de genotipos multilocus (MLST, por sus siglas en inglés *MultiLocus System Typing*) para describir las cepas de *Wolbachia* (Baldo et al., 2006b). El MLST es un sistema estándar e inequívoco que es usado ampliamente para la tipificación de las cepas bacterianas. Para *Wolbachia* se utiliza la amplificación mediante PCR de cinco genes conservados que codifican para: Glutamil-RNAt (Gln) amidotransferasa, subunidad B (*gatB*), Subunidad catalítica de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria (*coxA*), Proteína hipotética conservada (*hcpA*), Proteína de división celular (*ftsZ*) y Fructosa-bisfosfato aldolasa (*fbpA*).

A partir de la información brindada por el MLST se generó una base de datos de perfiles y una base de datos de aislamientos para almacenar las secuencias y distribuir la información sobre la cepa y el hospedador, respectivamente (<http://pubmlst.org/wolbachia/>) (Jolley et al., 2018). Se pueden enviar nuevas cepas y perfiles al curador para su inclusión en las bases de datos, lo que representa un punto focal para el futuro almacenamiento y manejo de todos los datos de cepas de *Wolbachia*.

0.5. Transferencia horizontal: capacidad de *Wolbachia* para cambiar de una especie hospedadora a otra

La discordancia entre *Wolbachia* y las filogenias del hospedador sugiere que ha ocurrido la transmisión de *Wolbachia* dentro y entre especies filogenéticamente cercanas y distantes entre sí (Pietri et al., 2016; Ahmed et al., 2015). La transmisión

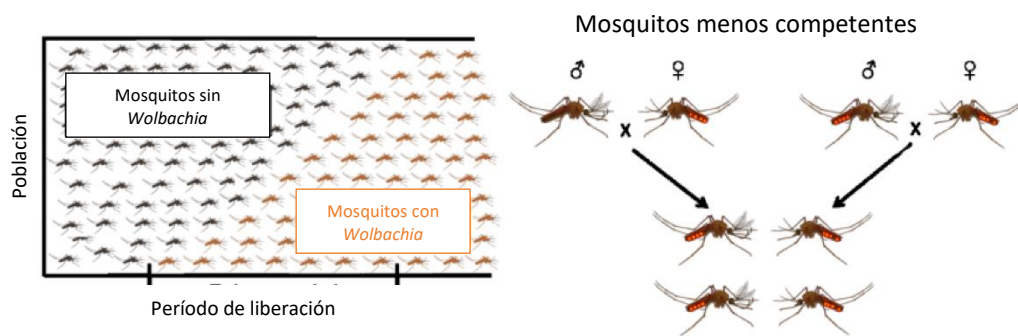
horizontal parece suceder a través de interacciones directas e indirectas (Pietri et al., 2016). Algunas de estas relaciones pueden ser: (1) la interacción depredador-presa (Sanaei et al., 2020) como se sugiere en vínculo de chinches depredadoras de chicharritas (Pietri et al., 2016) o ácaros depredadores de ácaros fitófagos (Enigl et al., 2005); (2) hospedador-parasitoide/parásitos, todas las estrategias parasitarias como castración, parasitoidismo, microdepredación y foresis pueden exponer ambos actores al intercambio microbiano (Sanaei et al., 2020), esto se ha documentado entre avispas parasitoides de *Trichogramma* sp que comparten huevos del hospedador (Huigens et al., 2000); (3) fuentes de alimento compartidas: se ha detectado la presencia de *Wolbachia* en las glándulas salivales de varios insectos herbívoros y no herbívoros, sus bacterias pueden ser transferidas mediante el contacto entre las piezas bucales y la fuente de alimento (Sanaei et al., 2020).

0.6. Estrategias de control mediadas por *Wolbachia*

Desde su descubrimiento, el fenómeno de la IC ha atraído la atención como un posible medio para controlar las poblaciones de mosquitos vectores. Esto se puede llevar a cabo de dos maneras, mediante la reducción directa de las densidades de la población de vectores (supresión de la población) o como mecanismo para introducir rasgos deseables asociados con *Wolbachia* en poblaciones de vectores (reemplazo de la población) (Figura 4) (Yen & Failloux, 2020). La primera estrategia se denomina *Técnica del Insecto Incompatible (TII)* también conocida como *Esterilidad biológica* y es derivada de la *Técnica de Insecto Estéril (TIE)*. Mientras que en esta última la esterilidad se logra mediante irradiación de los machos, la TII se basa en las liberaciones masivas de machos infectados con *Wolbachia* que pueden copular y esterilizar a las hembras en la naturaleza porque los cruzamientos resultan incompatibles. De esta manera, lo que se logra es eliminar las poblaciones locales. Esta estrategia fue utilizada por primera vez en Birmania en 1967 como una medida contra *Cx. quinquefasciatus*, vector de la filariasis (McGraw & O'Neill, 2013). Posteriormente se han tenido resultados positivos en ensayos a campo contra el mosquito *Aedes polynesiensis* Marks, así como en otros experimentos de laboratorio (O'Connor et al., 2012).

La segunda estrategia conocida como *Sustitución de la población del vector por individuos infectados con Wolbachia*, se basa en la liberación de mosquitos infectados con una cepa de *Wolbachia* inductora de IC que van a producir descendencia infectada con una ventaja selectiva como la protección contra el virus del dengue, suponiendo que no existe sesgo de apareamiento, que la IC es fuerte y el costo de aptitud física para las crías infectadas con *Wolbachia* es limitado. Debido a que esta estrategia no requiere el sexado de mosquitos, ya que los machos suprimen la población objetivo a través de IC y las hembras propagan infección con *Wolbachia* (Caragata et al., 2021), se puede liberar tanto machos y hembras adultos (Hoffmann et al., 2011) como huevos infectados con *Wolbachia* (O'Neill et al., 2019). Luego de la liberación mediante la IC, la bacteria podrá extenderse de forma natural más allá del apareamiento inicial de los individuos liberados, y se fijará en poblaciones con tasas de infección cercanas al 100% (Turelli, 2010). Este mecanismo de impulso también asegura que *Wolbachia* pueda persistir en las poblaciones durante muchas generaciones (Ritchie, 2014). Por la ventaja mencionada (inhibición de la replicación del virus dengue y otros arbovirus) la bacteria interferirá con la transmisión viral. El resultado neto de esta estrategia sería una población de mosquitos con una capacidad muy disminuida para actuar como vector de los virus (Kamtchum-Tatuene et al., 2016).

Sustitución de la población del vector por individuos infectados con *Wolbachia*



Técnica del insecto incompatible

Reduce la población de mosquitos

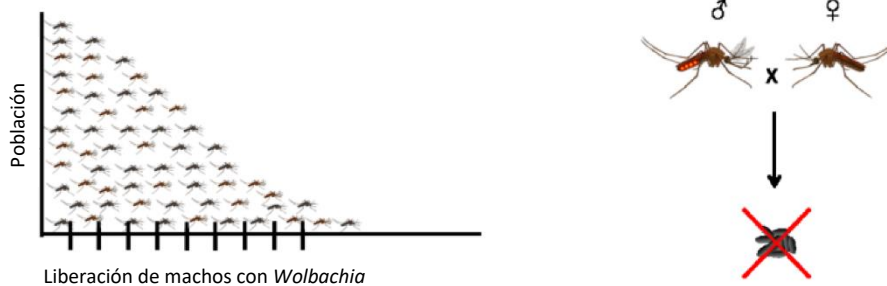


Figura 4. Estrategia de control de mosquitos basada en *Wolbachia*. *Sustitución de la población del vector por individuos infectados con *Wolbachia**, se liberan adultos o huevos infectados con *Wolbachia* que, después de aparearse con machos infectados con *Wolbachia* o no infectados, producirán descendencia viable, pero menos competente para la transmisión del patógeno, propagándose la bacteria en la población silvestre.

Técnica del insecto incompatible, se liberan mosquitos macho infectados con *Wolbachia* que, después de aparearse con hembras de campo, no producirían descendencia viable, reduciendo así la población natural. Extraído y modificado de Yen & Failloux (2020).

0.7. Protección antiviral mediada por *Wolbachia* en mosquitos

Hay una gama de factores fisiológicos y ecológicos que determinan la habilidad de una población de mosquitos en la transmisión de arbovirus o capacidad vectorial que incluyen: competencia vectorial⁵, densidad del vector, proporción de picaduras sobre humanos, *período de incubación extrínseco*⁶ y longevidad del vector. La presencia de *Wolbachia* ha sido postulada como posible factor modulador de la competencia vectorial mediante la modificación de la susceptibilidad de los mosquitos a la infección con el patógeno (Cordaux et al., 2012; Zug & Hammerstein, 2012; Duron et al., 2008).

El aumento de la resistencia a los patógenos virales y protozoos mediado por *Wolbachia* (e.g. Walker et al., 2011; Moreira et al., 2009) ha recibido atención desde su descubrimiento inicial en *D. melanogaster* por Teixeira et al. (2008), quienes observaron que, mientras que las moscas infectadas con *Wolbachia* estaban protegidas de la infección por el virus *Drosophila C*, las que habían sido curadas de su infección con la bacteria no lo estaban. Esta capacidad de la bacteria está siendo explotada desde su descubrimiento, como un enfoque para el biocontrol de vectores de enfermedades (McGraw & O'Neill, 2013; Iturbe-Ormaetxe et al., 2011; Walker & Moreira, 2011).

La interferencia antiviral se ha demostrado para los virus de ARN, pero no para los de ADN. Se han observado una variedad de efectos antivirales como la disminución en la mortalidad inducida por el virus, reducción de la replicación o transmisión del virus tasa de infección reducida y también mejorada (Rainey et al., 2014; Mousson et al., 2010; Moreira et al., 2009; Osborne et al., 2009; Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008), aunque en algunos casos no se ha demostrado ningún efecto de esta bacteria sobre la infección del virus (Rainey et al., 2014; Bian et al., 2010; Mousson et al., 2010; Osborne et al., 2009).

Los principales tejidos candidatos para la resistencia de patógenos mediada por *Wolbachia* son los somáticos no gonadales, donde la bacteria y la infección del agente patogénico co-existen. En los casos documentados se ha visto que *Wolbachia* se

⁵ Capacidad intrínseca del vector para infectarse con un patógeno, permitir su replicación y posteriormente su transmisión a un hospedador susceptible.

⁶ Es el tiempo (promedio 7-14 días) del ciclo del virus en el vector para desarrollar la forma infectante a los humanos.

distribuye ampliamente en los tejidos somáticos de su hospedador (e.g. Pietri et al., 2016; Zouache et al., 2009; Frydman et al., 2006; Dobson et al., 1999). Su distribución en el hospedador está influenciada tanto por el tipo de tejido como por algunos factores propios de *Wolbachia*, y su densidad puede variar entre los tejidos dentro de un hospedador (Osborne et al., 2012).

Todavía no se conoce con certeza el mecanismo por el cual *Wolbachia* induce la protección antiviral. Hay estudios que demuestran que la densidad de *Wolbachia* puede alterar dicha protección: en *Drosophila* y en la gran mayoría de los mosquitos, la densidad de *Wolbachia* se correlaciona positivamente con la intensidad de la protección antiviral (Lu et al., 2012). Este vínculo entre la alta densidad de *Wolbachia* en el hospedador y los efectos antivirales lleva a la hipótesis de que todas las cepas de *Wolbachia* son capaces de protección antiviral si se alcanza un umbral de densidad, hipótesis aún no probada experimentalmente (Johnson, 2015a).

El papel de la densidad de *Wolbachia* en los efectos antivirales sugiere que puede haber competencia por los recursos entre el virus, el hospedador y *Wolbachia* (Rainey et al., 2014; Osborne et al., 2009). Un mecanismo propuesto para el bloqueo de patógenos es la competencia por moléculas importantes como el colesterol, que resulta importante para la biología del hospedador, el simbionte y el virus infectante. En los insectos es importante para la estabilidad de la membrana y la señalización celular, entre otras funciones. La replicación de *Wolbachia* depende del colesterol y requiere membranas del hospedador ricas en este compuesto para formar la vacuola que rodea a cada bacteria. Tanto los insectos como *Wolbachia* no lo sintetizan y, por lo tanto, dependen y compiten por el colesterol de la dieta. Además, muchos virus dependen del colesterol del hospedador para su replicación e ingreso celular. En consecuencia, la manipulación de dicha molécula por *Wolbachia* podría influir en la capacidad de propagación del virus, produciendo un efecto de bloqueo (Caragata et al., 2013).

Otro mecanismo potencial para los efectos antivirales es la estimulación inmune por la presencia de *Wolbachia*; esto se ha observado en mosquitos transinfectados (Johnson, 2015b). Se observó que la infección con la bacteria conduce a la inducción de estrés oxidativo y a un mayor nivel de ROS (especies reactivas de oxígeno) en el

mosquito hospedador. La elevación de ROS está relacionada con la activación de la vía inmune Toll, que media la expresión de antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo. Esta vía inmune también es responsable de la activación de péptidos antimicrobianos. Existen evidencias de que estos péptidos antimicrobianos están involucrados en la inhibición de la proliferación de dengue en mosquitos infectados con *Wolbachia*. Estas respuestas se han observado en líneas de *Ae. aegypti* transinfectadas y *An. gambiae* con infecciones somáticas no estables⁷ de *Wolbachia*. Sin embargo, esta respuesta no se ha demostrado en *Ae. albopictus* infectados naturalmente con las cepas wAlbA y wAlbB, las cuales parecen no inhibir la replicación del virus dengue (Bian et al., 2010), aunque hay reportes de que pueden suprimir la entrada del virus en las glándulas salivales y limitar su transmisión (Mousson et al., 2012). En el género *Culex* se demostró que la cepa wPip redujo la carga y transmisión del virus del Nilo Occidental en una colonia de *Cx. quinquefasciatus* que presentaba altas cargas bacterianas en tejido somático (Glaser & Meola, 2010), pero esto no ocurrió con la infección natural de *Wolbachia* en diferentes colonias y poblaciones de *Cx. pipiens* con diferentes cargas bacterianas, las cuales resultaron demasiado bajas para inhibir la replicación viral (Micieli & Glaser, 2014). Sin embargo, la resistencia a los patógenos en los mosquitos *Ae. aegypti* y *An. gambiae* transinfectados con una cepa de *Wolbachia* heteróloga es probablemente una consecuencia de la elevada inmunidad del hospedador a la bacteria, que tiene como objetivo contrarrestar los efectos adversos de este parásito recientemente adquirido (Pan et al., 2012).

El impacto de *Wolbachia* sobre la infección por arbovirus es variable en mosquitos. Incluso la misma cepa de *Wolbachia* puede causar diferentes efectos dependiendo si la infección es de origen natural o introducida por transinfección (Johnson, 2015a). Por ejemplo, en *Ae. albopictus* infectado naturalmente con las cepas wAlbA y wAlbB no se verifican efectos de estas cepas en la transmisión del dengue (Lu et al., 2012), pero la cepa wAlbB en *Ae. aegypti* transinfectados disminuye la tasa de infección, la carga del virus y la transmisión (Bian et al., 2010). Esto puede indicar que los efectos antivirales no son una característica ni del hospedador ni de la cepa de *Wolbachia* per se,

⁷Significa que la infección no se encuentra en la línea germinal, por lo tanto, no se transmite de manera vertical.

sino que implica la interacción entre los dos (Johnson, 2015a). Se ha documentado la transfección de manera estable en *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* y *Ae. aegypti* con una o más de las cepas de *Wolbachia* (wMel, wMelPop⁸ y wAlbB) (Andrews et al., 2012; Blagrove et al., 2012; Walker & Moreira, 2011; Xi et al., 2005). Estos estudios han incluido virus de las familias *Flaviviridae* (virus del Nilo Occidental, dengue y fiebre amarilla) y *Togaviridae* (virus Chikungunya), mientras que los arbovirus de la familia *Bunyaviridae* aún no se han analizado en mosquitos. El impacto de *Wolbachia* en la infección del virus, se puede observar desde una reducción moderada en la tasa de infección entre individuos o la acumulación de virus dentro de individuos infectados, hasta una interferencia casi completa con la replicación y la transmisión del virus (Bian et al., 2013b; van den Hurk et al., 2012). Por ejemplo, la infección natural con la cepa wPip en *Cx. quinquefasciatus* reduce la carga viral y la transmisión del virus del Nilo Occidental (Glaser & Meola, 2010) y la cepa wMel transfectada en *Ae. aegypti* reduce la carga viral del virus de la fiebre amarilla (van den Hurk et al., 2012).

A pesar de los efectos antivirales de la infección con *Wolbachia* relatados en los párrafos precedentes, también se ha demostrado un incremento en la capacidad vectorial de mosquitos mediada por esta bacteria en *Culex tarsalis* Coquillett transfectados en forma no estable con la cepa wAlbB (Dobson et al., 2004). Esto se vio reflejado en un aumento en la tasa de infección del virus del Nilo Occidental, aunque no hubo impacto en la diseminación o transmisión del virus. Es importante señalar que las transfecciones no estables son muy diferentes a las infecciones naturales estables donde el hospedador y *Wolbachia* se han adaptado entre sí durante muchas generaciones. En la naturaleza *Cx. tarsalis* se encuentra libre de la infección con *Wolbachia* y aun no se han logrado transfecciones estables. También se ha documentado la mejora de la infección por *Plasmodium* inducida por *Wolbachia* en mosquitos *An. gambiae* transfectados (Hughes et al., 2012) y en infecciones naturales de *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Baton et al., 2013).

⁸ Fue descubierta en cepas de laboratorio de *Drosophila melanogaster*, replica en exceso principalmente en el cerebro y células musculares de la mosca, causando en última instancia la degeneración tisular y la muerte prematura.

A pesar de la clara importancia de *Wolbachia* para entender los aspectos básicos y aplicados de la competencia vectorial, se sabe muy poco acerca de los niveles estándar de *Wolbachia* en mosquitos de importancia para la salud pública y cómo los factores genéticos y ambientales podrían modular esos niveles. Es esencial comprender la dinámica de las infecciones en poblaciones de vectores naturales para predecir cómo pueden comportarse las infecciones introducidas que ya son parte de estrategias de control de mosquitos en distintos lugares del mundo (Walker et al., 2009). Con el objetivo de proporcionar una base para comprender hasta qué punto *Wolbachia* podría modular la competencia vectorial e informar sobre la utilidad del uso de infecciones heterólogas de esta bacteria para el control biológico, en esta propuesta se llevará a cabo un relevamiento de las cepas de *Wolbachia* circulantes en mosquitos de importancia sanitaria en la República Argentina, las que podrían tener características particulares y diferentes efectos sobre sus hospedadores. Este conocimiento podría ampliar el espectro de posibilidades a futuro sobre el uso de las mismas en estrategias de control. En este sentido, se investigará sobre la ocurrencia de este simbiote en sistemas naturales aun no explorados en Argentina, como *Aedes albifasciatus* (Macquart), considerado un mosquito plaga, ya que se produce una emergencia simultánea de los adultos cuando se inundan los charcos temporales donde se encuentran sus huevos resistentes a la desecación. Las hembras son agresivas y atacan insistentemente a humanos y mamíferos domésticos generando grandes molestias y ocasionando pérdidas en la producción de leche y carne (Ludueña Almeida & Gorla, 1995). Esta especie aún no cuenta con registro de la infección con *Wolbachia*. *Ae. fluviatilis* y *Ae. albopictus*, ambos vectores potenciales de fiebre amarilla (Rey & Lounibos, 2015; Baton et al., 2013) y este último además vector de dengue, Chikungunya y otros arbovirus (Rey & Lounibos, 2015), cuentan con registro de la infección con *Wolbachia* en otros países (Baton et al., 2013; Kittayapong et al., 2002a). También se estudiará la presencia de esta bacteria en el complejo *Cx. pipiens*, vectores cosmopolitas de patógenos de importancia médica y veterinaria (Farajollahi et al., 2011). Las especies del complejo que más abundan en el mundo son *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*, las cuales cuentan con antecedentes previos de la infección con la bacteria en Argentina (Díaz-Nieto et al., 2021; Micieli & Glaser, 2014). En este trabajo se estudiarán poblaciones híbridas del complejo *Cx. pipiens*, las cuales aún no fueron

exploradas en Argentina. Asimismo, se estudiará la prevalencia de infección en las poblaciones donde se detecte, la densidad de las cepas de *Wolbachia* en los mosquitos, y ciertos factores reguladores de dicha densidad, como la edad del hospedador, los tejidos y la temperatura del microhábitat.

0.8. Objetivos específicos

- 1.- Detección de la infección con *Wolbachia* en poblaciones de *Ae. albifasciatus*, *Ae. fluviatilis*, *Ae. albopictus* y complejo *Cx. pipiens* de Argentina, determinación de su prevalencia y caracterización molecular de las cepas halladas.
- 2.- Determinación de los niveles de variación de la densidad de *Wolbachia* de acuerdo al tejido en el que se aloja la infección y la edad del insecto en *Ae. albopictus*.
- 3.- Determinación de la influencia de la temperatura ambiental en la prevalencia de la infección con *Wolbachia*.
- 4.- Caracterización biológica y de la competencia vectorial de *Aedes albopictus* infectado con *Wolbachia*.

0.9. Hipótesis de trabajo

- 1.- Las poblaciones locales de mosquitos se hallan infectadas con diversas cepas de *Wolbachia* cercanas a la fijación o fijadas.
- 2.- La densidad de *Wolbachia* puede variar a lo largo del ciclo de vida de los individuos adultos y según la localización en los tejidos del hospedador.
- 3.- La temperatura de los sitios de cría de las larvas afecta la prevalencia de infección, de manera que una mayor temperatura ocasiona una disminución en dicha variable.

1. Capítulo 1: Detección de *Wolbachia* en poblaciones naturales de *Aedes albifasciatus*, *Aedes fluviatilis*, *Aedes albopictus* y complejo *Culex pipiens* de Argentina.

1.1. Introducción

Wolbachia constituye una de las pandemias más exitosas desde el origen de la vida. Desde su descubrimiento en la línea germinal y en los tejidos somáticos del mosquito *Cx. pipiens* en 1924 (Hertig & Wolbach, 1924), el número de cepas de *Wolbachia* y hospedadores asociados sigue en aumento (Landmann, 2019). La evidencia acumulada demuestra que la clave de su éxito radica principalmente en su capacidad para transmitirse verticalmente a través del huevo y en la transferencia horizontal entre las especies (Rodríguez, 2013). Los eventos de transferencia horizontal pueden suceder durante las interacciones predador-presa y hospedador-parásito/parasitoide o durante la alimentación de plantas y otras fuentes alimenticias (Sanaei et al., 2020). Además, la capacidad de cambio de hospedador de *Wolbachia* ha sido corroborada por la transferencia artificial de la bacteria a través de experimentos de transinfección (Hughes et al., 2014). Toda esta evidencia demuestra la gran capacidad que tiene *Wolbachia* para moverse entre especies hospedadoras (Sanaei et al., 2020).

1.1.1. Infección con *Wolbachia* en poblaciones naturales de mosquitos

A partir de la detección de *Wolbachia* en el mosquito *Cx. pipiens* (Hertig & Wolbach, 1924), se sumaron trabajos que demuestran la presencia de esta bacteria en varias especies de mosquitos silvestres. Se detectó en varios géneros como *Armigeres*, *Mansonia*, *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Hodgesia*, *Tripteroides* y *Uranotaenia* (Nugapola et al., 2017; Raharimalala et al., 2016; Wiwatanaratanabutr, 2013), la mayoría de los cuales carecen de importancia sanitaria. Además, se conoce la infección en importantes especies de mosquitos transmisores de patógenos, como en el 42% de las especies de *Culex* analizadas y 30% de las especies de *Aedes* estudiadas (Johnson, 2015a). Sin embargo, durante un largo tiempo no se había detectado la infección natural en dos especies de gran importancia sanitaria, *Ae. aegypti*, principal vector de dengue, y *An. gambiae*, vector de la malaria humana, aunque se habían logrado

transinfecciones estables en *Ae. aegypti* y *An. stephensi* (Hoffmann et al., 2014b; Bian et al., 2013a; Xi et al., 2005). La ausencia de infección natural en especies vectoras de patógenos es una ventaja para los programas de control de estas especies porque cualquier infección con *Wolbachia* inductora de IC debería ser incompatible unidireccionalmente en las poblaciones de campo (Ross et al., 2019a).

Después de varios años de intensa pero infructuosa búsqueda, en 2014 finalmente se detectó la cepa *wAnga* en *An. gambiae* colectados en África Occidental (Baldini et al., 2014) y en años posteriores se detectó la presencia de *Wolbachia* en otras especies vectoras de *Anopheles* también en África (Baldini et al., 2018; Jeffries et al., 2018; Niang et al., 2018; Shaw et al., 2016) y en el sudeste de Asia (Wong et al., 2020). El análisis filogenético reveló que las cepas que infectan a *Anopheles* pertenecen a los supergrupos A o B y exhiben una alta diversidad genética que está muy extendida tanto en África Occidental como Oriental (Baldini et al., 2018; Wong et al., 2020). Además, se encontró que las poblaciones de *An. gambiae* y *Anopheles coluzzi* Coetzee & Wilkerson silvestres infectadas con *Wolbachia* tienen una frecuencia más baja de infecciones con *Plasmodium* que las poblaciones que resultaron negativas a la infección con la bacteria (Gomes & Barillas-Mury, 2018; Shaw et al., 2016). Estos hallazgos apoyan el uso potencial de *Wolbachia* para controlar la transmisión de patógenos transmitidos por vectores. También, mediante la técnica de secuenciación del gen *16S ARNr* y la tipificación de secuencias multilocus, se detectó la presencia de *Wolbachia* en poblaciones naturales de *Ae. aegypti* (Balaji et al., 2019; Carvajal et al., 2019). Particularmente, Balaji et al. (2019) demostraron la presencia de *Wolbachia* mediante microscopía electrónica en los ovarios de hembras de una población de *Ae. aegypti* de la India. Esta nueva cepa se denominó *wAegB* y pertenece al supergrupo B. Estos estudios indicaron frecuencias de infección variables en las distintas poblaciones y señalaron que la mayoría de las cepas detectadas estaban estrechamente relacionadas o eran idénticas a la infección con *wAlbB* que ocurre en *Ae. albopictus* (Balaji et al., 2019; Carvajal et al., 2019; Kulkarni et al., 2019; Vittori et al., 2016), mientras que otros estudios también detectaron cepas que pertenecen a supergrupos que hasta el momento no se habían registrado en el orden Diptera (Carvajal et al., 2019; Thongsripong et al., 2018). Sin embargo, algunos autores toman estos hallazgos con cautela, enfatizando las limitaciones de los trabajos mencionados debido a las

implicancias que las infecciones naturales en esta especie hospedadora podrían tener en el control de enfermedades (e.g. Ross et al., 2020a).

Hasta el momento todas las cepas identificadas en mosquitos se encuentran dentro de los supergrupos A o B de *Wolbachia*, e incluso se pueden producir superinfecciones (i.e. infecciones con dos o más cepas) (Zhou et al., 1998; Werren et al., 1995b). Las similitudes entre las cepas que infectan las diferentes especies indican la facilidad con que los mosquitos se encuentran y adquieren nuevas infecciones (transferencia horizontal). Dentro de cada especie puede haber variación en la infección entre las distintas poblaciones, desde bajas frecuencias hasta la fijación (Charlesworth et al., 2019; Hilgenboecker et al., 2008). A veces las prevalencias de las infecciones con *Wolbachia* pueden subestimarse debido a que pueden ocurrir a densidades muy bajas que no son detectables mediante PCR convencional (Mee et al., 2015).

Desde que se descubrió que algunas cepas tienen la capacidad de interferir o bloquear la transmisión de ciertos arbovirus de importancia sanitaria como dengue y Zika (Landmann, 2019), existe un interés generalizado en la utilización de mosquitos infectados con *Wolbachia* generados experimentalmente para el control biológico de enfermedades infecciosas (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011). Si bien poco se sabe sobre el mecanismo de la interacción *Wolbachia*-arbovirus, en parte porque esta bacteria no puede cultivarse *in vitro* (Bull & Turelli, 2013), se han generado más de 25 nuevos tipos de infección con *Wolbachia* en mosquitos mediante microinyección embrionaria, especialmente en los principales vectores de dengue como son *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Ross et al., 2019b). Como se describió en la introducción general, los mosquitos transinfectados con *Wolbachia* se liberan en el campo utilizando dos enfoques: el reemplazo de la población y la supresión de la población (Atyame et al., 2014; Iturbe-Ormaetxe et al., 2011). Ambos métodos de biocontrol basados en *Wolbachia* requieren la liberación a campo de individuos transinfectados con cepas de esta bacteria y el éxito de la estrategia dependerá en parte de los nuevos tipos de infección que inducen IC durante el cruzamiento con la población de mosquitos silvestres (Ross et al., 2020b). Por esta razón, antes de la liberación es crucial saber qué cepas de *Wolbachia* están presentes en las poblaciones silvestres porque i) las infecciones naturales preexistentes pueden interactuar y alterar la dinámica de las cepas introducidas, haciendo que el reemplazo o supresión de la población sea un

obstáculo difícil de sortear (Rasgon & Scott, 2004); ii) la dinámica de la propagación de *Wolbachia* puede complicarse a medida que aumenta el número de cepas incompatibles presentes en la población (Turelli & Hoffmann, 1995). Además, comprender las similitudes y diferencias entre las cepas de *Wolbachia* que infectan diferentes especies de mosquitos es fundamental para estimar con qué frecuencia (en tiempos evolutivos) los mosquitos experimentan eventos de transmisión horizontal de esta bacteria en la naturaleza (Rasgon & Scott, 2004). Por otra parte, el estudio de la infección con *Wolbachia* en especies de mosquitos vectores y no vectores facilita el descubrimiento de cepas novedosas de esta bacteria con características deseables que se puede utilizar para transinfectar artificialmente a otras especies de interés (Bourtzis et al., 2014).

1.1.2. Antecedentes en Argentina

Los trabajos realizados sobre *Wolbachia* en poblaciones de mosquitos de Argentina son escasos y se realizaron principalmente sobre *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. pipiens*. Morais et al. (2012) detectaron la infección con *Wolbachia* en una población de *Cx. quinquefasciatus* proveniente de la localidad de La Plata. Micieli & Glaser (2014) han demostrado que la reducción en la competencia vectorial para el Virus del Nilo Occidental de una línea de laboratorio de *Cx. quinquefasciatus* proveniente de USA asociada a una cierta densidad somática de *Wolbachia* no es extrapolable a otra colonia de esta especie de Argentina. Esto se debe a que la densidad somática de *Wolbachia* hallada en la colonia de Argentina de *Cx. quinquefasciatus* resultó ser muy variable, desde valores altos a muy bajos, y no lograría inducir resistencia al patógeno mencionado. Asimismo, esta variabilidad plantea que el impacto de *Wolbachia* sobre la competencia vectorial en *Cx. quinquefasciatus* probablemente se limite a poblaciones específicas. Por otro lado, Díaz-Nieto (2014) llevó a cabo la detección de *Wolbachia* en mosquitos del género *Culex* de Mar del Plata y registrando su presencia en individuos de *Cx. pipiens*. Además, Díaz-Nieto et al. (2021) caracterizaron la cepa de *Wolbachia* de una población de *Cx. quinquefasciatus* proveniente de la provincia de San Juan a la que llamaron wPipSJ y evaluaron la susceptibilidad de este mosquito a agentes bacterianos. Hallaron que la cepa wPipSJ pertenece al supergrupo B y que se agrupa con otras cepas de mosquitos como wPip y wAlbB. Además, los individuos

infectados naturalmente con la cepa nativa resultaron ser menos susceptibles a la acción patógena de las cepas bacterianas mosquitocidas.

En este trabajo de tesis, se investigó sobre la ocurrencia de este simbiote en poblaciones de mosquitos de los géneros *Aedes* y *Culex*, en sistemas naturales. Los estudios del género *Aedes* se centraron en una especie de comprobada importancia sanitaria, *Ae. albopictus* y, en *Ae. fluviatilis* y *Ae. albifasciatus*. Respecto al género *Culex*, se estudiaron poblaciones híbridas del complejo *Cx. pipiens*.

Aedes fluviatilis es una especie nativa de Brasil y se distribuye en el Neotrópico. Se la encuentra desde México hasta Argentina y habita en áreas silvestres, semi-silvestres, suburbanas y urbanas (Multini et al., 2016). En la Figura 5 A está representada la distribución de *Ae. fluviatilis* en Argentina. *Aedes albopictus* es una especie originaria del sudeste asiático y se ha extendido a África, Medio Oriente, Europa y América del Norte y del Sur (Benedict et al., 2007). En la Argentina se la detectó por primera vez en 1998 en San Antonio, provincia de Misiones (Rossi et al., 1999). Actualmente su distribución sigue restringida al Noreste de Argentina; se la detectó en otras cuatro localidades de Misiones y dos localidades de Corrientes (Figura 5 B) (Goenaga et al., 2020; Lizuain et al., 2019; Rossi et al., 2006; Schweigmann et al., 2004). Si bien ambas especies ya presentan reportes de infección con *Wolbachia* (Baton et al., 2013; Sinkins et al., 1995a), esta condición aún no ha sido explorada en Argentina. También se estudió la presencia de *Wolbachia* en *Ae. albifasciatus*, el mosquito de las inundaciones. Es una especie Neotropical, presente desde Bolivia, pasando por el sur de Brasil, Uruguay, Chile, llegando al sur de la Patagonia hasta Tierra del Fuego (Argentina) (Ludueña Almeida & Gorla, 1995). En la Figura 6 se detalla la distribución de *Ae. albifasciatus* en Argentina. Si bien es un mosquito con escasa implicancia vectorial, en 1982 fue incriminado como vector del virus de la encefalitis equina del Oeste en Argentina (Mitchell et al., 1987). Además, esta especie representa un grave problema en regiones donde periódicamente se inundan pequeñas depresiones del suelo en las que colocan huevos resistentes a la desecación, provocando la emergencia simultánea de mosquitos adultos y convirtiéndose en una plaga (Ludueña Almeida & Gorla, 1995). Al tener un hábitat que va desde áreas rurales al ambiente peri-doméstico ataca insistentemente a humanos y mamíferos domésticos, causando perjuicios a los habitantes e interfiriendo con la alimentación

normal del ganado en las áreas agrícola-ganaderas, ocasionando de esta manera pérdidas en la producción de leche y carne (Ludueña Almeida, 1994). En cuanto al complejo *Cx. pipiens*, las especies que más abundan en el mundo son *Cx. pipiens* s.s., el cual presenta los ecotipo *pipiens* y *molestus*, y *Cx. quinquefasciatus*. En la Argentina, el complejo *Cx. pipiens* tiene una distribución de Norte a Sur compuesta por *Cx. quinquefasciatus* en el Norte, individuos híbridos en el centro del país y *Cx. pipiens* s.s. en el extremo sur (Figura 7) (Almirón et al., 1995). Son vectores cosmopolitas de patógenos de enfermedades que afectan a los seres humanos y los animales, como el virus del Nilo Occidental y el virus de la encefalitis de San Luis, ambos con casos reportados en humanos en Argentina (Cardo et al., 2020). Como se comentó anteriormente, los antecedentes de infección con *Wolbachia* en mosquitos de Argentina se concentran sobre todo en *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. pipiens*, por lo que en este trabajo se estudió una población particular que está compuesta por híbridos del complejo *Cx. Pipiens* (Almirón et al., 1995). Los híbridos se consideran de gran importancia epidemiológica ya que pueden mostrar un comportamiento de picadura más oportunista (Hamer et al., 2008).

En este capítulo se evaluó el estado de infección de *Wolbachia* en poblaciones naturales de *Ae. albifasciatus*, *Ae. fluviatilis*, *Ae. albopictus* y en poblaciones híbridas del complejo *Cx. pipiens*. Se identificaron las cepas halladas y se determinó su prevalencia en las poblaciones de mosquitos donde se detectó la infección.

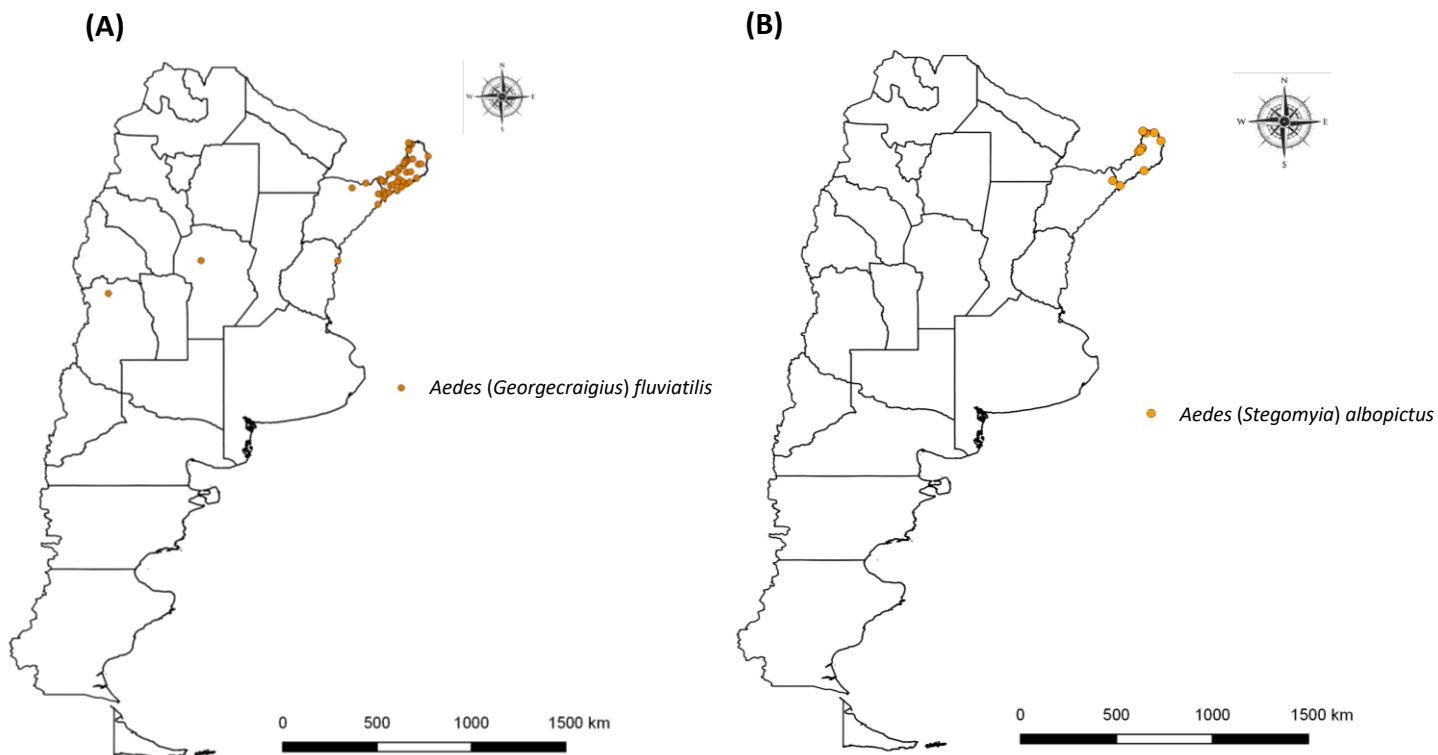


Figura 5. Mapa de distribución de *Ae. fluviatilis* (A) y *Ae. albopictus* (B) en Argentina.

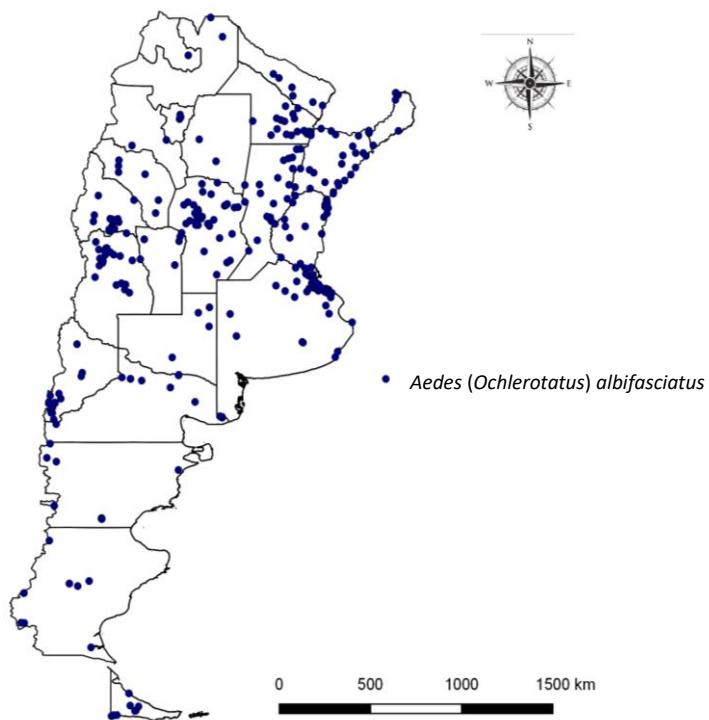


Figura 6. Mapa de distribución de *Ae. albifasciatus* en Argentina.

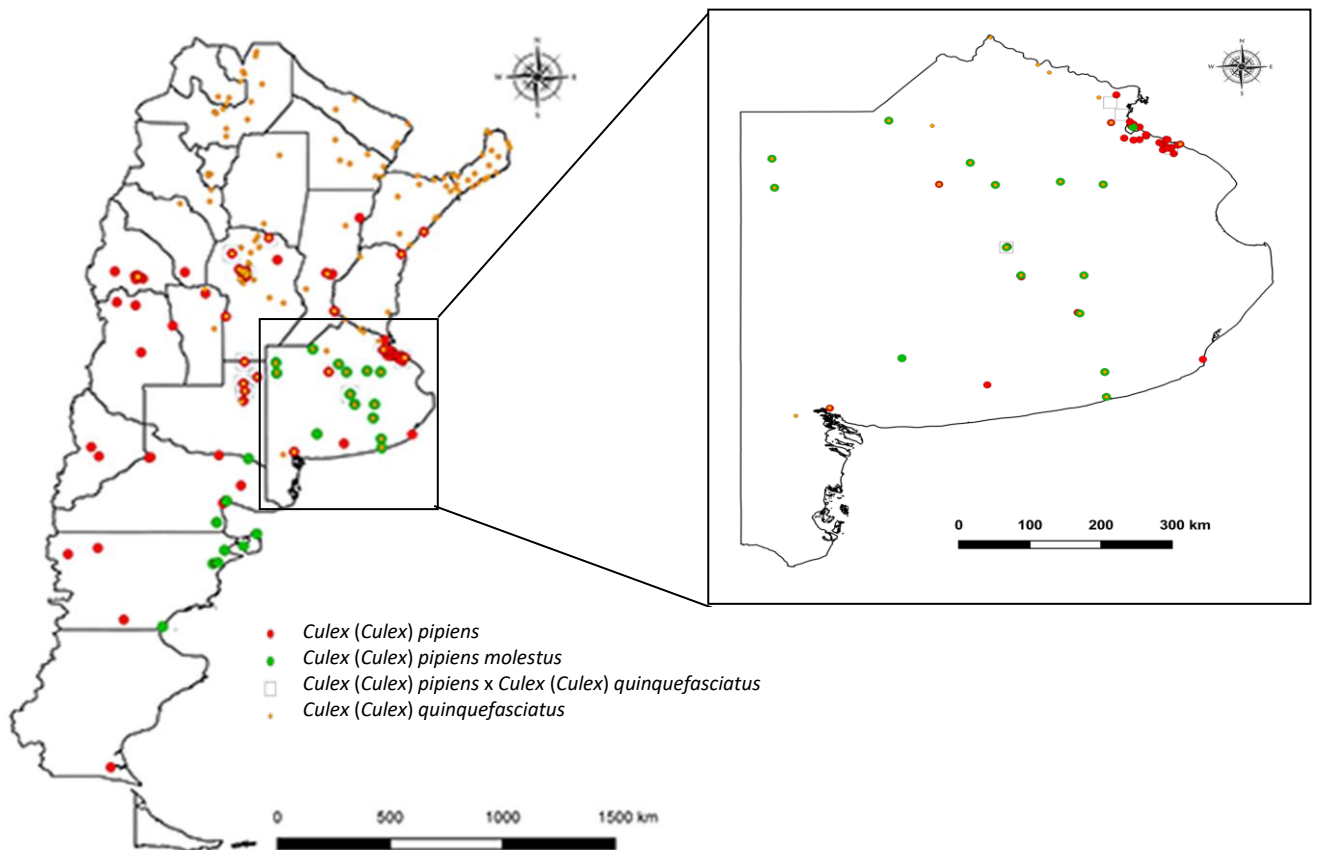


Figura 7. Mapa de distribución del complejo *Cx. pipiens* en Argentina.

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Descripción de área de muestreo:

Los muestreos se realizaron en cinco localidades ubicadas en dos provincias: la ciudad de La Plata, Ensenada y Berisso, provincia de Buenos Aires, y Eldorado y Puerto Iguazú, provincia de Misiones. Se obtuvo el permiso NEA 326 para coleccionar material dentro del Parque Nacional Iguazú, el cual pertenece a la Administración de Parques Nacionales, Argentina.

Las localidades de La Plata ($34^{\circ}55'07''$ S - $57^{\circ}57'15''$ O), Ensenada ($34^{\circ}51'S$ - $57^{\circ}54'$ O) y Berisso ($34^{\circ}52'00''$ S - $57^{\circ}52'00''$ O) están ubicadas a 26 m s.n.m., 4 m s.n.m y 6 m s.n.m, respectivamente. Corresponden a la eco-región de la Pampa, que tiene predominio de llanuras y pastizales. La temperatura media anual es de $16,5^{\circ}\text{C}$ y la precipitación media anual es de 900 mm (Cabrera & Willink, 1980).

Las localidades de Eldorado ($26^{\circ}24'00''$ S - $54^{\circ}38'00''$ O) y Puerto Iguazú ($25^{\circ}36'39''$ S - $54^{\circ}34'49''$ O) están ubicadas a 212 m s. n. m. y 162 m s. n. m., respectivamente.

Ambas pertenecen a la eco-región de la Selva Paranaense, la cual se caracteriza por presentar tres estratos arbóreos con lianas, epífitas y hemiepífitas y un sotobosque de helechos y fanerófitas herbáceas y arbustivas, incluidas bambúseas (Cabrera & Willink, 1980). El clima es cálido y húmedo, sin una estación seca marcada, con una temperatura media anual de 20°C y una precipitación media anual de 1800 mm (Oyarzabal et al., 2018; Burkart et al., 1999).

En la ciudad de Berisso se colectaron ejemplares del complejo *Cx. pipiens*, en Ensenada individuos de *Ae. albifasciatus* y en La Plata se colectaron ambas especies. En las localidades de Eldorado, se capturaron individuos de *Ae. fluviatilis* y *Ae. albopictus* y en Puerto Iguazú *Ae. albopictus*.

1.2.2. Colección de culícidos:

La metodología de colecta de los culícidos varió con la especie en cuestión por lo que se detalla a continuación el procedimiento para cada una de ellas.

1.2.2.1. *Aedes albifasciatus*

Se colectaron individuos adultos de esta especie en los alrededores de charcos de agua de lluvia temporales, donde las hembras suelen oviponer, mediante el uso de aspiradores manuales a batería (Figura 8 A y B). Se utilizó una persona como cebo y cuando los mosquitos se acercaban a picar se los aspiró, colectando principalmente hembras; los individuos luego fueron colocados en jaulas de cartón circulares de 25 cm de alto x 22 cm diámetro para ser transportados al laboratorio (Figura 8 C). Allí se los sacrificó con frío y se corroboró la identificación de la especie mediante el uso de una clave dicotómica (Darsie, 1985). Todos los individuos fueron almacenados en el freezer a -80°C para su posterior procesamiento mediante técnicas de Biología Molecular con el objetivo de detectar la infección con *Wolbachia*.



Figura 8. Sitio de colecta de *Ae. albifasciatus*, A- Charcos temporarios; B- aspiradores manuales; y C- jaulas de cartón para traslado del material de campo.

Los muestreos se realizaron durante los meses de marzo, abril y mayo del 2017 en la localidad de La Plata en dos sitios: Cementerio Municipal ($34^{\circ}57'20''$ S - $57^{\circ}57'06''$ O) y Facultad de Ciencias Naturales y Museo ($34^{\circ}54'29''$ S – $57^{\circ}55'36''$ O), y en Ensenada en un sitio: villa del Plata ($34^{\circ}49'52,59''$ S - $57^{\circ}58'1,33''$ O) (Figura 9).

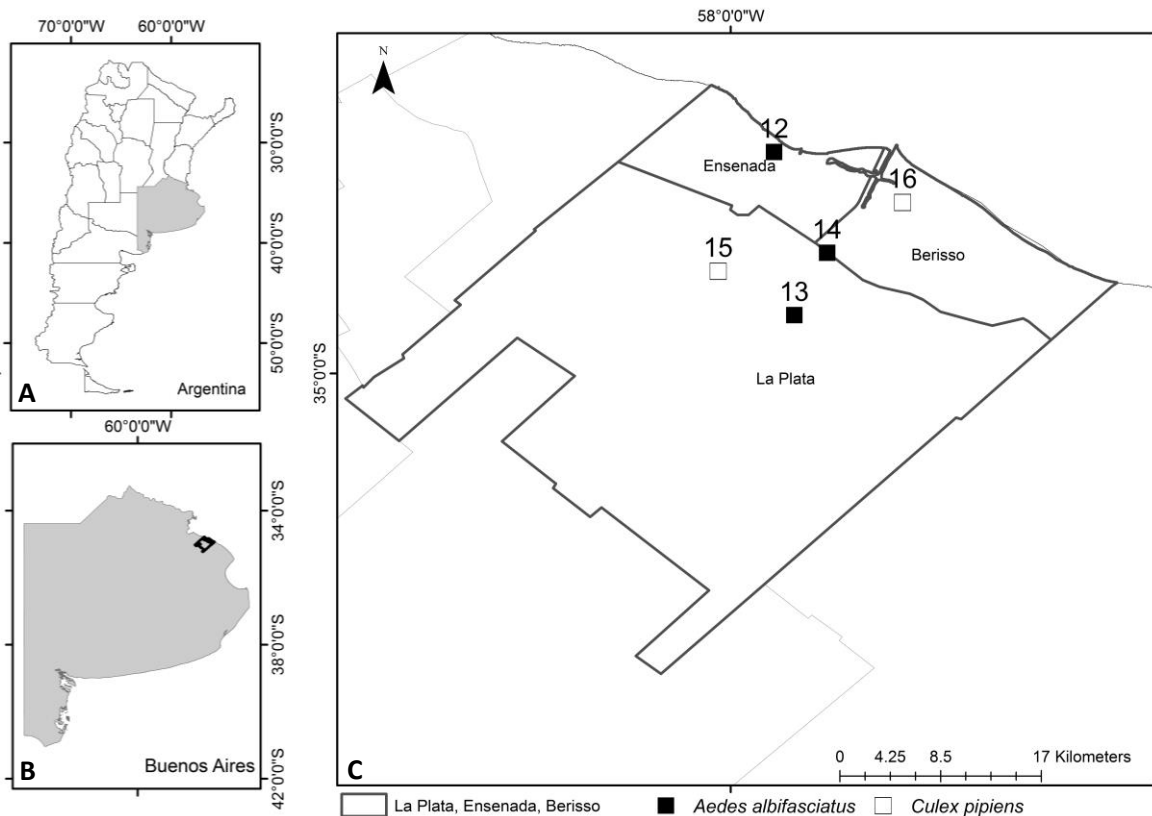


Figura 9. Sitios de colecta de *Ae. albifasciatus* y del complejo *Cx. pipiens*. A- Mapa de Argentina, el área gris indica la provincia de Buenos Aires. B- Mapa de la provincia de Buenos Aires, la línea negra delimita las ciudades de La Plata, Berisso y Ensenada. C- Área de muestreo de la ciudad de La Plata, Ensenada y Berisso, Buenos Aires. Sitios de colecta de *Ae. albifasciatus*; 12-villa del Plata (Ensenada). 13-Cementerio Municipal (La Plata). 14-Facultad de Ciencias Naturales y Museo (La Plata). Sitios de colecta del complejo *Cx. pipiens*: 15- La Plata (La Cumbre). 16- Berisso.

1.2.2.2. Complejo *Culex pipiens* y *Strelkovimermis spiculatus*

Se realizaron colectas de estadios inmaduros en dos zanjas domiciliarias ubicadas en La Plata (La Cumbre) ($34^{\circ}55'20''$ S – $58^{\circ}00'34''$ O) y Berisso ($34^{\circ}52'11''$ S – $57^{\circ}52'10''$ O) (Figura 9). En estas zanjas se estanca agua de lluvia y del drenaje de cocinas y lavaderos, a lo que suele sumarse efluentes cloacales. Al encontrarse a cielo abierto pueden presentar épocas de sequía cuando las temperaturas son muy altas y periodos de inundación en épocas de lluvias (Figura 10). La colecta se llevó a cabo mediante el uso de pipetas y redes de acuario de malla fina; los estadios inmaduros colectados fueron acondicionados en el insectario hasta la obtención de los adultos. Para ello, las larvas fueron colocadas en bandejas de plástico (30 cm x 18 cm x 6 cm)

con agua declorinada y alimento para cobayo finamente molido. Las pupas fueron colocadas en jaulas de cartón circulares de 25 cm de alto x 22 cm diámetro, donde se obtuvieron los ejemplares adultos. Una vez emergidos los adultos se sacrificaron con frío y fueron almacenados en el freezer -80°C para su posterior procesamiento con el objetivo de detectar la infección con *Wolbachia* mediante técnicas moleculares. Al mismo tiempo, se separaron adultos que fueron alimentados con sangre de gallina tres veces por semana para la obtención de las balsas de huevos. Las balsas fueron colocadas individualmente en bandejas de plásticos (30 cm x 18 cm x 6 cm) con agua declorinada y alimento para cobayo finamente molido. De cada bandeja se tomó una larva del cuarto estadio para luego realizar la identificación de la especie por medio de técnicas de biología molecular.



Figura 10. Sitios de colecta de larvas del complejo *Cx. pipiens*, zanjas de desagüe domiciliarias de la localidad de Berisso.

Durante la colecta de larvas del complejo *Cx. pipiens* en el año 2020 para el capítulo 3 de esta tesis se detectó la presencia del parasitoide *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino (Nematoda, Mermithidae). Estos mermítidos son parasitoides obligados de la cavidad general de insectos que provocan la muerte del hospedador y presentan un sincronismo con el ciclo de vida de su hospedador (Achinelly & Micieli, 2016). Durante su ciclo de vida, el estado preparásito (estadio juvenil 2) ingresa de forma activa a la larva de mosquito donde se alimenta y se desarrolla hasta el estado postparásito (estadio juvenil 4) el cual emerge del hospedador produciendo un efecto letal. Luego, se entierra en el sustrato de los criaderos y muda al estado adulto, donde

se produce la cópula y ovipone, completando el ciclo (Figura 11) (Achinelly & Micieli, 2016).

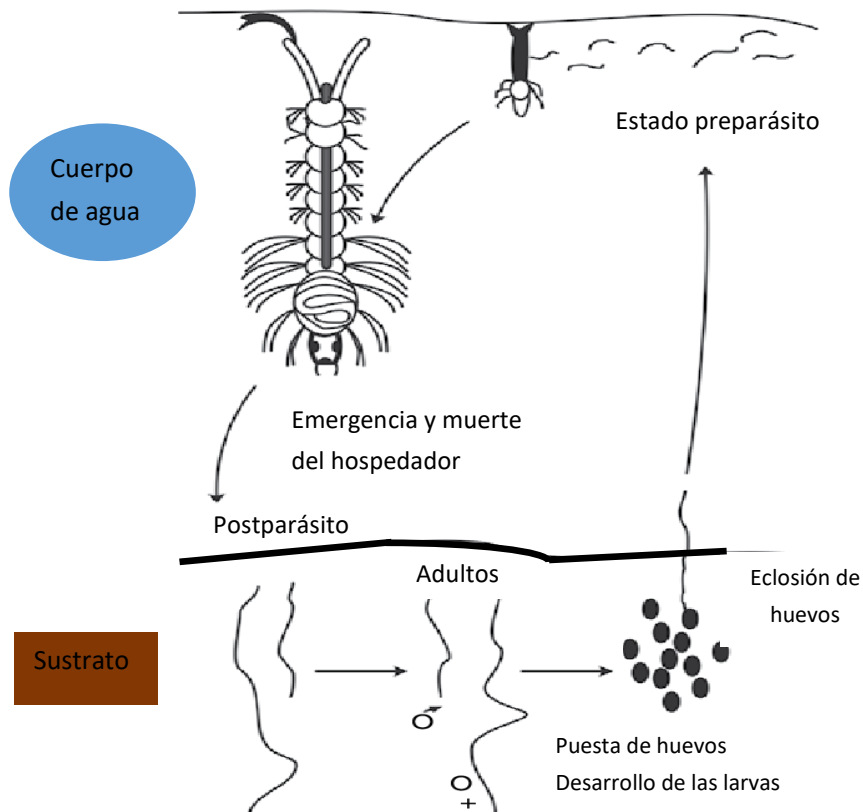


Figura 11: Ciclo de vida de *S. spiculatus*. Extraído y modificado de Bisen & Raghuvanshi (2013).

Dado que las estrategias parasitarias podrían facilitar la transferencia horizontal de *Wolbachia* al exponer a ambos individuos al intercambio microbiano (Sanaei et al., 2020), se decidió evaluar la presencia de esta bacteria en los individuos colectados de *S. spiculatus* bajo la hipótesis de la posible transferencia horizontal de *Wolbachia* en esta interacción parasitoide-hospedador. Con este fin las larvas de *Cx. pipiens* colectadas en la zanja de La Plata (Figura 9), se transportaron al laboratorio y se colocaron en bandejas que contienen una rejilla de malla fina en el medio; los individuos se pusieron por encima de la rejilla y se inundaron con agua. Cuando los nematodos emergían de las larvas produciendo la muerte de las mismas, pasaban a través de la rejilla y se depositaban en el fondo de la bandeja. Se controló diariamente la emergencia de los adultos, los cuales fueron almacenados con agua destilada en el freezer a -20°C hasta su posterior procesamiento en el laboratorio de biología molecular. Se obtuvieron 5 individuos de *S. spiculatus* para extracción de ADN y posterior diagnóstico de la infección con *Wolbachia* con el objetivo de estudiar un

posible evento de transferencia horizontal de esta bacteria entre el nematodo y el complejo *Cx. pipiens*.

1.2.2.3. *Aedes albopictus* y *Aedes fluviatilis*

Se realizaron cuatro campañas en la provincia de Misiones (abril 2017, septiembre 2017, marzo 2018 y enero 2019). En Eldorado se colectaron ambas especies de mosquitos. Los sitios de colección fueron cuatro gomerías (26°24'56,7'' S - 54°37'11'' O; 26°25'17,5'' S - 54°38'39'' O; 26°40'14,6'' S - 54°65'32,9'' O; 26°41'46,4'' S - 54°60'31.1'' O), el autódromo (26°25'17,5'' S - 54°38'39'' O), el Parque Municipal Schwelm (26°24'36,4'' S - 54°41'20,9'' O), el Parque Natural Municipal Salto Küppers (26°23'12,5'' S - 54°40'55,9'' O) y el barrio Ziegler (26°41'90,9'' S - 54°60'24,7'' O) (Figura 12 A,B,E y 13). En Puerto Iguazú se colectó únicamente *Ae. albopictus* en los siguientes sitios: el cementerio El Salvador (25°36'51'' S - 54°33'54'' O), el kartódromo (25°39'20,1'' S - 54°33'12,4'' O) y el Parque Nacional Iguazú (25°40'54'' S - 54°27'47'' O) (Figura 12 C, D y 14). Se utilizaron cucharones de 400 ml de capacidad, sifones, pipetas y redes de mano para la colección de los estadios inmaduros de *Ae. albopictus* y *Ae. fluviatilis*, los cuales fueron transportados al laboratorio para ser identificados morfológicamente a nivel específico bajo microscopio mediante el empleo de claves dicotómicas (Consoli & Oliveira, 1994; Darsie, 1985). Luego las larvas fueron acondicionadas en el laboratorio en bandejas de plástico (30 cm x 18 cm x 6 cm) con agua declorinada y alimento para cobayo finamente molido. Las pupas fueron colocadas en jaulas de cartón circulares (25 cm alto x 22 cm diámetro), donde se obtuvieron los adultos, los cuales fueron sacrificados con frío y almacenados en el freezer a -80°C para la posterior extracción de ADN.

Posteriormente, se analizó si la infección con *Wolbachia* en *Ae. albopictus* es independiente del sitio de colecta en la provincia de Misiones mediante la prueba exacta de Fisher utilizando el programa R v. v.4.1.0 (RC, 2019) ejecutado a través de Rstudio v1.0.153 (RStudio, 2017).

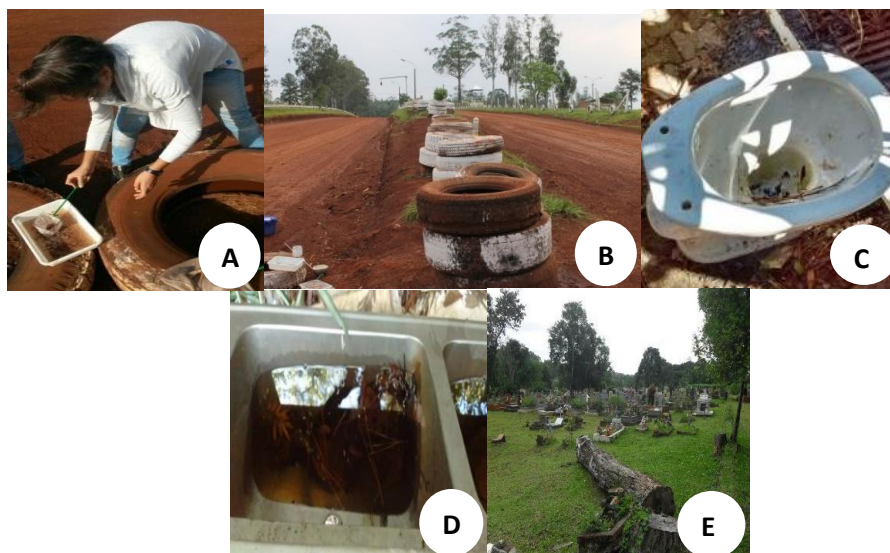


Figura 12. Sitios de colecta de *Ae. albopictus* y *Ae. fluviatilis*. **A, B:** Autódromo/Gomerías (Eldorado); **C, D:** Recipientes artificiales (Puerto Iguazú); **E:** Cementerio (Eldorado).

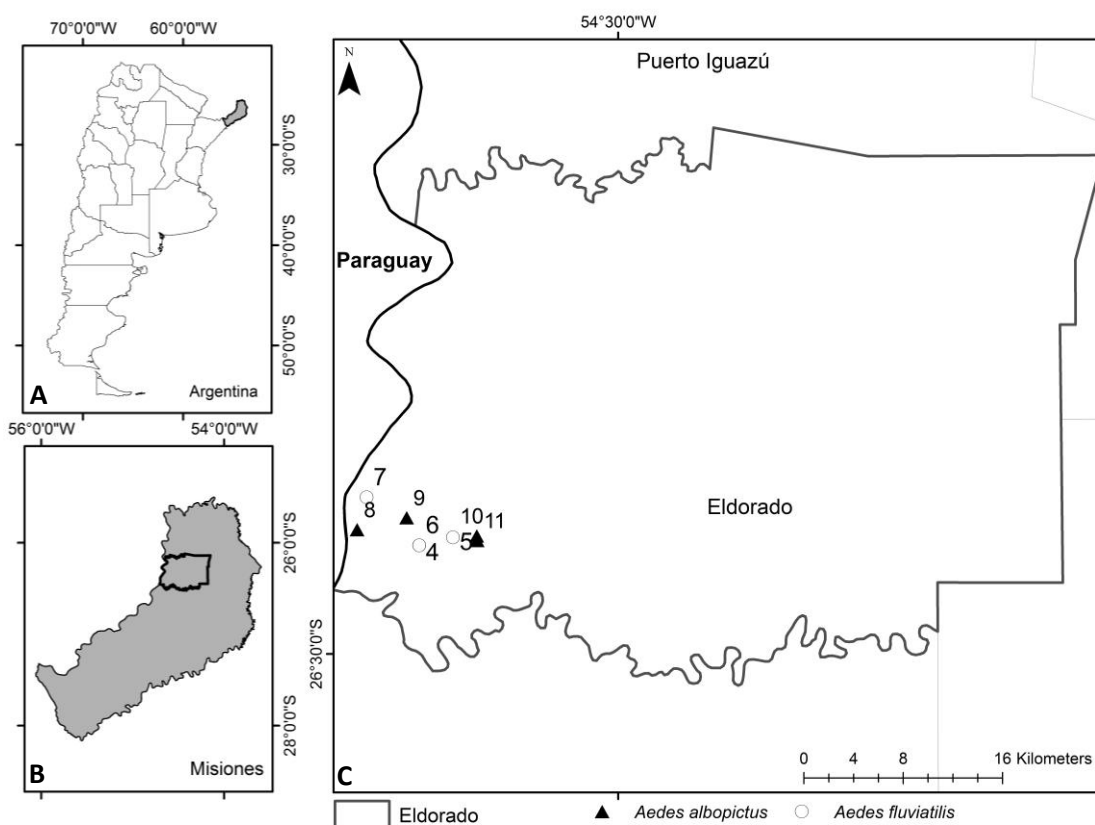


Figura 13. Sitios de colecta de *Ae. albopictus* y *Ae. fluviatilis*. **A-** Mapa de Argentina, el área gris indica la provincia de Misiones. **B-** Mapa de la provincia de Misiones, la línea negra delimita la ciudad de Eldorado. **C-** Área de muestreo de la ciudad de Eldorado, Misiones. Sitio de colecta de *Ae. albopictus* y *Ae. fluviatilis*: **4-**Autódromo. Sitios de colecta de *Ae. fluviatilis*: **5-**Gomería El Negrito, **6-**Gomería Michelin, **7-**Parque Natural Municipal Salto Küppers. Sitios de colecta de *Ae. albopictus*: **8-** Parque Municipal Schwelm, **9-**Gomería km4, **10-** Gomería Irigoyen, **11-** Barrio Ziegler.

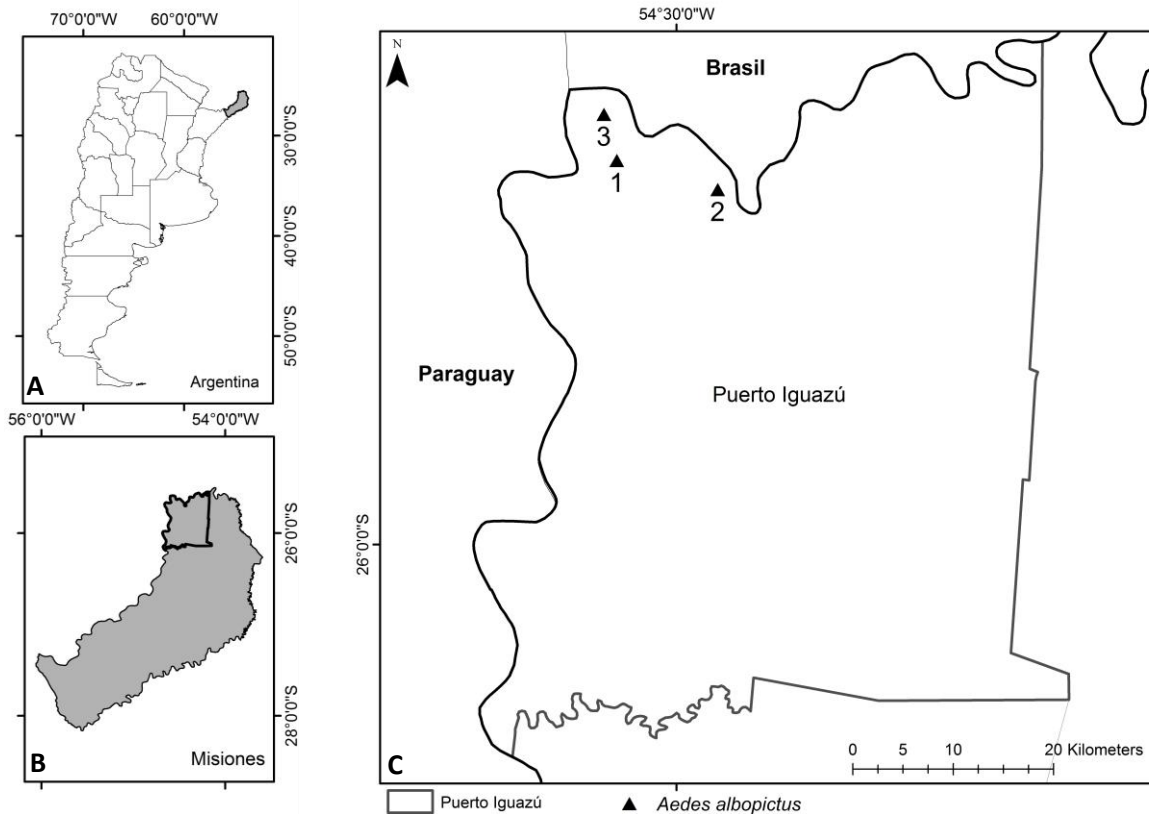


Figura 14. Sitios de colecta de *Ae. albopictus*. A- Mapa de Argentina, el área gris indica la provincia de Misiones. B- Mapa de Misiones, la línea negra delimita la ciudad de Puerto Iguazú. C- Área de muestreo de la ciudad de Puerto Iguazú, Misiones. Sitios de colecta de *Ae. albopictus*: 1-Kartódromo, 2-Parque Nacional Iguazú, 3-Cementerio El Salvador.

1.2.3. Extracción de ADN de mosquitos

La extracción de ADN se realizó en individuos adultos con **Chelex® 100** (BioRad, California). Se preparó una solución al 5% (0,5g en 10ml de agua) de resina Chelex en agua destilada estéril. En un tubo eppendorf se colocó un mosquito en 100µl de la solución de resina Chelex, se agregó 2 µl de la enzima Proteinasa K y se maceró con un pilón. Se incubó durante toda la noche a 56°C y al día siguiente se inactivó la Proteinasa K a 95°C por 10 min. Luego, se centrifugó por 5 min a 14.000 rpm, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

1.2.4. Identificación del complejo *Cx. pipiens* a nivel específico

La identificación a nivel específico se llevó a cabo mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *Acell* (gen nuclear

acetilcolinesterasa-2), que permite distinguir las especies *Cx. pipiens*/*Cx. quinquefasciatus*, y del locus microsatélite *CQ11*, que permite identificar los ecotipos de *Cx. pipiens*, *Cx. p. pipiens*/*Cx. p. molestus*, siguiendo los protocolos de Smith & Fonseca (2004) y Bahnck & Fonseca (2006). Se llevaron a cabo dos PCR *multiplex*: la primera utilizando los siguientes cebadores: ACEquin + ACEpip + B1246s (Tabla 2); y la segunda utilizando los cebadores pipCQ11R + molCQ11R + CQ11F2 (Tabla 2). En la Tabla 1 se indican los productos de amplificación de las PCR que identifican las especies del complejo *Cx. pipiens* (Tabla 1 A) y los ecotipos de *Cx. pipiens* (Tabla 1 B).

Tabla 1: Productos de amplificación de las PCR que identifican **(A)** especies del complejo *Cx. pipiens* y **(B)** ecotipos de *Cx. pipiens*.

(A)	Especie presente	Tamaño del amplicón (pb)	Cebadores	Secuencia (5' - 3')
	<i>Cx. pipiens</i>	610	ACEpip	GGAAACAACGACGTATGTACT
	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	274	ACEquin	CCTTCTTGAATGGCTGTGGCA
	híbrido	610 y 274	B1246s	TGGAGCCTCCTCTCACGG
(B)	Ecotipo presente	Tamaño del amplicón (pb)	Cebadores	Secuencia (5' - 3')
	<i>molestus</i>	250	molCQ11R	CCCTCCAGTAAGGTATCAAC
	<i>pipiens</i>	190-200	pipCQ11R	CATGTTGAGCTTCGGTGAA
	híbrido	250 y 190-200	CQ11F2	GATCCTAGCAAGCGAAC

Las reacciones de amplificación fueron preparadas en un volumen final de 12,5 µl que contenía 6,25 µl de Master Mix (PB-L Productos Bio-Lógicos, Quilmes, Bs. As), 4,25 µl de agua libre de DNAsas, 0,5 µl de cada cebador (10 µM) (Invitrogen, EE. UU.) y 1 µl ADN Molde. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus (Eppendorf®, EE. UU.). Las condiciones de ciclado para la primera PCR fueron 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto durante 35 ciclos, y para la segunda PCR 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos y 72°C por 40 segundos durante 40 ciclos.

Finalizada la reacción, los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) utilizando una cuba Mini-Sub CellGT®, (BioRad, California), conteniendo Buffer TBE 0,5X, y separados a 90 voltios durante 40 minutos. Se sembraron 5 µl del producto de PCR adicionando 1 µl de buffer de carga

(loading buffer). Al gel de agarosa se agregó 0,4 µg/ml de Bromuro de Etidio (*BrEt*) (Promega, EE.UU.) previamente a la corrida. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV Tm-20 Transiluminator (Upland, CA 91786 U.S.A.).

1.2.5. Detección de *Wolbachia*

El diagnóstico de la infección se llevó a cabo por PCR de una región del gen codificante de la subunidad catalítica de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria (*coxA*) de *Wolbachia* utilizando los cebadores diseñados por Baldo et al. (2006) (Tabla 2), usando como control positivo ADN de *Wolbachia* obtenido de *Cx. pipiens* y como control negativo agua libre de DNAsas. Las condiciones de ciclado fueron 94°C durante 15 segundos, 56°C durante 45 segundos, 72°C durante 1 minuto durante 37 ciclos. En el caso de *Ae. Albopictus*, con el fin de detectar una co-infección con las cepas *wAlbA* y *wAlbB*, se realizó una PCR *multiplex* con los cebadores 328F y 691R para la cepa *wAlbA* y 183F y 691R para la cepa *wAlbB*, que amplifican la proteína de superficie *wsp* (*wall surface protein*, por sus siglas en idioma inglés), según lo descrito por Zhou et al. (1998) (Tabla 2). Los productos de amplificación esperados son de 379 pb y 501 pb respectivamente. Las condiciones de ciclado fueron 95°C durante 1 min, 56°C durante 1,5 min y 72°C durante 2 min durante 35 ciclos. Debido a la posible competencia entre los cebadores de *wAlbA* y *wAlbB*, cuando sólo se detectó una cepa, el diagnóstico de la que no fue detectada se realizó de manera independiente. Los resultados negativos de estas PCRs se repitieron dos veces.

La ausencia de amplificación con cebadores específicos para *Wolbachia* podría deberse a: i) la ausencia de *Wolbachia*; ii) una falla en el procedimiento de extracción del ADN; iii) a una concentración incorrecta de la solución de ADN (Werren et al., 1995a). Por lo tanto, como control de la “amplificabilidad” de la extracción de ADN, las muestras que resultaron negativas para la amplificación de genes de *Wolbachia* fueron probadas en una segunda PCR utilizando los cebadores S1718 y A244 que amplifican la Subunidad I de la citocromo oxidasa (*coxI*) (Normark, 1996) (Tabla 2) con las condiciones especificadas por Rodriguero et al. (2010). Con el mismo propósito, para las muestras de *S. spiculatus* se utilizaron los cebadores Merm F 18S y Merm R 18S que amplifican un fragmento de la subunidad *18S ARNr* (Rusconi et al., 2020). Las muestras que arrojaron un resultado negativo para *coxI* y *18S ARNr* fueron excluidas del

conjunto de datos. Las muestras que fueron negativas para los cebadores *wsp* pero positivas para los cebadores *coxI* y *ARNr 18S* se consideraron no infectadas. Todos los resultados negativos para la infección por *Wolbachia* se verificaron dos veces con cebadores *coxA* y *fbpA* (proteína fructosa-1,6-aldolasa bisfosfato) (Baldo et al., 2006b) (Tabla 2).

Todas las reacciones de amplificación fueron preparadas en un volumen final de 12,5 µl que contenía 6,25 µl de Master Mix (PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs. As.), 4,25 µl de agua libre de DNAsas (3,75 µl en el caso de la PCR *multiplex* de *Ae. albopictus*), 0,5 µl de cada cebador (10 µM) (Macrogen Inc., Corea/Invitrogen, EE. UU.) y 1 µl de ADN molde o 1 µl de agua libre de DNAsas para el control negativo. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus (Eppendorf®, EE. UU.).

1.2.5.1. Análisis de datos

La prevalencia fue estimada como la proporción de individuos infectados sobre el total. Las diferencias en las prevalencias halladas entre los sitios de colecta se evaluaron mediante el programa R v. v.4.1.0 (RC, 2019) ejecutado a través de Rstudio v1.0.153 (RStudio, 2017). En primera instancia se evaluó estudiar las diferencias con la prueba de Chi cuadrado (χ^2). Pero como es requisito contar con al menos un 80% de las celdas con valor esperado > 5 y ninguna con valor esperado < 1 para que la aproximación sea válida y esto no se cumplía con los datos obtenidos, finalmente se utilizó la prueba exacta de Fisher.

1.2.6. Identificación de cepas de *Wolbachia* y análisis filogenético

Las cepas halladas se caracterizaron por medio de un sistema estándar muy utilizado para bacterias conocido como MLST (*Multilocus System Typing* por sus siglas en inglés) mediante amplificación y secuenciación de los genes que codifican para la subunidad catalítica de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria (*coxA*), fructosa-1,6-aldolasa bisfosfato (*fbpA*), la proteína de la división celular *ftsZ* (*ftsZ*), la subunidad B de la amidotransferasa aspartilo / glutamil-tRNA (*gatB*) y un fragmento de una proteína hipotética conservada (*hcpA*) (Tabla 2) usando los cebadores y las condiciones descritas en Baldo et al. (2006). Además, en la cepa *wAlbB* se secuenció el gen *wsp* para profundizar su caracterización sobre la base de los motivos de aminoácidos de las

cuatro regiones hipervariables (HVR) de esta secuencia con fines comparativos con la cepa *wAlbA* de *Ae. albopictus* previamente caracterizada por Baldo et al. (2006). Las condiciones de ciclado de los 6 genes de *Wolbachia* fueron: 94°C durante 30 segundos, 48°C (para *ftsZ*), 52°C (para *hcpA*), 55°C (para *gatB*, *coxA* y *fbpA*) y 56°C (para *wsp*) durante 45 segundos, 72°C durante 1min 30 segundos durante 37 ciclos, modificado de Baldo et al., (2006).

Tabla 2. Cebadores utilizados en la identificación de las especies del complejo *Cx. pipiens*, amplificación de un locus mitocondrial en insectos, amplificación de un locus nuclear en nematodos e identificación y tipificación de las cepas de *Wolbachia*.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de <i>annealing</i>	Tamaño del fragmento	Referencia
ACEquin	CCTTCTGAATGGCTGTGGCA	55°C	274 pb	Smith & Fonseca 2004 y Bahnck & Fonseca 2006
ACEpip	GGAAACAACGACGTATGACT		610 pb	
B1246s	TGGAGCCTCCTCTCACGG	54°C	190-200 pb	
pipCQ11R	CATGTTGAGCTTCGGTGAA		250 pb	
molCQ11R	CCCTCCAGTAAGGTATCAAC			
CQ11F2	GATCCTAGCAAGCGAGAAC			
S1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	51°C	~1000 pb	Normark, 1996
A2442	GCTAATCATCTAAAAATTTTAATTCCTGTTGG			
Merm F	CAAGGACGAAAGTTAGAGGTTC	52°C	804 pb	Rusconi et al., 2020
Merm R	GGAAACCTTGTTACGACTTTTA			
328F	CCAGCAGATACTATTGCG	56°C	379 pb	Baldo et al. 2006
183F	AAG GAACCGAAGTTCATG		501 pb	
691R	AAAAATTAACGCTACTCCA			
gatB_F1	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT	55°C	455 pb	Modificado de Baldo et al. 2006
gatB_R1	TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA	55°C	460 pb	
coxA_F1	TTGGRGCRATYAACTTTATAG			
coxA_R1	CTAAAGACTTTKACRCCAGT	52°C	497 pb	
hcpA_F1	GAAATARCAGTTGCTGCAAA			
hcpA_R1	GAAAGTYRAGCAAGYTCTG	48°C	509 pb	
ftsZ_F1	ATYATGGARCATATAAARGATAG			
ftsZ_R1	TCRAGYAATGGATTRGATAT	55°C	480 pb	
fbpA_F1	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT			
fbpA_R1	CCRCCAGARAAAAYYACTATTC	56°C	504 pb	
wsp_F1	GTCCAATARSTGATGARGAAAC			
wsp_R1	CYGCACCAAYAGYRCTRATAA			

Los amplicones se purificaron con el kit Puriprep-GP (Inbio Highway, Bs. As.). Las secuencias de los fragmentos de ADN purificados se obtuvieron con un secuenciador ABI3730 XL (Macrogen Inc., Corea). Los cromatogramas se editaron usando BIOEDIT

(Hall, 1999), observando la intensidad de la señal de amplificación, el ruido de fondo (*background*) y la presencia de dobles picos. Una vez chequeadas estas características se procedió a cortar los extremos de mala calidad de manera manual tanto en la secuencia sentido como en la secuencia antisentido para luego alinearlas y obtener así una secuencia consenso por cada gen amplificado. Las secuencias consenso obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante el algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997) con el fin de corroborar su identidad, confirmando que la amplificación haya sido correcta. Para tipificar las cepas, se asignó la identidad alélica para las secuencias consenso de cada gen por comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos pública para la tipificación molecular de la diversidad genómica microbiana para *Wolbachia* (<https://pubmlst.org/organisms/wolbachia-spp/>) (Jolley et al., 2018). Las cepas se caracterizaron por la combinación de los números alélicos, constituyendo un perfil alélico o ST por “*System type*” en sus siglas en inglés.

Para determinar el supergrupo al cual pertenecen las cepas obtenidas, se realizó un análisis filogenético que incluía cepas de los supergrupos A, B, C, D, F y H. Las secuencias de los genes *coxA*, *fbpA*, *ftsZ*, *gatB* y *hcpA* se concatenaron utilizando el programa Mesquite 2 (Maddison & Maddison, 2007) y se alinearon utilizando el programa CLUSTALW (Thompson et al., 1994). Las unidades terminales fueron 51 cepas de *Wolbachia* recuperadas de la base de datos de *Wolbachia* (Anexo A, Tabla A-A1) y las obtenidas en el presente trabajo. Nuestro conjunto de datos completo incluyó 2079 posiciones nucleotídicas alineadas.

Para inferir el modelo de evolución más apropiado se utilizó el programa jModelTest 2 (Darriba et al., 2015). El modelo GTR + G fue seleccionado para las particiones *coxA*, *ftsZ*, *gatB* y *hcpA* y el modelo GTR + G + I fue el de mejor ajuste para la partición *fbpA*.

El análisis filogenético bayesiano de las secuencias concatenadas se aplicó a través del algoritmo de "cadena de Markov acoplada a metrópolis Monte Carlo" (MC3) implementado en MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) usando un algoritmo particionado. Se realizaron dos análisis independientes con un árbol de inicio aleatorio durante 2.500.000 generaciones con una frecuencia de muestreo cada 500 árboles. El espacio de árboles se exploró utilizando cuatro cadenas: una fría y tres cadenas

calentadas incrementalmente con temperatura (T) ajustada a 0,20. Se evaluó el estado estacionario de la cadena de Markov fría para todos los análisis de MrBayes en TRACER (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), además de inspeccionar la desviación estándar de las frecuencias de escisión de los clados ($< 0,01$). Se descartaron todas las muestras previas al punto de quemado (*burn-in*), en este caso los primeros 500 árboles. Se tomaron en cuenta los árboles restantes para construir la distribución posterior y así obtener un árbol consenso de mayoría del 50% y las estimaciones de las longitudes medias de las ramas. Se estimó la frecuencia de todas las biparticiones (probabilidad posteriores) para evaluar el soporte de cada nodo (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Como la raíz del árbol del género *Wolbachia* aún no se ha determinado, (Bordenstein et al., 2009; Casiraghi et al., 2005)⁹, se enraizó arbitrariamente el árbol con el supergrupo H para examinar las relaciones de grupos hermanos y de esta manera analizar los eventos de transferencia horizontal.

1.3. Resultados

1.3.1. Identificación a nivel específico del complejo *Cx. pipiens*

La identificación del complejo *Cx. pipiens* en la zanja de La Plata y Berisso se realizó a partir de 8 y 4 larvas, respectivamente, provenientes de distintas balsas. Los resultados de las PCR con los cebadores ACEquin, ACEpip y B1246s en ambas zanjas mostraron un patrón de bandas dobles en todos los individuos, lo que indica la presencia de híbridos entre *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* en ambos sitios estudiados (Figura 15). Además, en la zanja de Berisso se observó una única banda de tamaño 250pb con los cebadores pipCQ11R, molCQ11R y CQ11F2 que identifica a la forma *molestus* de *Cx. pipiens* (Figura 15), lo que indica que en estas muestras los híbridos resultan del cruzamiento de la forma *Cx. p. molestus* Forskal con *Cx. quinquefasciatus*. Esto último no pudo ser comprobado en la zanja de La Plata debido a que la PCR mostró un patrón de bandeo inespecífico (Anexo B, Figura A-B1).

⁹ Si bien varios estudios han intentado enraizar el árbol filogenético de *Wolbachia* con los géneros hermanos más cercanos (Bordenstein et al., 2009; O'Neill et al., 1992), los errores sistemáticos asociados con la amplia divergencia entre estos taxones producen artefactos como la atracción de rama larga conduciendo a resultados ambiguos en el árbol enraizado (Bordenstein et al., 2009). Es por ello que se eligió enraizar arbitrariamente con una cepa de un supergrupo diferente a B, lo cual es claramente un artificio para reconocer los grupos monofiléticos en el filograma obtenido.

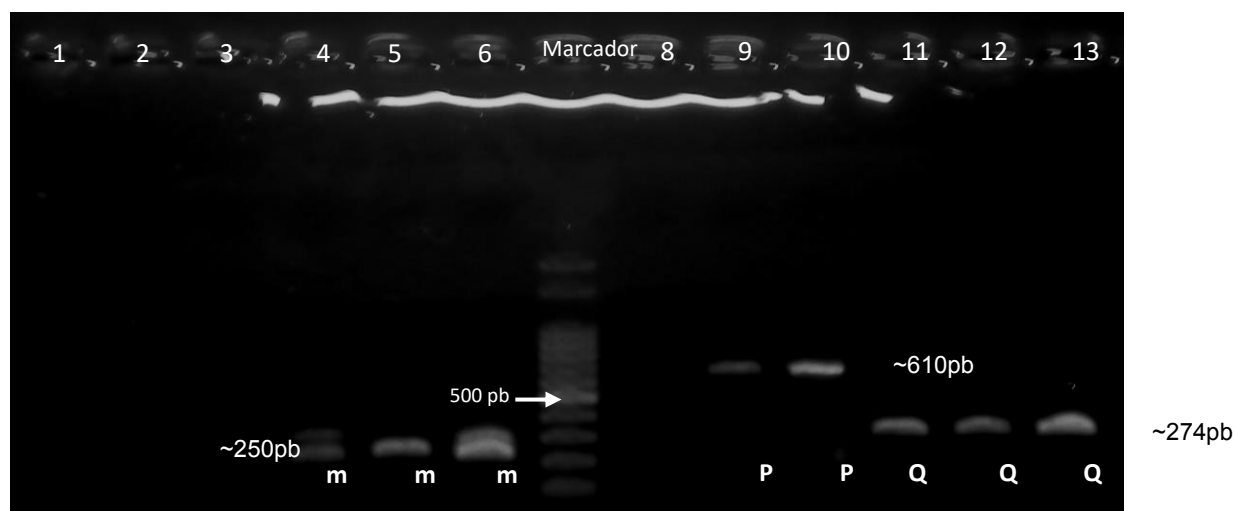


Figura 15. Identificación de los ecotipos de *Cx. pipiens* y las especies del complejo *Cx. pipiens*.

Calles 1-6, identificación de los ecotipos de *Cx. pipiens*. Calle 1-3, producto de amplificación con los cebadores pipCQ11R y CQ11F2; calles 4-6, producto de amplificación con los cebadores molCQ11R y CQ11F2; calle 7, marcador de peso molecular (100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs. As.); calles 8*-13, identificación de las especies del complejo *Cx. pipiens*. Calle 8-10, producto de amplificación con los cebadores de ACEpip y B1246s y calles 11-13, producto de amplificación con los cebadores ACEquin y B1246s. Las calles 1, 4, 8 y 11 corresponden al individuo 1, las calles 2, 5, 9 y 12 al individuo 2 y las calles 3, 6, 10 y 13 al individuo 3. M= *molestus*; P= *Cx. pipiens*; Q= *Cx. quinquefasciatus*.

*El resultado de la calle 8 fue repetido en una segunda PCR dando como resultado final positivo para la identificación de *Cx. pipiens*.

1.3.2. Detección de *Wolbachia*

1.3.2.1. *Aedes albifasciatus*

Se colectó un total de 191 hembras, las cuales fueron analizadas en 62 pooles formados por 2 a 5 individuos: 24 pooles de Villa del Plata, 20 de la Facultad de Ciencias Naturales y 18 del Cementerio Municipal. Los 62 pooles analizados para la detección de *Wolbachia* resultaron negativos, resultando positivo el control de calidad de la extracción realizado con cebadores S1718 y A2442. Es decir que esta población no se halla infectada con *Wolbachia*.

1.3.2.2. Complejo *Culex pipiens* y *Strelkovimermis spiculatus*

Se colectó un total de 118 individuos del complejo *Cx. pipiens*, 64 provenientes de la zanja de La Plata (34 ♀ y 30 ♂) y 54 de la zanja de Berisso (25 ♀ y 29 ♂). La detección de *Wolbachia* se realizó en forma individual y el porcentaje de infección fue del 100% tanto para machos como para hembras en ambos sitios de muestreo. Este resultado indica que, al menos en estas localidades, la infección se halla fijada.

Se obtuvo un total de 5 nematodos parasitoides de *S. spiculatus* a partir de larvas del complejo *Cx. pipiens* provenientes de la localidad de La Plata. Todos los individuos arrojaron un resultado negativo para la infección con *Wolbachia* (Figura 16). El control de la calidad de la extracción de ADN de las muestras efectuado con los cebadores Merm F y R mostró bandas a la altura esperada (800 pb), descartando así un falso negativo (Figura 17).

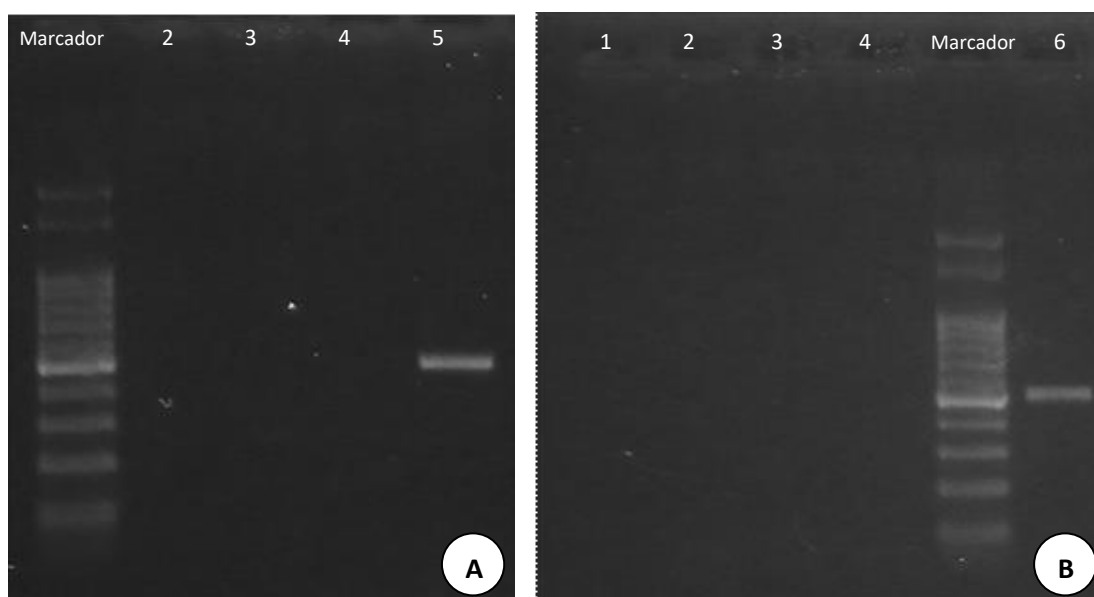


Figura 16. Detección de *Wolbachia* en *S. spiculatus*. A- Calle 1, marcador de peso molecular (100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs. As.). Calle 2, control negativo. Calle 3 y 4, producto de amplificación del gen *coxA* de *Wolbachia* en los individuos 1 y 2 de *S. spiculatus*. Calle 5, control positivo de *Wolbachia*. B- Calle 1, control negativo. Calle 2-4, producto de amplificación del gen *coxA* de *Wolbachia* en los individuos 3, 4 y 5 de *S. spiculatus*. Calle 5, marcador de peso molecular (100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs. As.). Calle 6, control positivo de *Wolbachia*.

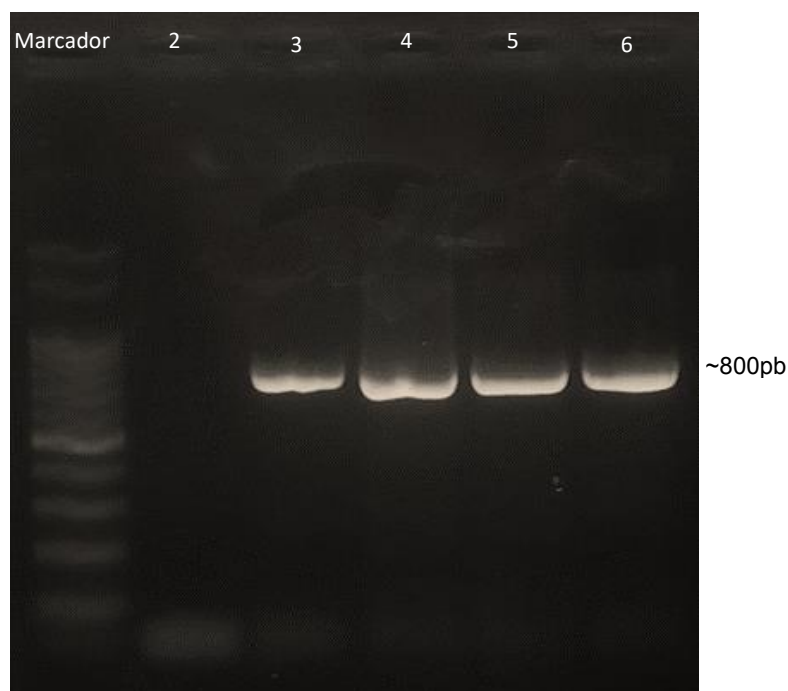


Figura 17. Control de la amplificabilidad de la extracción de ADN de las muestras 2-5 de *S. spiculatus*.
 Calle 1, marcador de peso molecular (100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs. As.). Calle 2, control negativo.
 Calle 3-5, producto de amplificación del gen *18S ARNr* de los individuos *S. spiculatus*.

1.3.2.3. *Aedes fluviatilis*

Se obtuvo un total de 12 individuos de *Ae. fluviatilis* (6 ♀ y 6 ♂), los cuales fueron analizados de manera individual o pooles de 2 a 3 individuos según el sitio de colección. El porcentaje de infección de las hembras fue del 66,6% (solo una hembra dio negativo). La ausencia de producto de amplificación en dicho individuo fue asignado como diagnóstico negativo después de haber puesto a prueba la amplificabilidad (sensu Werren et al., 1995a) del ADN genómico total como ya se señaló más arriba. En los machos se obtuvo un porcentaje de infección del 100%. La prevalencia total fue del 85,7 %. Si bien el número de individuos adultos es bajo debido a la alta mortalidad larval en el estadio IV, más adelante se verá que se obtuvo una prevalencia de infección en larvas de *Ae. fluviatilis* provenientes de campo del 98,3% (N=60) (ver Capítulo 3). Este resultado permite inferir que la bacteria se encuentra cercana a la fijación en esta población.

1.3.2.4. *Aedes albopictus*

En Eldorado se colectó un total de 31 individuos de *Ae. albopictus* (22 ♀ y 9 ♂) y en Puerto Iguazú se colectaron 83 individuos (46 ♀ y 37 ♂). Por lo tanto, se analizó un total de 114 individuos, 68 hembras y 46 machos. Ambas ciudades presentan un polimorfismo para la infección con *Wolbachia*, con individuos con superinfección (wAlbA + wAlbB), simple infección (wAlbA o wAlbB) o libres de infección (Tabla 3). Las muestras que resultaron libres de infección se consideraron diagnóstico negativo luego de haber comprobado la amplificabilidad (sensu Werren et al., 1995a) del ADN genómico total como se procedió anteriormente. Se observa que la superinfección es el tipo de infección con mayor prevalencia tanto en Eldorado como en Puerto Iguazú. La simple infección con la cepa wAlbA se detectó únicamente en hembras de Eldorado en un bajo porcentaje (6%). La infección simple con la cepa wAlbB y los resultados negativos se detectaron tanto en machos como en hembras en ambas localidades. En la Tabla 3 se detallan los resultados de prevalencia según localidad/sitio, sexo y tipo de infección.

Tabla 3. Prevalencia de infección con *Wolbachia* en *Ae. albopictus* según sitio de colección, tipo de infección (doble, simple o sin infección) y sexo de los individuos PNI: Parque Nacional Iguazú.

Localidad/Sitio	Sexo	wAlbA+wAlbB	wAlbA	wAlbB	Negativos	N
Eldorado/Ciudad	♀	65%	6%	12%	7%	15
	♂	0%	0%	20%	80%	5
Eldorado/Autódromo	♀	100%	0%	0%	0%	7
	♂	100%	0%	0%	0%	4
Puerto Iguazú/Cementerio	♀	90%	0%	0%	10%	10
	♂	80%	0%	0%	20%	10
Puerto Iguazú/Kartódromo	♀	67%	0%	0%	33%	9
	♂	80%	0%	20%	0%	10
Puerto Iguazú/PNI (1)	♀	67%	0%	17%	17%	18
	♂	13%	0%	63%	25%	8
Puerto Iguazú/PNI (2)	♀	100%	0%	0%	0%	9
	♂	89%	0%	11%	0%	9

Con fines comparativos, en la Tabla 4 se resumen las prevalencias en los sitios de colecta de *Ae. albopictus* para cada tipo de infección y la prevalencia total para la infección con *Wolbachia* sin discriminar por sexo:

Tabla 4. Prevalencia total de infección con *Wolbachia* y de cada tipo de infección hallada en los diferentes sitios donde se colectó *Ae. albopictus*.

Localidad/Sitio	Prevalencia de infección					N _{total}
	Total	wAlbA+wAlbB	wAlbA	wAlbB	Negativos	
Eldorado/Ciudad	75%	55%	5%	15%	25%	20
Eldorado/Autódromo	100%	100%	0%	0%	0%	11
Puerto Iguazú/Cementerio	85%	85%	0%	0%	15%	20
Puerto Iguazú/Kartódromo	84%	74%	0%	11%	16%	19
Puerto Iguazú/PNI (1)	81%	50%	0%	31%	19%	26
Puerto Iguazú/PNI (2)	100%	94%	0%	6%	0%	18

A partir de la Tabla 4 se evaluó si las diferencias en las prevalencias entre sitios de colecta eran significativas para determinar si la infección con *Wolbachia* en *Ae. albopictus* es independiente del sitio de colecta en la provincia de Misiones.

Los porcentajes de cada tipo de infección entre los sitios estudiados en Eldorado no difirieron significativamente (p -valor = 0,051; Prueba exacta de Fisher). La prueba exacta de Fisher tampoco mostró diferencias significativas al comparar las prevalencias de infección total (i.e. sin discriminar por tipo de infección) entre ambos sitios (p -valor=0,13; Prueba exacta de Fisher). Esto permitió unir estos valores alcanzando una prevalencia de infección total para el Eldorado del 84% (Tabla 5).

Al estudiar los sitios de colecta de Puerto Iguazú no se consideró la infección con wAlbA debido a que las celdas de esta categoría tenían todos los valores igual a cero. El resultado de la prueba exacta de Fisher mostró diferencias significativas entre los polimorfismos hallados entre los sitios muestreados (p -valor = 0,008; Prueba exacta de Fisher). Para evaluar a qué obedecen estas diferencias, se compararon las prevalencias entre pares de sitios estudiados, y se encontraron diferencias significativas entre los dos muestreos del PNI, los cuales fueron realizados a partir de los mismos recipientes, pero en diferentes años (p -valor = 0,006; Prueba exacta de Fisher); no se observaron diferencias significativas entre el Kartódromo y el cementerio (p -valor = 0,49; Prueba exacta de Fisher), lo que permitió sumar sus prevalencias y comparar ese valor con los diferentes muestreos de PNI. Se encontraron diferencias significativas entre el kartódromo+cementerio y PNI1 (p -valor= 0,014; Prueba exacta de Fisher); por el contrario, no hubo diferencias significativas con el PNI2 (p -valor=0,22; Prueba exacta

de Fisher). Al igual que en Eldorado, al comparar las prevalencias totales entre los sitios muestreados no se encontraron diferencias significativas (p -valor=0,25; Prueba exacta de Fisher), lo que nos llevó a determinar una prevalencia de infección con *Wolbachia* del 87% para Puerto Iguazú (Tabla 5). Esto nos lleva a concluir que la prevalencia de infección con *Wolbachia* (sin importar la cepa o el tipo de infección) en *Ae. albopictus* es similar en las dos ciudades estudiadas en Misiones, pero que existen diferencias en cuanto al polimorfismo de la infección con esta bacteria en poblaciones a campo.

En la Figura 18 se compara la prevalencia de *Wolbachia* entre Eldorado y Puerto Iguazú sobre el total de individuos según tipo de infección (sin discriminar sexos ni sitio de colecta). Se observa que las prevalencias son similares, con la única diferencia que en Eldorado se detectó la infección simple con la cepa wAlbA.

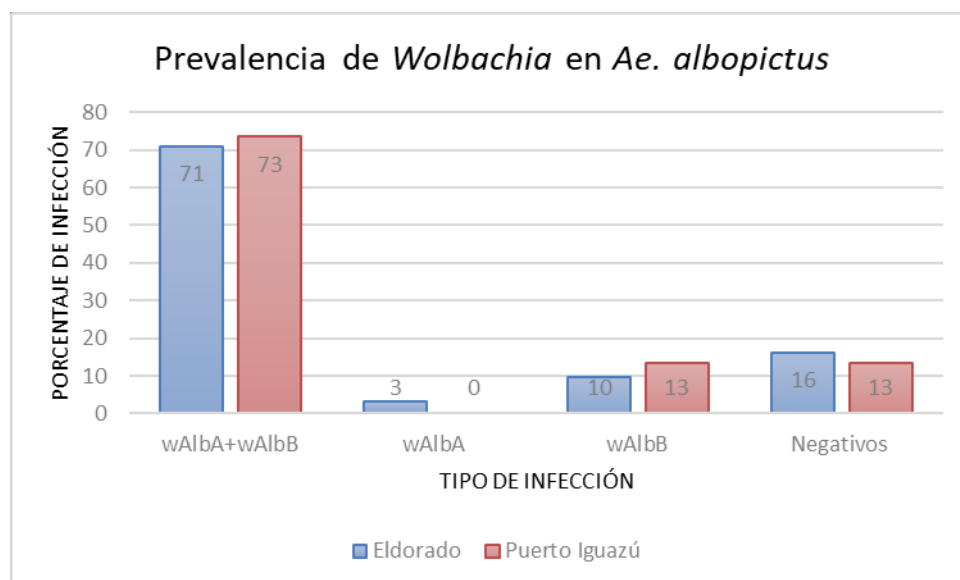


Figura 18. Prevalencia de *Wolbachia* en las poblaciones de Eldorado y Puerto Iguazú de *Ae. albopictus* discriminando el tipo de infección.

En la Tabla 5 se resumen las prevalencias totales de *Wolbachia* en todas las especies estudiadas. En *Ae. albifasciatus* la prevalencia es 0% ya que no se detectó ningún individuo infectado con *Wolbachia*. En *Ae. fluviatilis* el porcentaje de infección en adultos es del 86%. En *Ae. albopictus* las prevalencias son similares entre ambas ciudades, siendo el 84% para Eldorado y 87% para Puerto Iguazú; estos valores indican que, en los tres últimos casos, la bacteria se encuentra cercana a la fijación. En el caso de los híbridos del complejo *Cx. pipiens* la bacteria se encuentra fijada en ambos sitios estudiados.

Tabla 5. Prevalencia total de *Wolbachia* en las poblaciones estudiadas de *Ae. albifasciatus*, *Ae. fluviatilis*, *Ae. albopictus* y el complejo *Cx. pipiens*. P=pooles de 2 a 5 individuos; I=individuos

Especie	Localidad	% Infección	N
<i>Ae. albifasciatus</i>	La Plata	0%	62P
Complejo <i>Cx. pipiens</i>	La Plata	100%	64I
	Berisso	100%	54I
<i>Ae. fluviatilis</i>	Eldorado	86%	7P/I
<i>Ae. albopictus</i>	Eldorado	84%	31I
	Puerto Iguazú	87%	83I

1.3.3. Identificación de cepas de *Wolbachia* y análisis filogenético

Los perfiles alélicos de las cepas wAlbB (*Ae. albopictus*), wFlu (*Ae. fluviatilis*) y wPip (*Culex* sp.) se detallan en la Tabla 6. Además, para la cepa wAlbB se muestra el genotipo de las cuatro regiones hipervariables del gen *wsp* (HVRs 1-4). Esta información se reporta por primera vez para las cepas wAlbB y wFlu, no así para la cepa wPip la cual coincidió con la ya reportada en *Cx. pipiens* (Baldo et al., 2006b).

Tabla 6. Perfil alélico de las cepas wAlbB (*Ae. albopictus*), wFlu (*Ae. fluviatilis*) y wPip (*Culex* sp.) detectadas.

Cepa	Locus	<i>coxA</i>	<i>fbpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>gatB</i>	<i>hcpA</i>	HVR1	HVR2	HVR3	HVR4
wAlbB	Alelo	229	27	210	242	166	10	82	10	84
wFlu	Alelo	66	27	179	215	229				
wPip	Alelo	3	4	22	4	3				

La Figura 19 muestra el filograma reconstruido a partir de las secuencias obtenidas en el presente trabajo para las cepas wAlbB, wFlu y wPip. Las mismas se agruparon con aquellas recuperadas de la base de datos que pertenecen al supergrupo B con un alto soporte (probabilidad posterior = 1). La posición filogenética de wAlbB concuerda con el resultado de Zhou et al. (1998). A pesar de que la naturaleza “en mosaico” de esta secuencia de la pared celular de *Wolbachia* (Baldo et al., 2006b; Casiraghi et al., 2005) podría haber sesgado el resultado de Zhou et al. (1998), en el presente trabajo se

confirma que *wAlbB* pertenece efectivamente al supergrupo B del género *Wolbachia*, al igual que *wFlu* y *wPip* (Figura 19).

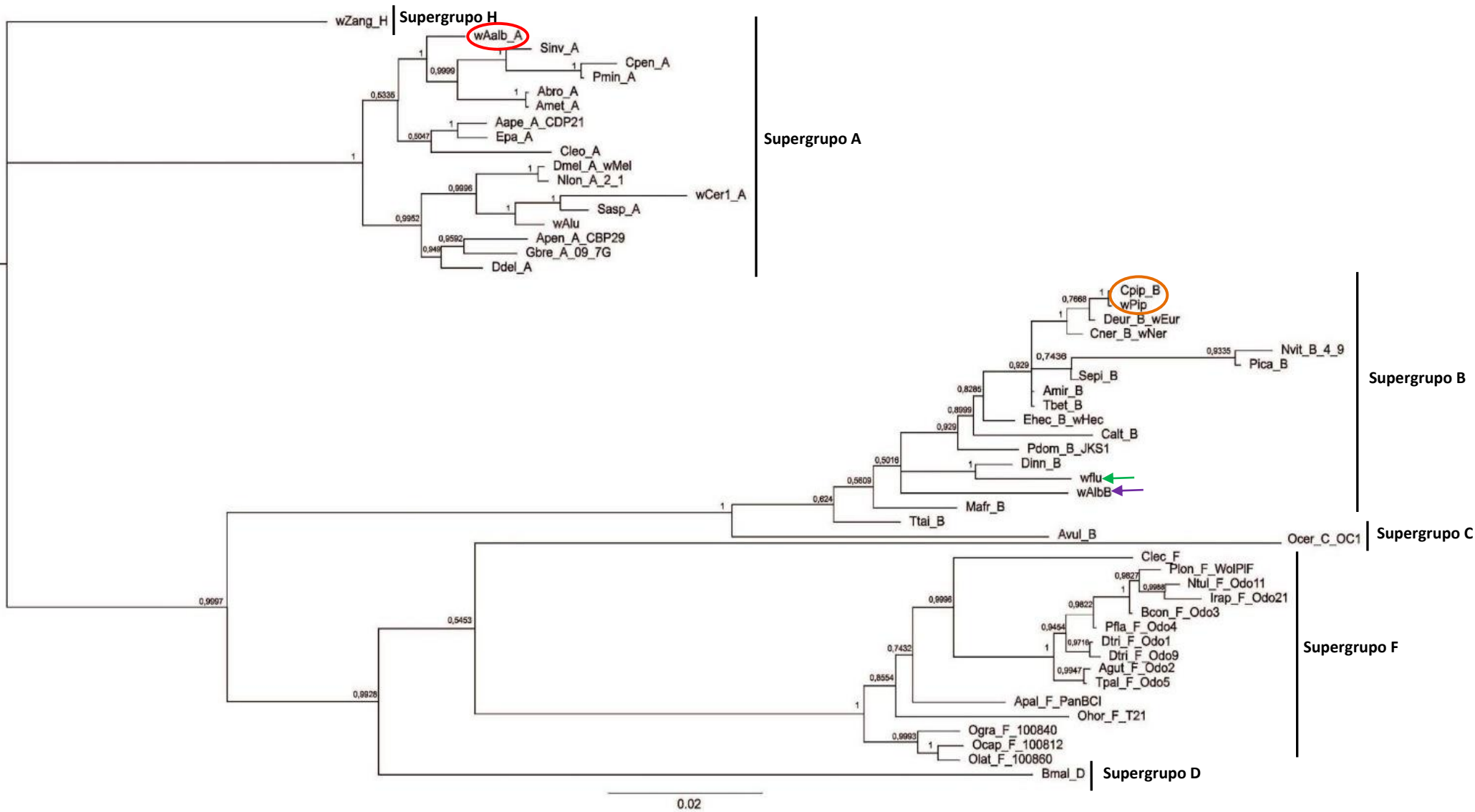


Figura 19. Filograma de *Wolbachia* reconstruido en base a los genes usados para la tipificación en base a genotipos multilocus (MLST) utilizando el método filogenético bayesiano. El árbol incluye 51 cepas *Wolbachia* recuperadas de la base de datos *Wolbachia* MLST y las cepas obtenidas en este estudio. Las flechas verde y violeta indican las posiciones de la cepa wFlu y wAlbB, respectivamente. Los círculos rojo y naranja indican otras cepas de *Wolbachia* correspondientes a mosquitos. Las probabilidades posteriores se indican encima de los nodos y constituyen una medida del soporte de los grupos.

1.4. Discusión

En este estudio se detectó la infección con *Wolbachia* en tres de las cuatro especies de mosquitos estudiadas, siendo *Ae. albifasciatus* la única no infectada con esta bacteria. Se reportó por primera vez la infección con *Wolbachia* en *Ae. fluviatilis* y *Ae. albopictus* en Argentina. Además, se detectó la presencia de *Wolbachia* en poblaciones híbridas del complejo *Cx. pipiens*.

Aedes albifasciatus presenta una amplia distribución en la Argentina (Mitchell & Darsie, 1985). En este trabajo se estudiaron mosquitos provenientes de tres sitios: la ciudad de La Plata y Ensenada, y todos resultaron libres de la infección con *Wolbachia*. Aunque los estudios realizados sobre esta bacteria en *Ae. albifasciatus* son pocos, este resultado coincide con el reportado por Díaz-Nieto, (2013) en individuos colectados en Mar del Plata. Si bien no se sabe la razón por la cual este mosquito no se halla infectado con la bacteria, una posible explicación puede estar relacionada con la microbiota residente. Se sabe que los insectos portan una microbiota que les puede proporcionar ventajas evolutivas o adaptativas (Rossi et al., 2015). Dentro de esta microbiota existen varios géneros de bacterias que se alojan principalmente en el intestino y que también se pueden encontrar en los órganos reproductores (Gabrieli et al., 2021; Ramirez et al., 2012). Una posible hipótesis de la ausencia de infección con *Wolbachia* puede ser que exista algún tipo de interacción negativa (competencia) entre los microorganismos de esta microbiota que impida la infección de *Wolbachia* al hospedador. Esto se estudió por ejemplo en el género *Anopheles*, el cual presenta *Asaia*, un género de bacterias que compete con *Wolbachia* en los tejidos reproductivos, llevando a una exclusión mutua (Rossi et al., 2015; Hughes et al., 2014). Es posible que en *Ae. albifasciatus* ocurra algo similar, por lo que un abordaje al estudio de su microbiota resultaría interesante.

La cepa hallada en *Ae. fluviatilis* fue identificada como wFlu mediante MLST y ubicada en el supergrupo B mediante análisis filogenético. Si bien esta cepa se encontraba en el repositorio de la base de datos de *Wolbachia* (<https://pubmlst.org/organisms/wolbachia-spp>), no fue referida en la publicación correspondiente a su detección en una línea de laboratorio (Baton et al., 2013),

siendo este el primer reporte de la identificación de wFlu en una población natural de *Ae. fluviatilis*. Aunque Baton et al. (2013) encontraron esta misma cepa en una colonia de *Ae. fluviatilis* desarrollada en la Fundación Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas (Belo Horizonte, Brasil) a partir de individuos provenientes de esa localidad, hasta la fecha no reportaron su identificación. Además, determinaron que la infección era nativa de la especie y demostraron que dicha cepa tiene la capacidad de fijarse eficazmente en las poblaciones debido a que presenta altas tasas de transmisión vertical y no tiene un costo aparente de *fitness*. En el presente estudio la prevalencia de infección con *Wolbachia* a campo fue del 85,7%, resultado que indicaría que la bacteria no está fijada en esta población. Si tenemos en cuenta la prevalencia de infección obtenida a partir de larvas de campo de *Ae. fluviatilis* en el capítulo 3 de esta tesis, vemos que el resultado cambia a 98,3% (i.e. 59 de 60 larvas fueron positivas a la infección con *Wolbachia*). Este resultado nos permite inferir que la bacteria está cercana a la fijación.

Entre los miembros del complejo *Cx. pipiens* las dos especies que más abundan en el mundo son *Cx. pipiens*, que presenta los ecotipos *pipiens* y *molestus*, y *Cx. quinquefasciatus*. En La Plata y Berisso se encontraron individuos híbridos formados por *Cx. p. molestus* y *Cx. quinquefasciatus*, resultado que coincide con lo que ya se había reportado en estudios previos en la zona (Cardo et al., 2020; Micieli et al., 2013). En ambos sitios se halló la misma cepa de *Wolbachia*, siendo este el primer reporte de infección en poblaciones híbridas del complejo *Cx. pipiens*. Esta coincidió con la ya reportada en otras especies del complejo, llamada wPip, la cual se encuentra en el supergrupo B (Díaz-Nieto et al., 2021; Baldo et al., 2006b) y que en rigor corresponde a un conjunto de cepas que infecta a los miembros del complejo y que comparten el perfil alélico (Atyame et al., 2011).

Tanto en Berisso como en La Plata no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia de la infección con *Wolbachia*, siendo del 100% en ambos sitios muestreados, lo que indica que la bacteria está fijada en estas poblaciones. Este resultado coincide con los datos publicados en otras poblaciones de *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* (Duron et al., 2005; Rasgon & Scott, 2003), aunque, también existen reportes de algunas poblaciones de Sudáfrica y Rusia donde la prevalencia fue menor (Khrabrova & Sibataev, 2019; Cornel et al., 2003). Se sabe que esta cepa

induce IC parcial o completa, la cual puede ser unidireccional o bidireccional (Duron et al., 2006; Rasgon & Scott, 2003; Guillemaud et al., 1997). En este sentido, y dado que no hay antecedentes de infección con *Wolbachia* en poblaciones híbridas del complejo *Cx. pipiens*, sería interesante seguir profundizando sobre la posible IC en estas poblaciones; además, y considerando que los genes del MLST tipificados no presentan variación entre las cepas *wPip* (lo que indica que es un clado reciente y monofilético, ver Atyame et al. (2011)), este resultado deja abierta la posibilidad de que exista alguna diferenciación en otras partes del genoma con respecto a las cepas de *wPip* halladas en otras especies que no podemos detectar con el MLST. Para corroborar esta hipótesis sería interesante profundizar este estudio con marcadores de rápida evolución como los genes *ank2* y *pk1*, que revelaron la existencia de más de 100 cepas *wPip* genéticamente distintas que pertenecen a cinco subclases identificadas como *wPip-I* a *wPip-V* (Atyame et al., 2011; Klasson et al., 2008; Duron et al., 2007, 2006).

Respecto al nematodo parasitoide *S. spiculatus* hallado en las larvas del complejo *Cx. pipiens*, no se pudo plantear ninguna hipótesis para evaluar a futuro sobre la transferencia horizontal de *Wolbachia* a partir de esta interacción hospedador-parasitoide. Si bien las interacciones parasitarias pueden ser una de las rutas más comunes de cambios de hospedador de *Wolbachia* (Sanaei et al., 2020), en este trabajo no se halló ningún nematodo infectado con la bacteria, lo que hace pensar que la infección del complejo *Cx. pipiens* se podría haber adquirido de otra manera. De todos modos, el número de individuos estudiado fue bajo, por lo que es necesario aumentar el tamaño de la muestra para descartar definitivamente la infección del nematodo con *Wolbachia*.

Las poblaciones de *Ae. albopictus* estudiadas resultaron polimórficas para la infección con *Wolbachia*, las cuales contienen individuos superinfectados con las cepas *wAlbA* y *wAlbB*, infectados sólo con *wAlbB* o individuos no infectados. Además, en la localidad de Eldorado se encontró un individuo infectado solo con *wAlbA*.

En este trabajo se caracterizó por primera vez la cepa *wAlbB* de *Ae. albopictus* a partir de individuos con simple infección. Al describir la diversidad de *Wolbachia* en esta especie hospedadora, Zhou et al. (1998) definieron las cepas A y B en base a

una filogenia reconstruida a partir de secuencias del gen *wsp*. Sin embargo, Casiraghi et al. (2005) y Baldo et al. (2005) informaron sobre la naturaleza en mosaico de este gen como consecuencia de la recombinación intra e intergénica (Baldo et al., 2006b), lo que puede producir resultados espurios. Posteriormente, Baldo et al. (2007) demostraron que *wAlbA* pertenece efectivamente al supergrupo A en base al MLST, método que aquí también se usó para *wAlbB*, lo que nos lleva a confirmar su identidad como miembro del supergrupo B en base a datos más confiables que la secuencia usada por Zhou et al. (1998). Aunque en esta contribución se detectaron las mismas cepas de *Wolbachia* ya reportadas para *Ae. albopictus*, la prevalencia en la población de Puerto Iguazú y Eldorado fue del 87 % y 84 %, respectivamente, mientras que la prevalencia reportada para la mayoría de las poblaciones en todo el mundo es del 100% (Noor Afizah et al., 2015; Zhang et al., 2014; Kittayapong et al., 2002a). Esto último generalmente es lo esperado, ya que por la IC esta bacteria tiende a extenderse rápidamente, tal como se demostró en una población de *Drosophila simulans* Sturtevant de California, llegando a la fijación poco después de la invasión inicial (Kriesner et al., 2013; Turelli & Hoffmann, 1991).

En cuanto al polimorfismo hallado en ambas localidades muestreadas, la superinfección con las cepas *wAlbA* y *wAlbB* fue el tipo predominante. Esto va en concordancia con los resultados hallados en la mayoría de las poblaciones de esta especie (Noor Afizah et al., 2015; Armbruster et al., 2003; Kittayapong et al., 2002a), lo que se podría atribuir a una alta tasa de transmisión maternal de la superinfección, algo ya probado en poblaciones de Tailandia (Kittayapong et al., 2002b). La infección simple con *wAlbA* o *wAlbB* ha sido reportada en algunas poblaciones (e.g. en Malasia y Tailandia) (Noor Afizah et al., 2015; Kittayapong et al., 2002a, 2002b), aunque esta última se detectó con mayor frecuencia en las poblaciones de China en comparación con la cepa *wAlbA* (Hu et al., 2020; Zhang et al., 2014). Los resultados obtenidos en las dos poblaciones estudiadas en esta tesis coinciden con lo reportado en otros estudios, ya que la infección simple con *wAlbB* se detectó en mayor frecuencia que la infección simple con *wAlbA*, la cual se detectó en un único caso. Una posible explicación para esto es que las cepas de *Wolbachia* del supergrupo A tienen densidades más bajas que las del supergrupo B en *Ae. albopictus* y, por lo tanto, se esperaría que se transmitieran de manera

menos eficientes (Sinkins et al., 1995b). También se ha demostrado que ciertos factores ambientales, como las altas temperaturas, afectan negativamente a las cepas de *Wolbachia* del supergrupo A, lo que podría afectar su transmisión, llevando a su pérdida como consecuencia de la exposición a factores ambientales desfavorables (Lau et al., 2020). Además, Hu et al. (2020) demostraron que la prevalencia de *Wolbachia* en distintas poblaciones de China que correspondían a diferentes regiones climáticas fue variable, reportando menor prevalencia en las regiones subtropical media y templada. Teniendo en cuenta que las localidades donde se estudió la infección de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* en el presente trabajo corresponden a la región subtropical, esto podría explicar los resultados de prevalencia obtenidos (< 100%).

En el presente estudio se reportaron un 16 % y un 13 % de resultados negativos para la infección en Eldorado y Puerto Iguazú, respectivamente. Una posible explicación podría radicar en el hecho de que la cría de las larvas en condiciones de hacinamiento puede alterar las tasas de transmisión materna (e.g. Merçot & Poinso, 1998). La densidad poblacional a campo de *Ae. albopictus* en casi todos los sitios de colecta fue baja en comparación con las otras especies con las que se lo colecta, como *Ae. aegypti*, varias especies del género *Culex* sp. o *Ae. fluviatilis*, lo que podría generar condiciones de hacinamiento, considerando que en general se la encuentra en relación de 1:10 (*Ae. albopictus*: *Ae. aegypti*) (Obs. Pers.) respecto de otras especies. Además, dicha observación personal coincide con los resultados publicados por Schweigmann et al. (2004) en Misiones. Esto puede llevar a plantear la hipótesis de que existe algún tipo de competencia con estas especies que pueda estar interviniendo en la transmisión de *Wolbachia*. Otro factor a tener en cuenta es la densidad bacteriana, la cual puede variar entre machos y hembras, siendo menor en los primeros. Incluso la cepa wAlbA puede llegar a perderse por completo con el envejecimiento de los mismos (Tortosa et al., 2010). En este sentido, varios pueden ser los factores que expliquen los resultados de prevalencia en *Ae. albopictus* obtenidos en este trabajo, incluyendo variables como la edad de los individuos y ciertos factores ambientales que no fueron medidos en esta oportunidad. En los capítulos posteriores de este trabajo se intentó abordar algunas de estas variables, por ejemplo, a través del estudio de la relación entre la densidad bacteriana y la

edad de los individuos y la relación entre la prevalencia y la temperatura del recipiente donde se colectaron los individuos (ver Capítulo 2 y 3).

El árbol filogenético basado en el MLST de las cepas halladas en las poblaciones estudiadas muestra que todas pertenecen al supergrupo B de *Wolbachia*. Aunque las cepas *wAlbB* y *wFlu* se hallan en un mismo clado, el escaso soporte de este grupo no permite hacer inferencias de las relaciones entre ellas. La posición filogenética de estas cepas y otras aisladas de mosquitos como *wPip*, *wAlb_A*, *Cpip_B*, confirma que han ocurrido eventos de transferencia horizontal dentro de este grupo de insectos, tal como se ha documentado ampliamente para este género de bacterias.

Es sabido que algunas estrategias como los insecticidas químicos utilizados para el control de enfermedades ocasionadas por mosquitos han disminuido su efectividad o han dejado de tener efectos deseables, lo que ha llevado a buscar nuevas herramientas. En este sentido, el uso de *Wolbachia* como método de biocontrol ha cobrado un gran interés. Pero antes de introducir nuevas cepas de esta bacteria con características deseables en la naturaleza es necesario saber cuáles ya están presentes para evitar problemas a futuro como la IC. En este trabajo se identificaron cuatro cepas en especies de mosquitos de Argentina, siendo tres de ellas inéditas en el país (*wAlbA*, *wAlbB* y *wFlu*). Aunque ya se conocía la infección con *wPip* en poblaciones de Argentina, esta es la primera vez que se reporta en poblaciones híbridas del complejo *Cx. pipiens*.

En el siguiente capítulo se profundizó sobre la densidad de las cepas de *Wolbachia* halladas en la especie *Ae. albopictus* debido a su importancia sanitaria ya que es considerado un vector puente y secundario de virus dengue, entre otros arbovirus, además se encuentra infectada con la cepa *wAlbB* de *Wolbachia* la cual presenta un gran interés en las técnicas de transinfección donde se utiliza esta cepa para bloquear la transmisión de virus en mosquitos.

2. Capítulo 2: Determinación de los niveles de variación de la densidad de *Wolbachia* de acuerdo al tejido en el que se aloja la infección y la edad del insecto en *Aedes albopictus*.

2.1. Introducción

En la relación hospedador-simbionte la densidad de la población simbiótica es un factor clave, ya que influye tanto en la eficiencia de la transmisión como en la virulencia del simbiote (Mouton et al., 2007, 2003). Se ha propuesto la densidad bacteriana como un factor clave que puede influir en la expresión de IC y en el efecto antiviral en mosquitos, además, de la cepa y el genotipo del hospedador (Lu et al., 2012; Sinkins, 2004; Werren, 1997). La densidad bacteriana se ha correlacionado de manera positiva con el efecto antiviral producido en mosquitos (Lu et al., 2012; Osborne et al., 2012, 2009). Se sabe que las diferentes cepas de *Wolbachia* infectan especies de vectores a densidades variables y muestran diferentes distribuciones de tejido (Miller & Riegler, 2006; Dutton & Sinkins, 2004; Dobson et al., 1999). Además, dentro de un hospedador superinfectados con varias cepas, la densidad de estas puede diferir, lo que demuestra que el genotipo de *Wolbachia* juega un papel en el proceso de regulación (Mouton et al., 2004, 2003; Ikeda et al., 2003; Ijichi et al., 2002).

En este estudio se indagó sobre la densidad de *Wolbachia* en *Ae. albopictus*. Como se trató en el Capítulo 1, esta especie está naturalmente superinfectada con dos cepas de *Wolbachia*, *wAlbA* y *wAlbB* (Sinkins et al., 1995b), que pertenecen a los supergrupos A y B, respectivamente. Existen estudios que indican que ambas cepas muestran diferencias altamente significativas en sus densidades dentro del hospedador, siendo mayor la de la cepa *wAlbB* (Wiwatanaratanabutr & Kittayapong, 2009). Además, se ha demostrado que estas cepas de *Wolbachia* inducen resistencia a los arbovirus (Mousson et al., 2012), aunque a un nivel más bajo que las infecciones artificiales (Moreira et al., 2009). Si bien no se sabe con exactitud como esta bacteria altera la competencia vectorial del vector, existe evidencia de que la densidad juega un papel clave (Lu et al., 2012) al igual que su

localización (tejidos somáticos no gonadales, donde la bacteria y la infección del agente patogénico co-existen) (Pietri et al., 2016).

En este capítulo se determinó la variación de la densidad de cepas de *Wolbachia* en *Ae. albopictus* según el tejido en el que se localiza en las hembras como un primer enfoque para investigar el papel potencial de esta bacteria en la modulación de la competencia del vector para los arbovirus. Además, se estudió si existe variación en la densidad de *Wolbachia* según la edad de los individuos con el fin de establecer si este factor puede tener influencia en el polimorfismo de infección con *Wolbachia* hallado en el capítulo 1.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Cuantificación de la densidad de las cepas wAlbA y wAlbB a través de un ensayo de PCR en tiempo real

*Antes de detallar la metodología de este apartado resulta necesario aclarar que la puesta a punto y los ensayos de PCR en tiempo real fueron un gran desafío en esta tesis. Se presentaron varios inconvenientes, muchos de los cuales se pudieron sortear y otros quedaron como punto de partida para seguir mejorando la técnica a futuro. En este sentido, las dificultades presentadas se detallan en los **ANEXOS C a H**, los cuales son referenciados en el cuerpo de este apartado. Para un mejor entendimiento de los problemas presentados se sugiere su lectura en conjunto.*

En los ensayos de PCR en tiempo real se cuantificó la densidad de las cepas wAlbA y wAlbB de manera relativa mediante el *Método de la curva estándar relativa*. Este enfoque proporciona resultados cuantitativos muy precisos porque los valores de la muestra desconocida se interpolan a partir de la curva estándar (Biosystems, 2004). En este método no es necesario saber la cantidad precisa de ADN del gen de interés, sino que basta con saber la cantidad de ADN total que se está utilizando, ya que la comparación cuantitativa del ADN del gen de interés se expresa en órdenes de magnitud con respecto a una referencia o “calibrador”. El calibrador es una línea de base para la expresión de un gen objetivo determinado. Este puede ser un punto de tiempo cero en un experimento de curso temporal o una muestra sin tratar que servirá como punto de referencia con el que se pueden comparar las otras muestras (Stratagene, 2007). Para lograr resultados óptimos de expresión relativa, se requieren estrategias de normalización apropiadas para controlar el error experimental (Pfaffl, 2004) y para asegurar un rendimiento cíclico idéntico durante la PCR en tiempo real. Para esto se utiliza un *gen control* (gen de referencia o *housekeeping*), el cual no difiere en su nivel de expresión entre las muestras a analizar. El valor obtenido del gen de interés se divide con el valor obtenido para el gen control para normalizar los resultados. Una vez normalizado el resultado, este valor se divide entre el valor de otro ensayo elegido como referencia o calibrador lo que resulta en un orden de magnitud con respecto al calibrador.

En este estudio se cuantificó la densidad bacteriana de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* a través de los “genes objetivos” *wsp* de ambas cepas, y como gen control se utilizó el gen de actina de *Ae. albopictus*. Tanto los genes objetivos como el gen control se amplificaron a partir de la misma muestra de ADN genómico para obtener un valor normalizado de la densidad de cada cepa, los que luego fueron utilizados para comparar, en este caso, las densidades de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* durante los ensayos realizados.

Como se comentó al comienzo de este apartado, durante la realización de estos ensayos se presentaron diferentes inconvenientes metodológicos que llevaron a que varias muestras se pierdan sin poder volver a colectarlas. De los tres ensayos planteados en un principio, se pudieron realizar dos. En el primero se midió la densidad de ambas cepas de *Wolbachia* en ovario y tejido somático de las hembras, y en el segundo se midió la variación de densidad de la cepa *wAlbB* según la longevidad de los machos ya que no se pudo lograr la amplificación del gen *wsp* de la cepa *wAlbA* en ellos. Los ensayos que consistían en medir la densidad de las cepas de *Wolbachia* en las hembras en función de la longevidad y la evolución de la densidad bacteriana en función del tiempo después de la alimentación sanguínea no se pudieron completar.

2.2.1.1. Colección de individuos de *Aedes albopictus*

El material utilizado en los ensayos de PCR en tiempo real provino de poblaciones naturales. La colecta de estados inmaduros de *Ae. albopictus* se realizó en el kartódromo de la ciudad de Puerto Iguazú (25°39'20,1'' S - 54°33'12,4'' O) (Figura 20). El material colectado fue trasladado al laboratorio, donde se acondicionó para su posterior procesamiento una vez alcanzado el estado adulto. Se realizaron dos ensayos en los cuales se compararon: i) las densidades de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* entre soma y ovario de las hembras, y ii) entre machos de diferentes edades.



Figura 20. Kartódromo de Puerto Iguazú. Sitio de colección de individuos de *Ae. albopictus*.

2.2.1.2. Diseño de cebadores de los genes Actina y *wsp* de las cepas *wAlbA* y *wAlbB*

Antes de diseñar cebadores para amplificar los genes de Actina y *wsp* de las cepas *wAlbA* y *wAlbB*, se probaron los siguientes cebadores citados en bibliografía: ActAlb_dir (5'-GCAAACGTGGTATCCTGAC-3'), ActAlb_rev (5'-GTCAGGAGAACTGGGTGCT-3') (Raquin et al., 2015); GF (5'-GGTTTTGCTGGTCAAGTAA-3'), AR (5'-GCATCTTTGGTAACTACTTTT-3'), BR (5'-GCTGTAAAGAACGTTGATG-3') (Ahtarig et al., 2008). Uno de los problemas presentados fue la amplificación de los controles negativos que se puede ver en el ANEXO C. Este problema llevó a que se diseñen nuevos cebadores.

Para obtener los cebadores que amplifiquen un segmento del gen Actina se procedió a descargar las secuencias disponibles de dicho gen de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* de la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (Números de Acceso: XM_019678398.1; XM_019678397.1; DQ657949.1; XM_019670123.1; XM_019670123.1; XM_019670122.1; XM_001655126.2; XM_001655125.2; AY433196.1; DQ074455.1; XM_019686247.1; DQ124691.1; XM_019676865.1; XM_019676865.1; XM_001649480.2; XM_019674113.1). Se

alinearon utilizando el programa Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014) y luego, mediante el programa GeneDoc (Nicholas, 1997) se localizaron las zonas conservadas. El diseño de cebadores se realizó en base a dichas zonas utilizando el programa Gene Runner (Spruyt & Buquicchio, 1994) teniendo en cuenta las siguientes características: i) que el tamaño del amplicón sea aproximadamente de 150-200pb; ii) que el porcentaje de GC se mantenga entre 30-80%. Una vez obtenidos, los pares de cebadores fueron analizados con el programa DNAMAN (Woffelman, 1994) para evaluar la formación de estructuras secundarias y la temperatura de fusión. Las secuencias de los cebadores seleccionados fueron las siguientes: Act_F 5'-CCTTCAACACACCGGCCATGTACG-3' y Act_R 5'-TCAGATCGCGACCGGCCAAATC-3'.

Para amplificar las cepas wAlbA y wAlbB se diseñaron los cebadores wspAlbA, y wspAlbB a partir de las secuencias disponibles del gen *wsp* de *Ae. albopictus* de la base de datos GenBank (Número de Acceso: MH777434.1 (*wsp* de la cepa wAlbA) y MH392336.1 (*wsp* de la cepa wAlbB)). Se probó el diseño de los cebadores con tres programas, los cuales fueron descartados por las razones que se comentan a continuación: el juego de cebadores diseñados con el programa *Primer Express software* (Singh & Pandey, 2015) amplificaba fragmentos muy cortos de 10 a 16 pb; los cebadores diseñados con *Primer3* (Untergasser et al., 2007; Rozen & Skaletsky, 2000, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) no se diferenciaban de los cebadores que se habían probado y que no funcionaron; y el juego de cebadores diseñados con *PrimerQuest* (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) presentaba temperaturas de fusión muy desbalanceadas. Debido a estas razones los cebadores fueron diseñados manualmente. El cebador *reverse* fue el mismo para ambas cepas, wspAlb_R 5'GTTGGTGTGGTGTGGTGACAG. Para la cepa wAlbA el cebador *forward* fue, wspAlb_F 5'CCAGTAGTTTCGCTATCAAAGTG 3', y el amplicón resultante tuvo 194 pb, mientras que para la cepa wAlbB el cebador *forward* fue, wspAlbB_F 5'GTTGATCTCTTTAGTAGCTGATAC 3', y su amplicón resultó en 213 pb.

2.2.1.3. Evaluación del desempeño de los cebadores para PCR en tiempo real a través de PCR de punto final

Se realizó un ensayo de PCR de punto final para verificar la temperatura de hibridación (*annealing*) y el tamaño de los amplicones para los cebadores diseñados para la PCR en tiempo real. Las condiciones de ciclado fueron: 94°C por 15 segundos, 60°C por 25 segundos y 72°C por 15 segundos durante 40 ciclos. Se utilizó ADN de las muestras de *Ae. albopictus* como molde y agua libre de Dnasa como control negativo.

Los ensayos de PCR de punto final fueron realizados en un termociclador Labnet Multigene (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Para un volumen final de 12,5 µl, la composición de la mezcla de reacción utilizada fue: 6,25 µl de Master Mix (GoTaq Master Mix, Promega, EE.UU.), 4,25 µl de H₂O, 0,5 µl de cada Cebador (10 µM) (Macrogen Inc., Corea) y 1 µl de ADN molde o de agua libre de Dnasa. Finalizada la reacción, los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) utilizando una cuba Mini-Sub CellGT® (BIORAD, EE. UU.) conteniendo Buffer TBE 0,5 X, y separados a 90 voltios durante 40 minutos. Se sembraron 5 µl del producto de PCR adicionando 1 µl de buffer de carga (*loading buffer*). Al gel de agarosa se agregó 1 µl de una solución de Bromuro de Etidio (BrEt) 0,4 µg/ml (Promega, EE. UU.) previamente a la corrida. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV Tm-20 Transiluminator (Upland, CA 91786 U.S.A).

2.2.1.4. Confección de la curva estándar

La curva estándar fue realizada para cada gen estudiado (*wsp* de la cepa *wAlbA* y *wAlbB* y actina). A partir de dichas curvas se determinó la eficiencia de amplificación de cada par de cebadores, que es la tasa a la cual el amplicón de la PCR es generado y su valor se expresa como porcentaje, y se interpolaron las concentraciones de ADN de las muestras incógnita. Las curvas estándares se realizaron a partir de diluciones seriadas de una solución de ADN que se obtuvo a partir de un *pool* conformado por todas las muestras a estudiar. Esto se repitió por cada uno de los ensayos realizados. Las concentraciones de ADN se midieron con un equipo

nanodrop *Thermo Scientific™ Espectrofotómetros NanoDrop™ 2000/2000c* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las diluciones seriadas se realizaron al cuarto (1/4) a partir de una concentración inicial de 20 ng/μl. Cada curva consistió en cuatro puntos: 20 ng/μl, 5 ng/μl, 1,25 ng/μl y 0,31 ng/μl. Cada punto de la curva se corrió por triplicado (*réplicas técnicas*) en la placa de PCR en tiempo real. Los valores de Cq (Ciclo de cuantificación, o *Quantification Cycle* por sus siglas en inglés) obtenidos para cada réplica técnica fueron promediados en un único valor luego de descartar aquellas réplicas que tenían amplificaciones inespecíficas o dímeros de cebadores que pudieran afectar los valores de Cq, produciendo datos aberrantes (*outliers*). Se verificó la temperatura de fusión de cada cebador para corroborar que no presenten amplificaciones indeseadas a través de la curva correspondiente (*melting curve*). La curva estándar para cada gen objetivo y el gen control se representa gráficamente como una recta de regresión semi-logarítmica con los valores de Cq (Y) en función del logaritmo de la concentración de ADN de cada dilución (X). Luego, utilizando las pendientes de cada recta y la siguiente ecuación, se obtuvo la eficiencia de amplificación (Biosystems, 2004):

$$E = 10(-1/\text{pend}) - 1$$

Un ajuste lineal con una pendiente entre aproximadamente $-3,1$ y $-3,6$, equivalente a una eficiencia de reacción del 90–110%, y suele ser aceptable para la mayoría de las aplicaciones que requieren una cuantificación precisa. Si la reacción de amplificación no es eficiente los valores que se extrapolan de las muestras incógnitas pueden no ser precisos. Dado que la reacción de PCR se basa en la amplificación exponencial, si la eficiencia de la amplificación de PCR es del 100%, se espera que la cantidad de molde total se duplique con cada ciclo (Stratagene, 2007).

Utilizando el valor de Cq de cada muestra incógnita y la ecuación de la recta de cada curva de calibración según el gen estudiado, se calculó la concentración de ADN expresada como el logaritmo de la concentración. Posteriormente, se realizó la potencia en base 10 de este valor y se obtuvo la concentración de ADN en ng/μl. Los valores de densidad de cada cepa de *Wolbachia* estudiada se normalizaron aplicando el cociente a la concentración de ADN del gen *wsp* de la cepa *wAlbA* o *wAlbB* con la concentración de ADN de actina. Estos valores fueron los que se

utilizaron para los análisis estadísticos. Todos los análisis se realizaron con el programa R v. v.4.1.0 (RC, 2019) ejecutado a través de Rstudio v1.0.153 (RStudio, 2017).

Los ensayos se realizaron en un termociclador *Applied Biosystem StepOnePlus Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) Se utilizaron las placas *MICROAMP® 96-WELL OPTIC*, el film *MICROAMP® FAST OPTICAL 96-WELL* (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y la master mix Sybr Green *POWRUP SYBR MASTER MIX,5 ML* (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

Las reacciones de amplificación en cada pozuelo de la placa fueron preparadas en un volumen final de 20 µl que contenía 10 µl de Sybr Green, 4 µl de agua libre de DNAsas, 1 µl de cada cebador (10 µM) (Macrogen Inc., Corea) y 4 µl de ADN Molde o agua libre de DNAsas para el control negativo. Las condiciones de ciclado se detallan en la Figura 21. En cada placa se corrió el gen objetivo con el gen control de cada muestra y se corrieron un total de cinco réplicas biológicas por cada grupo a comparar.

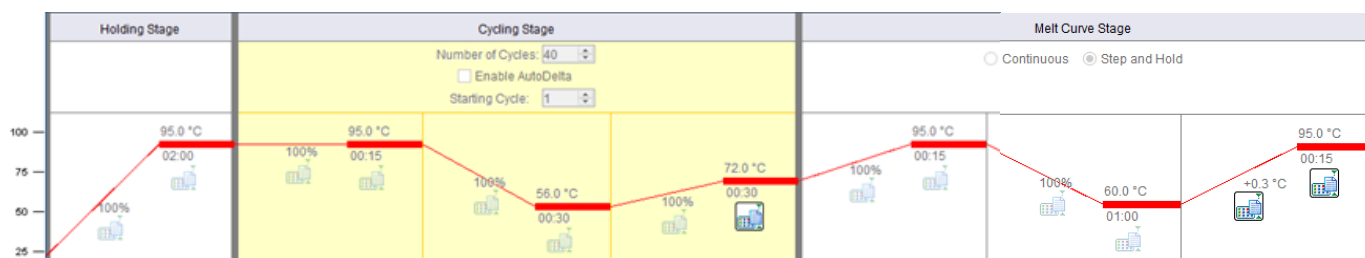


Figura 21. Condiciones de ciclado de la PCR en tiempo real.

2.2.1.5. Ensayo de PCR en tiempo real para la comparación de la densidad bacteriana entre soma y ovario

Se realizó la disección de cinco hembras (réplicas biológicas) recién emergidas separando los tejidos somático y ovárico bajo microscópico óptico. Se colocó la hembra en una gota del *buffer* del kit de extracción de ADN REDEXTRACT-N-AMP for TISSUE (Sigma-Aldrich, EE. UU.) en un portaobjeto, y tirando del último segmento del abdomen se extrajeron los ovarios (Figura 22). El tejido somático y el ovárico se colocaron en distintos tubos eppendorf y se prosiguió con la extracción del ADN según las indicaciones del fabricante. Luego de la extracción se prepararon

diluciones de ADN con una concentración final de 10 ng/ μ l que fueron utilizadas en las corridas de PCR en tiempo real. Se evaluó si las densidades de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* eran diferentes entre el ovario y el soma. Como muestra de referencia se utilizó el gen *wsp* de la cepa *wAlbA*. Las densidades relativas obtenidas en este ensayo se compararon utilizando la prueba U de Mann-Whitney.



Figura 22. Ovario de *Ae. albopictus* extraído bajo microscopio óptico (aumento 40x).

2.2.1.6. Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa *wAlbB* en función de la longevidad de los machos.

Se midió la densidad de la cepa *wAlbB* de *Wolbachia* en cinco machos (réplicas biológicas) en tres tiempos diferentes. El tiempo 0 fue considerado al momento de la emergencia, y los tiempos 1 y 2 a los 5 y 14 días post-emergencia, respectivamente. Para realizar el ensayo se utilizaron larvas colectadas a campo; cuando alcanzaron el estadio de pupa se individualizaron en recipientes plásticos transparentes y se realizó un seguimiento diario de los adultos. Se mataron con frío 5 machos recién emergidos, otros 5 a los 5 días post-emergidos y otros 5 a los 14. La extracción de ADN se realizó con el kit REEXTRACT-N-AMP for TISSUE (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Luego de medir la concentración de ADN se prepararon diluciones con una concentración final de 5 ng/ μ l y otra de 50 ng/ μ l que fueron utilizadas en las corridas de las PCR en tiempo real del gen actina y *wsp* de la cepa *wAlbB*, respectivamente. En el ANEXO D se muestra la corrida del gen *wsp* de la cepa *wAlbB*

con una concentración de 5 ng/μl, la cual fue descartada porque los Cq de la mayoría de las muestras resultaron mayores a 27.

Se comparó la densidad de la cepa *wAlbB* entre los tiempos 0 y 1, y entre los tiempos 1 y 2. Los resultados obtenidos en el ensayo de longevidad de los machos se analizaron con la prueba de Kruskal Wallis utilizando el programa R v. v.4.1.0 (RC, 2019) ejecutado a través de Rstudio v1.0.153 (RStudio, 2017).

Además, en este ensayo se midió sin éxitos el gen *wsp* de la cepa *wAlbA* ya que los productos de la PCR en tiempo real fueron el resultado de amplificaciones inespecíficas (ver ANEXO E).

2.2.1.7. Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* en función de la longevidad de las hembras.

En este ensayo se procedió de la misma manera que en apartado 2.2.5.6 (evolución de la densidad bacteriana en función de la longevidad de los machos). La cantidad de réplicas, tiempos considerados y metodología de extracción de ADN fueron los mismos. Se prepararon diluciones con una concentración de ADN final de 5 ng/μl y se realizó una única corrida que se muestra en el ANEXO F, la cual fue desestimada porque la mayoría de las muestras presentaba valores de Cqs que caían por fuera de la curva estándar (principalmente la cepa *wAlbB*), imposibilitando la interpolación de los datos de concentración de ADN a partir de la misma.

2.2.1.8. Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* en hembras con alimentación sanguínea vs. hembras alimentadas con pasas de uva.

Este ensayo consistía en comparar la densidad bacteriana en el soma de hembras que fueron alimentadas con pasas de uva y con sangre. La densidad bacteriana se estudió en dos tiempos a los 14 y a los 22 días post-emergencia. Un total de 10

hembras fueron alimentadas con pasas de uva a lo largo de toda su vida y a otras 10 se les ofreció una alimentación sanguínea a los 7 y a los 14 días post-emergencia. Los tejidos somático y ovárico se separaron bajo microscopio óptico de la misma manera que en el ensayo en el cual se midió la densidad bacteriana en el soma y en el ovario. En esta oportunidad la extracción de ADN del tejido somático se realizó aplicando un protocolo con fenol-cloroformo (ver ANEXO G) luego de que ensayos previos mostraron que se obtenían valores de Cqs más bajos que con el kit Sigma para la misma concentración de ADN y condiciones de amplificación (ver ANEXO G). Sin embargo, no fue posible obtener una curva estándar con una eficiencia de amplificación óptima (ver ANEXO H).

2.3. Resultados

2.3.1. Cuantificación de la densidad de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* a través de un ensayo de PCR en tiempo real

2.3.1.1. PCR convencional con los cebadores de PCR en tiempo real

Tanto los cebadores del gen *wsp* de las cepas de *Wolbachia* (*wAlbA* y *wAlbB*) como los cebadores del gen de actina del mosquito diseñados y sintetizados en el marco de esta tesis amplificaron de manera correcta en la PCR de punto final. Por cada cepa de *Wolbachia* se corrieron dos muestras de *Ae. albopictus* y para el gen actina una muestra. Para la cepa *wAlbA* se observó una banda con tamaño de amplicón 194 pb y para la cepa *wAlbB* una de 213 pb. El amplicón del gen actina fue de 189 pb. En la Figura 23 se muestran los geles de las corridas de PCR convencional de los genes estudiados.

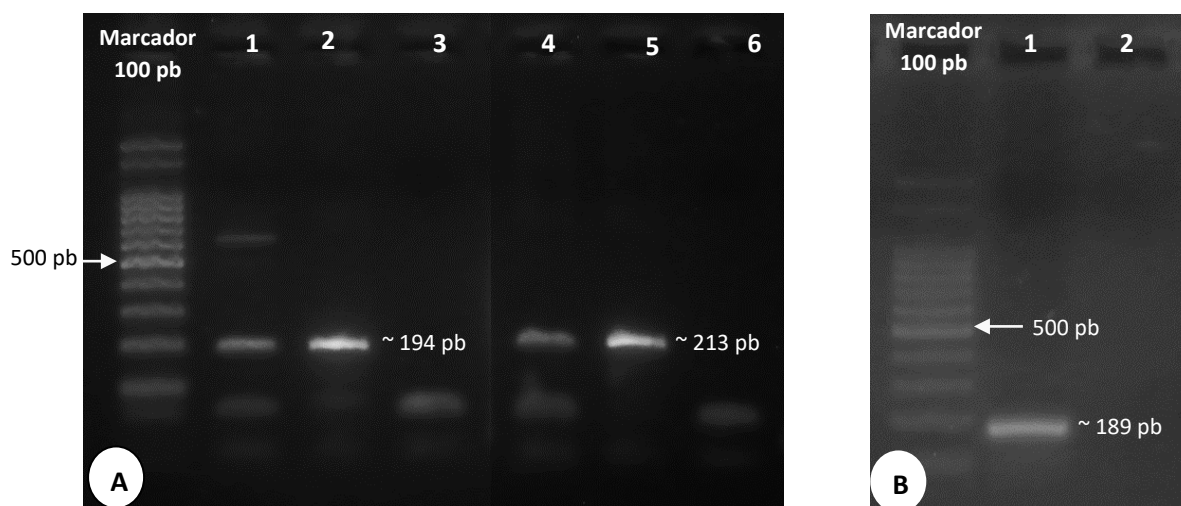


Figura 23. Productos de amplificación de los cebadores para PCR en tiempo real evaluados a través de PCR de punto final. (A) Calle 1-3: amplificación del gen *wsp* de la cepa *wAlbA* en *Ae. albopictus*, calle 3: control negativo; Calle 4-6: amplificación del gen *wsp* de la cepa *wAlbB* en *Ae. albopictus*, calle 6: control negativo. (B) Calle 1-2: amplificación del gen *actina* en *Ae. albopictus*, calle 2: control negativo con agua libre de Dnasa. Marcador de peso molecular (100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs. As.)

2.3.1.2. Eficiencia de los cebadores

En la Figura 24 se muestran las curvas de fusión de los genes *actina* y *wsp* de la cepa *wAlbA* y *wAlbB* para el ensayo de PCR en tiempo real para la comparación de la densidad bacteriana entre soma y ovario. Se observan tres picos bien definidos, de izquierda a derecha, correspondientes a los genes *wsp* de la cepa *wAlbB*, *wsp* de la cepa *wAlbA* y *actina*. Las temperaturas de fusión fueron 78,6°C, 80,1°C y 87,5°C, respectivamente (Figura 24).

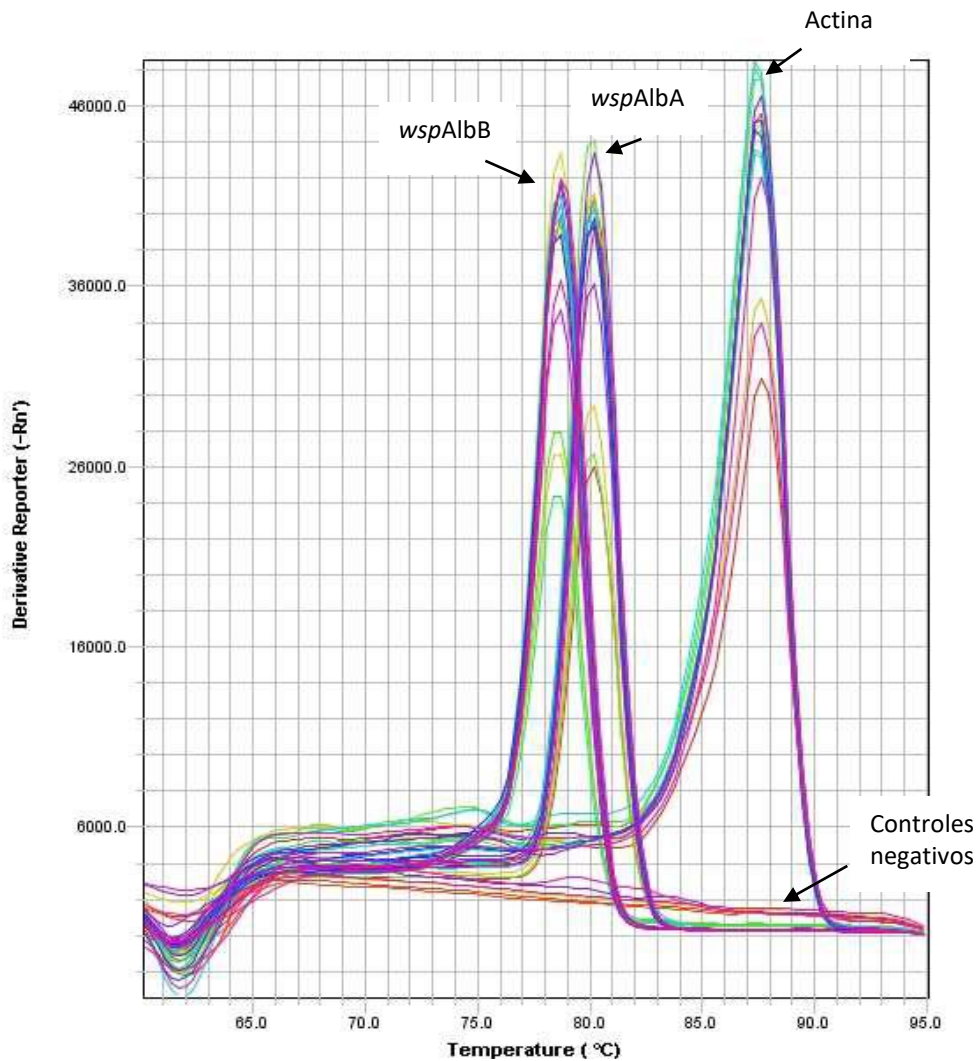


Figura 24. Curvas de fusión para la amplificación de los genes *wsp* de la cepa *wAlbB* y *wAlbA* y gen de actina, a partir de las cuales se verificó la especificidad de las reacciones para el ensayo de cuantificación de la densidad bacteriana en soma y ovario.

En la Figura 25 se muestra la curva estándar para cada gen con la ecuación de la recta. Cada curva se construyó a partir de diluciones seriadas al $\frac{1}{4}$, partiendo de una concentración inicial de ADN de 20 ng/ μ l de un *pool* de las muestras a estudiar. Cada gráfico se construyó a partir de los valores de C_q de cada gen vs. logaritmo de la concentración de ADN de cada dilución.

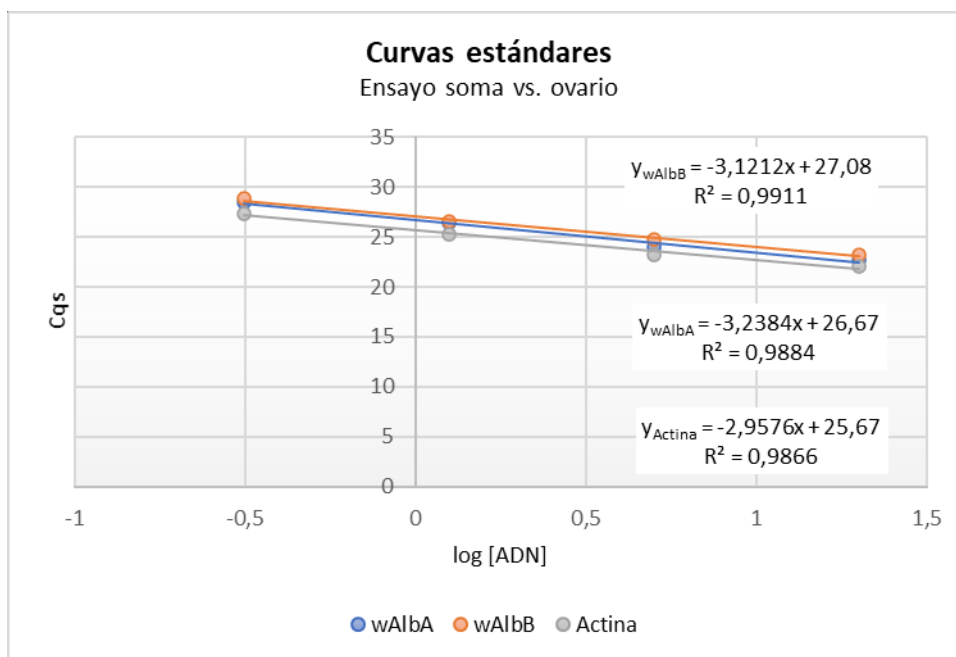


Figura 25. Curvas estándar de los genes actina y *wsp* de las cepas wAlbA y wAlbB de *Ae. albopictus* a partir de las cuales se verificó la eficiencia de los cebadores utilizados para el ensayo en el que se compara la densidad bacteriana entre los tejidos somático y reproductivo.

La eficiencia (Ef) de los cebadores fue calculada a partir de la pendiente de cada recta y se obtuvieron los siguientes valores: $Ef_{wspAlbB} = 109,12\%$, $Ef_{wspAlbA} = 103,61\%$ y $Ef_{Actina} = 117,83\%$.

En el ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa wAlbB en función de la longevidad de los machos, se procedió de la misma manera que en el ensayo anterior. En la Figura 26 se muestran las curvas de fusión para el gen *wsp* de la cepa wAlbB y para el gen actina. Las corridas del gen *wsp* de la cepa wAlbA se muestran en el anexo C, las que fueron desestimadas ya que no se obtuvo una curva de fusión apropiada, presentando amplificaciones inespecíficas y valores de Cq altos. En la curva de fusión se observa que un control negativo de actina está desplazado hacia la izquierda, lo que se puede atribuir a la presencia de dímeros de cebadores, mientras que el otro control negativo no hubo amplificación (Figura 26B). Las temperaturas de fusión fueron $79,03^{\circ}\text{C}$ para el gen *wsp* de la cepa wAlbB y $87,63^{\circ}\text{C}$ para actina.

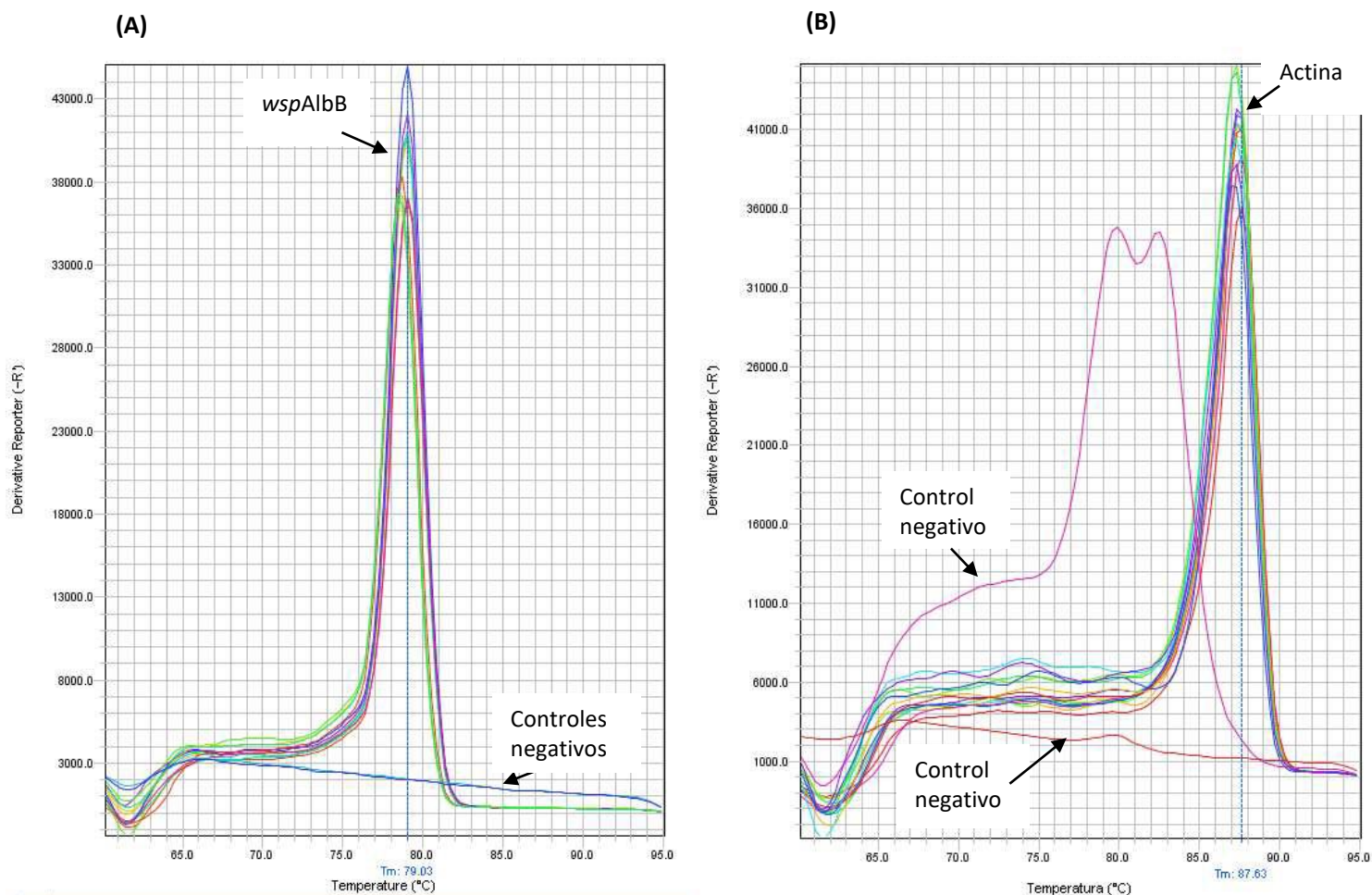


Figura 26. Curva de fusión de la amplificación de los genes (A) *wsp* de la cepa *wAlbB* y (B) *actina*, para verificar la especificidad de las reacciones de amplificación desarrolladas en el ensayo realizado para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en función de la edad de los machos.

En la Figura 27 se muestran los gráficos de las curvas para cada gen con la respectiva ecuación de la recta. Cada curva se construyó a partir de cuatro puntos provenientes de diluciones seriadas al $\frac{1}{4}$ partiendo de una concentración inicial de ADN de 20 ng/ μ l de un *pool* de las muestras a estudiar. Los gráficos de dispersión se construyeron a partir de los valores de C_q de cada gen vs. logaritmo de la concentración de ADN de cada dilución. Los valores de E_f de cada cebador fueron las siguientes: $E_{f_{wspAlbB}} = 98,76\%$ y $E_{f_{Actina}} = 111,55\%$.

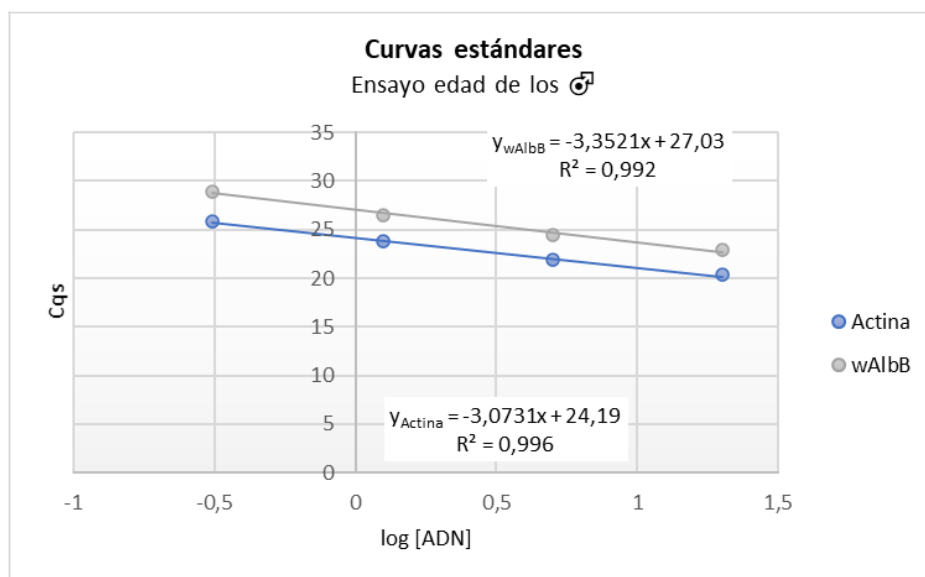


Figura 27. Curvas estándar de los genes actina y *wsp* de la cepa wAlbB del ensayo para determinar la eficiencia de los cebadores utilizados para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en función de la edad de los machos de *Ae. albopictus*.

2.3.1.3. Ensayo de PCR en tiempo real para la comparación de la densidad bacteriana entre soma y ovario

Se hicieron disecciones de un total de cinco hembras, separando soma y ovario. En los cinco ovarios se detectó la superinfección con las cepas wAlbA y wAlbB. En los tejidos somáticos analizados sólo se detectó la cepa wAlbB en cuatro de los cinco individuos analizados, mientras que uno resultó negativo para ambas cepas de *Wolbachia*. Estas diferencias en las densidades de las cepas wAlbA y wAlbB que se encontraron en el tejido somático resultaron significativas (prueba U de Mann-Whitney, p-valor < 0,05). Por el contrario, en los ovarios no hubo diferencias significativas en la densidad de ambas cepas de *Wolbachia* (prueba U de Mann-Whitney, p-valor < 0,05). En la Figura 28 se muestra el diagrama de caja y bigotes o *box-and-whiker plot* con las densidades de las cepas wAlbA y wAlbB según el tejido en el que se alojan.

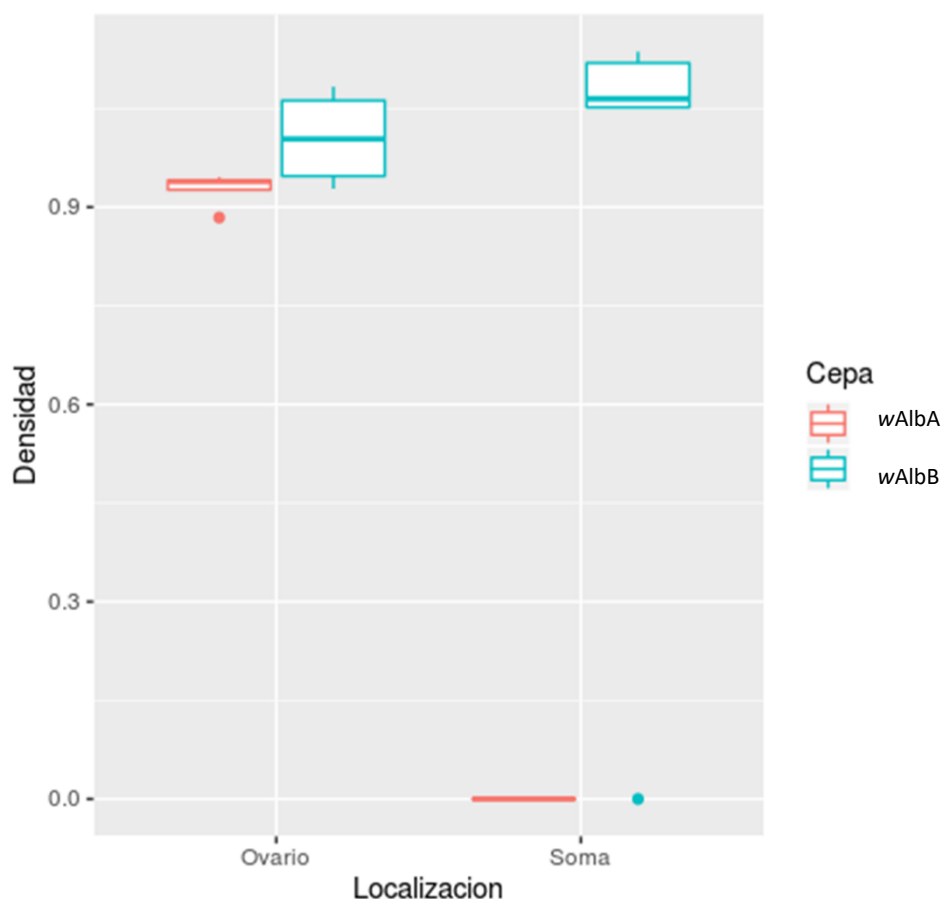


Figura 28. Densidades de las cepas de *Wolbachia*, wAlbA (rojo) y wAlbB (azul), en el ovario y en el soma de las hembras de *Ae. albopictus*. Las líneas horizontales gruesas representan las medianas, los límites inferior y superior de las cajas indican el primer y el tercer cuartiles respectivamente, los bigotes representan el rango intercuartil y los círculos los datos aberrantes.

2.3.1.4. Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa wAlbB en función de la longevidad de los machos

Se analizaron un total de cinco machos por cada tiempo. Una de las réplicas biológicas del tiempo dos fue eliminada, ya que su valor de Cq fue muy diferente al de las otras réplicas biológicas (dato aberrante), quedando un total de cuatro réplicas biológicas para el tiempo dos. No se detectaron diferencias significativas en las densidades de la cepa wAlbB entre los tiempos 0 y 1, ni tampoco entre los tiempos 1 y 2 (Prueba de Kruskal Wallis; p-valor = 0,3362). En la Figura 29 se observa la densidad de la cepa wAlbB en los machos de *Ae. albopictus* a lo largo del tiempo en un diagrama de caja y bigotes o *box-and-whisker plot*.

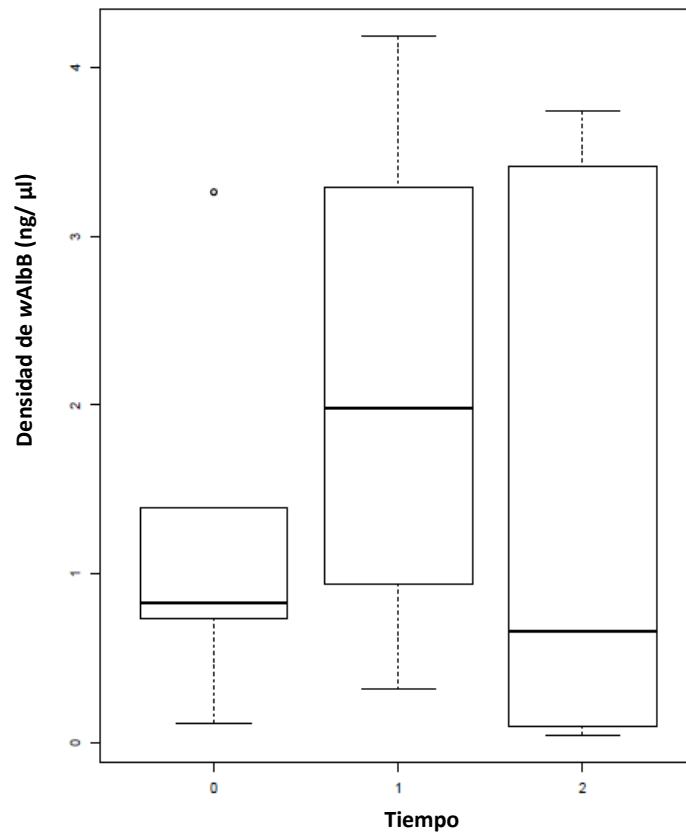


Figura 29. Densidad de la cepa wAlbB en los machos de *Ae. albopictus* a lo largo del tiempo. Las líneas horizontales gruesas representan las medianas, los límites inferior y superior de las cajas indican el primer y el tercer cuartiles respectivamente, los bigotes representan el rango intercuartil y los círculos abiertos los datos aberrantes.

2.4. Discusión

La densidad bacteriana juega un rol importante en todos los fenotipos que *Wolbachia* produce a sus hospedadores (López-Madrigal & Duarte, 2019). En el último tiempo se han reforzado las observaciones originales de que, además de la localización en la línea germinal, una característica conservada de la infección con *Wolbachia* es la localización en el tejido somático, sugiriendo que esta no es accidental, sino un aspecto clave en la biología de *Wolbachia* (Pietri et al., 2016). La hipótesis sobre el origen de *Wolbachia* aún es controvertida: ¿se originó como un endosimbionte de la línea germinal que invadió el soma o, por el contrario, surgió como un endosimbionte somático que invadió la línea germinal para su transmisión vertical? Hay casos en los que la bacteria se encuentra exclusivamente en la línea germinal, como la mosca tsetsé, y otros en los que se encuentra exclusivamente en tejidos somáticos como en los nematodos masculinos (Pietri et al., 2016). En este trabajo se estudió la densidad de ambas cepas de *Wolbachia* en los tejidos somático y ovárico de *Ae. albopictus*. Se detectó la infección en ambos tejidos, pero con algunas diferencias. Mientras que el tejido somático presentó una infección simple con la cepa wAlbB, los ovarios presentaron una infección doble. Esto es consistente con el estudio de Dobson et al. (1999), quienes informaron que en *Ae. albopictus* infectados individualmente con la cepa wAlbA no se detectó la presencia de *Wolbachia* en el tejido somático, lo que sugiere que esta cepa se localiza solo en el tejido reproductivo, mientras que, la infección con wAlbB fue detectada tanto en el tejido somático como en el reproductivo en *Ae. albopictus*. Zouache et al. (2009) obtuvieron resultados diferentes detectando las cepas wAlbA y wAlbB tanto en tejido somático (glándulas salivales e intestino) como en ovarios de *Ae. albopictus* de la isla Reunión. Además, encontraron que la densidad relativa de *Wolbachia* fue mayor en los ovarios que en el tejido somático, pero no encontraron diferencias entre las dos cepas de *Wolbachia* en ambos tejidos. Esto último coincide con los resultados hallados para los ovarios estudiados en el presente trabajo.

Existen estudios que indican que ambas cepas muestran diferencias altamente significativas en sus densidades dentro del hospedador, siendo la mayor la de la cepa wAlbB (Wiwatanaratanabutr & Kittayapong, 2009). Esto puede deberse a una

diferencia en la tasa de multiplicación de ambas cepas, siendo esta menor en la que corresponde al supergrupo A de *Wolbachia* (Wiwatanaratnabutr & Kittayapong, 2006; Ikeda et al., 2003). También se descubrió que cada cepa de *Wolbachia* prolifera de manera independiente, lo que significa que la presencia de una cepa no afecta la tasa de crecimiento de otra dentro del hospedador. Una razón para explicar esta diferencia en la velocidad de proliferación puede ser que la del supergrupo B podrían penetrar las células del hospedador más eficientemente y multiplicarse más rápidamente en los tejidos reproductivos que la del supergrupo A (Kittayapong et al., 2002b).

La presencia de *Wolbachia* en tejidos somáticos específicos sugiere que el tropismo en el soma no es accidental, sino un aspecto clave de la biología de *Wolbachia*. Su localización somática puede mantenerse evolutivamente porque ayuda a la transmisión horizontal dentro y entre especies, sirviendo, así como un mecanismo para aumentar la diversidad genética (Pietri et al., 2016). Además, puede conferir fenotipos ventajosos en el hospedador que mejoran su transmisión a la línea germinal (Pietri et al., 2016) y pueden mejorar la fecundidad del hospedador o las tasas de transmisión vertical de *Wolbachia* (Dobson et al., 1999). Teniendo en cuenta la importancia de la localización de *Wolbachia* en el tejido somático para su uso como técnica de biocontrol, es importante descartar que los genes que codifican las proteínas de *Wolbachia* de interés no sean parte de un fragmento de ADN insertado en el genoma del hospedador, ya que de esta manera *Wolbachia* deja de producir el efecto deseado (Klasson et al., 2009; Woolfit et al., 2009).

Además, se estudió la evolución de la densidad bacteriana de la cepa *wAlbB* en función de la edad de los machos. Este estudio reveló que no existe variación de la densidad de esta cepa a lo largo de la adultez de los machos. Este resultado difiere al hallado por Tortosa et al. (2010), quienes encontraron una correlación positiva significativa entre la edad y la densidad de *wAlbB* en los machos de las islas de Córcega y de la isla Reunión, pero una correlación negativa en los machos de Grecia, concluyendo que la densidad de *wAlbB* en machos se puede correlacionar tanto de manera positiva como negativa con la edad, según la muestra de origen, aunque en el presente trabajo, ambas variables resultaron independientes.

Si bien en este estudio no se pudo cuantificar la densidad de *Wolbachia* en las hembras, se sabe que dicha variable influye de manera crítica en la estabilidad de la infección y en el alcance de los fenotipos inducidos por *Wolbachia* en el hospedador (López-Madrigal & Duarte, 2019). La densidad de la bacteria en las hembras podría estar afectando la competencia vectorial y en los machos la IC, lo que podría explicar la baja tasa de eclosión de los huevos de la población argentina de *Ae. albopictus* (ver capítulo 4). Además, la baja densidad puede impedir la transmisión vertical de la bacteria dando lugar a individuos no infectados o, en el caso de coinfección, provocar la pérdida estocástica de determinadas cepas de *Wolbachia*, lo que podría explicar el polimorfismo de infección hallado en el capítulo 1 de esta tesis (López-Madrigal & Duarte, 2019). Por consiguiente, la densidad bacteriana es un parámetro clave para la comprensión de la dinámica evolutiva *Wolbachia*-hospedador y para la implementación eficiente de la bacteria como una herramienta para el control de insectos plaga y de enfermedades transmitidas por vectores (Hoffmann et al., 2015). Considerando que uno de los factores ambientales que afectan los títulos de *Wolbachia* y, por ende, el fenotipo del hospedador es la temperatura ambiental, en el siguiente capítulo se estudió el efecto de la temperatura en la infección con *Wolbachia* en el complejo *Cx. pipiens* y en *Ae. fluviatilis*.

3. Capítulo 3: Influencia de la temperatura ambiental en la prevalencia de la infección con *Wolbachia* en *Ae. fluviatilis* y complejo *Cx. pipiens*

3.1. Introducción

Tanto el fenotipo inducido por *Wolbachia* en el hospedador como su potencial de transmisión están influenciados por la densidad o carga de la bacteria (López-Madrigal & Duarte, 2019). La temperatura ambiental es un factor que muestra un gran impacto sobre la carga de *Wolbachia* y los fenotipos dependientes de esta. Se ha demostrado que las temperaturas superiores a 30°C reducen la densidad de *Wolbachia* o incluso eliminan la infección, mientras que las temperaturas inferiores a 20°C comprometen la tasa de proliferación (López-Madrigal & Duarte, 2019). Entonces, las temperaturas que se encuentran dentro del rango que toleran los hospedadores pueden resultar extremas para *Wolbachia*.

Recientemente se demostró una reducción en la frecuencia y densidad de la cepa *wMel* transinfectada en una población natural de *Ae. aegypti* en Cairns, Australia causada por una ola de calor, aunque estos efectos fueron reversibles, recuperándose los niveles previos después de que cesaron las altas temperaturas (Ross et al., 2020a). Los efectos causados por la temperatura ambiental podrían variar con la identidad de la cepa. Por ejemplo, la transinfección estable con la cepa *wAlbB* en *Ae. aegypti* se ha mostrado menos vulnerable al estrés por calor que aquella con la cepa *wMel* en condiciones de laboratorio (Ross et al., 2017). Si bien estos efectos pueden persistir de generación en generación, la densidad de *Wolbachia* puede recuperarse bajo condiciones que incluyan temperaturas más bajas. Este es un aspecto importante para tener en cuenta cuando se evalúa su uso como herramienta de biocontrol generando transfecciones estables en diferentes especies de mosquitos con diferentes cepas de *Wolbachia*, ya que una disminución en la densidad de la bacteria puede resultar en una posible reducción en la eficiencia de bloqueo del virus, una incompatibilidad citoplásmica más débil y/o una falla en la transmisión materna (Ye et al., 2016).

Actualmente son muy escasos los estudios que han probado directamente las relaciones entre la temperatura y las infecciones con *Wolbachia* en poblaciones

naturales de mosquitos. En la Argentina esta dependencia se estudió en una población de *Ae. albopictus* de Eldorado, Misiones, donde se encontró que el aumento de la temperatura en el microambiente incrementa la probabilidad de infección con la cepa wAlbB, al menos en el rango de temperatura entre 14°C a 25°C (Alonso, 2020). Esto resulta de gran interés porque esta cepa tendría la potencialidad de utilizarse para la transinfección de *Ae. aegypti* en esta región subtropical. Como el éxito de los programas de liberación de mosquitos infectados con *Wolbachia* depende de la estabilidad de las cepas en la naturaleza, y debido a que el cambio climático está provocando temperaturas extremas en todo el mundo, los estudios de los efectos de la temperatura en las poblaciones naturales infectadas con *Wolbachia* son importantes (Ross et al., 2019b).

En este capítulo se estudió la posible relación entre la temperatura ambiental y la prevalencia de *Wolbachia* en las larvas de *Ae. fluviatilis* de Eldorado, Misiones y del complejo *Cx. pipiens* de Berisso y La Plata, Buenos Aires.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Colecta de individuos

Se realizaron colectas mensuales de larvas de *Ae. fluviatilis* y del complejo *Cx. pipiens*. Además, se registraron los datos de temperatura de los recipientes donde se obtuvieron los individuos.

El muestreo de *Ae. fluviatilis* se realizó en recipientes artificiales en la localidad de Eldorado, Misiones (26° 24' 00" S - 54° 38' 00" O), durante el año 2016. Debido a la imposibilidad de viajar todos los meses a esta localidad, el material y los datos de temperatura de cada recipiente fueron facilitados por la Dra. Carolina Alonso, la cual desarrolló su tesis en el lugar y con quien se trabajó en colaboración.

Los muestreos del complejo *Cx. pipiens* se realizaron en las zanjas domiciliarias ubicadas en La Cumbre, La Plata (34°55'20" S – 58°00'34" O) y Berisso (34°52'11" S – 57°52'10" O) (Fig. 9, Capítulo 1), ambas localidades ubicadas en la provincia de Buenos Aires, durante los meses de febrero a diciembre del 2020. La colecta se llevó a cabo mediante el uso de pipetas, cucharones y redes de acuario de malla fina; el agua se juntó en recipientes de plásticos que fueron trasladados al laboratorio. Luego, se separaron las larvas y se les sustrajo el agua con papel secante para

realizar la extracción de ADN. La temperatura fue tomada con un termómetro varilla de mercurio con un rango de temperatura de 0°C a 110°C, el cual fue sumergido unos 10 cm en el agua. Durante este muestreo no fue posible colectar individuos en todos los meses debido a que las zanjas presentan periodos de sequías y en algunas oportunidades floraciones algales que impiden el desarrollo de los estados inmaduros de culícidos. Además, durante ese año se dispuso el Aislamiento Social Preventivo y Obligatorio (ASPO) - Decreto 297/2020 de público conocimiento, que impidió varias veces el acceso a los sitios de muestreos.

3.2.2. Extracción de ADN

En primera instancia se realizó la extracción con **Chelex® 100** (Bio-Rad, EE. UU.) como se explicó en el apartado 2.2.3. *Extracción de ADN* en el Capítulo 1 de esta tesis. Este método demostró ser ineficiente en la extracción de ADN a partir de larvas, mostrando bandas de PCR muy tenues o incluso ausentes cuando se verificó la amplificabilidad del ADN genómico total mediante la amplificación de la subunidad I de la citocromo oxidasa utilizando los cebadores S1718 y A2442 (Normark, 1996) y las condiciones de Rodríguez et al. (2010). Debido a los problemas presentados por dicho protocolo de extracción de ADN a partir de larvas, que llevaron a la pérdida de algunas muestras del complejo *Cx. pipiens*, se procedió a realizar la extracción utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EE. UU.) según las indicaciones del fabricante. No se observaron inconvenientes como el mencionado en los casos en los que se trabajó con individuos adultos, resultando ser la extracción con Chelex® 100, un método muy eficiente, rápido y más económico para la extracción de ADN en comparación con el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EE. UU.).

3.2.3. Prevalencia de *Wolbachia* en las larvas de *Ae. fluviatilis* y complejo *Cx. pipiens* según la temperatura.

El diagnóstico de la infección se llevó a cabo por amplificación por PCR de un fragmento de la subunidad catalítica de la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria (*coxA*) de *Wolbachia* utilizando los cebadores diseñados por Baldo et al. (2006) (Tabla 2, capítulo 1 de esta tesis), usando como control positivo ADN de

Wolbachia obtenido de *Cx. pipiens* y como control negativo agua libre de DNAsas. Las condiciones de ciclado fueron 94°C durante 15 segundos, 56°C durante 45 segundos, 72°C durante 1 minuto durante 37 ciclos. Para evitar falsos negativos, la amplificabilidad (sensu Werren et al., 1995a) del ADN genómico total se verificó utilizando los cebadores S1718 y A2442 (Normark, 1996) (Tabla 2, capítulo 1 de esta tesis) que amplifican la subunidad I de la citocromo oxidasa (*coxI*) con las condiciones especificadas por Rodríguez et al. (2010).

Las reacciones de amplificación fueron preparadas en un volumen final de 12,5 µl que contenía 6,25 µl de Master Mix (PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs. As.), 4,25 µl de agua libre de DNAsas, 0,5 µl de cada cebador (10 µM) (Invitrogen, EE. UU.) y 1 µl de ADN Molde o 1 µl de agua libre de DNAsas para el control negativo. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Nexus (Lobov Científica, Bs. As.). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) utilizando una cuba Mini-Sub CellGT®, (BIORAD, EE. UU.), conteniendo Buffer TBE 0,5X y separados a 90 voltios durante 40 minutos. Se sembraron 5 µl del producto de PCR adicionando 1 µl de buffer de carga (*loading buffer*). Al gel de agarosa se agregó de Bromuro de Etidio (BrEt) 0,4 µg/ml (Promega, EE. UU.) previamente a la corrida. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV Tm-20 Transiluminator (Upland, EE. UU.).

3.3. Resultados

3.3.1. Colecta de individuos

Se colectaron un total de 5 larvas de *Ae. fluviatilis* cada mes durante el año 2016. En el caso del complejo *Cx. pipiens* también se colectaron 5 larvas en cada mes, cuando ello fue posible. Las muestras correspondientes al mes de marzo de ambas zanjás y las larvas de la zanja de La Cumbre correspondientes a junio se perdieron dado que se extrajeron con Chelex y no se contaba con réplicas. Durante los meses de julio, agosto, septiembre y octubre no se detectó la presencia de larvas en la zanja de La Cumbre. En el caso de la zanja de Berisso, durante los meses de junio, julio y agosto no se pudo acceder al sitio de colecta debido al ASPO. En octubre no se detectó la presencia de larvas y en noviembre la zanja se encontraba seca.

3.3.2. Prevalencia de *Wolbachia* en las larvas de *Aedes fluviatilis* y del complejo *Culex pipiens* según la temperatura

En *Ae. fluviatilis* la prevalencia de la infección con *Wolbachia* fue del 100% todos los meses excepto en el mes de enero, que llegó al 80%, contabilizándose un individuo negativo (Figura 33). Las temperaturas oscilaron entre los 21°C y 29°C, presentando un pico máximo (37°C) y un pico mínimo (18°C) en los meses de marzo y octubre, respectivamente. El promedio anual fue de 25,5°C, sin marcadas diferencias estacionales (Figura 30).

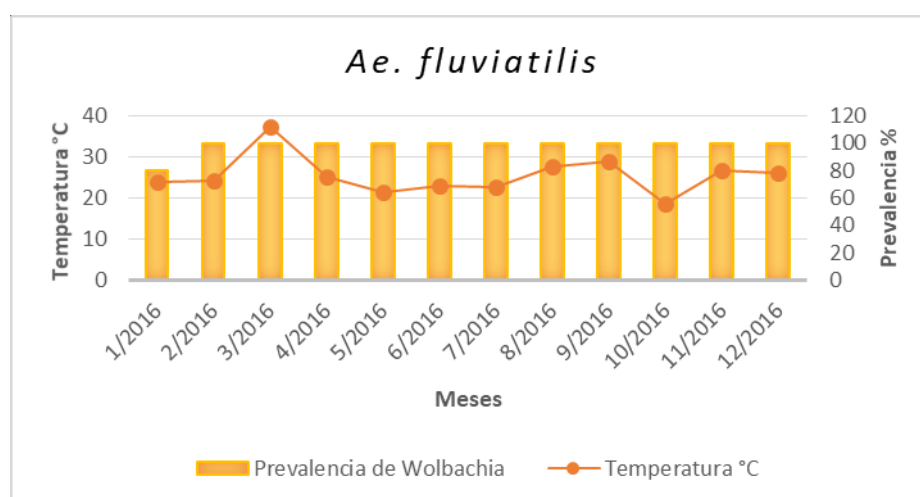


Figura 30. Prevalencia mensual de la infección con *Wolbachia* en *Ae. fluviatilis* según la temperatura del agua en el recipiente. Las barras indican la prevalencia de la infección con wFlu y los círculos indican los valores de la temperatura al momento de la colecta.

En el complejo *Cx. pipiens* también se detectó una prevalencia del 100%, a excepción del mes de febrero en la zanja de Berisso, la cual presentó una prevalencia del 80% con la presencia de un único individuo negativo (Figura 31). En la zanja de Berisso la temperatura varió entre 14°C y 23°C, registrándose las temperaturas mínima y máxima en los meses de mayo y marzo, respectivamente. En la zanja de La Cumbre la temperatura varió entre los 9°C y 26°C, registrándose en junio la temperatura mínima y en noviembre la máxima. Entre los meses de febrero y mayo, durante los cuales se hizo un seguimiento de ambas zanjas, se observó un descenso de la temperatura hacia los meses cercanos al invierno. Debido a la interrupción de este ensayo por las razones comentadas anteriormente, no se pudo

ver cómo es la tendencia de la temperatura a lo largo de todo el año, la cual se esperaría que presente cierta estacionalidad entre los meses de verano e invierno debido a que ambas zanjas se encuentran en una región templada (Figura 31).

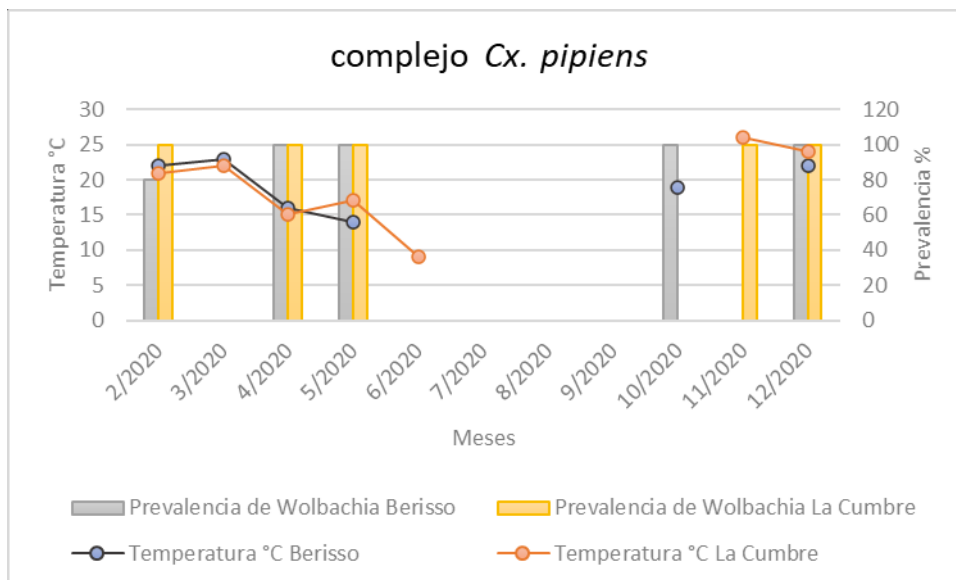


Figura 31. Prevalencia mensual de la infección con *Wolbachia* en el complejo *Cx. pipiens* de las zanjas de La Cumbre y Berisso según la temperatura del agua de la zanja. Las barras indican la prevalencia de la infección con wPip en Berisso (gris) y en La Cumbre (amarillo) y los círculos indican los valores los valores de la temperatura al momento de la colecta en Berisso (azul) o en La Cumbre (naranja).

Debido a que la prevalencia de la infección con *Wolbachia* fue constante tanto en *Ae. fluviatilis* como en el complejo *Cx. pipiens*, a excepción de un único mes, no fue necesario la utilización de un método estadístico para evaluar los datos. Los resultados obtenidos permiten inferir que no existe una relación entre la temperatura del hábitat y la prevalencia de infección con la bacteria.

3.4. Discusión

La temperatura es un factor clave para la supervivencia y el desarrollo de los insectos y además es determinante para la distribución de los mismos (Lau et al., 2020). Las enfermedades arbovirales ocasionadas por los patógenos transmitidos por mosquitos (dengue, Zika, fiebre amarilla y Chikungunya) están estrechamente vinculadas a la ecología de las poblaciones de los vectores; esta ecología vectorial depende en parte de la tolerancia a la temperatura de sus hospedadores (Mordecai et al., 2019). Actualmente, *Wolbachia* se utiliza como una herramienta para reducir la transmisión del virus dengue transmitido por mosquitos (Walker et al., 2011). Se sabe que las temperaturas extremas pueden afectar a *Wolbachia* dentro del hospedador, lo que lleva a una disminución en la eficiencia del bloqueo de arbovirus o en factores importantes para la invasión de la bacteria, como las tasas de transmisión de la misma y la magnitud de la IC (Ross et al., 2019a).

En este trabajo se evaluó la prevalencia de las cepas de *Wolbachia* wFlu y wPip en función de la temperatura ambiental de los sitios de cría de las larvas de mosquitos, y no fue posible establecer ninguna relación entre la temperatura y la prevalencia de las infecciones consideradas. Como es sabido, las infecciones con *Wolbachia* responden de manera diferente al estrés por calor. Estas diferencias en la tolerancia a las altas temperaturas podrían deberse a diferentes historias evolutivas: por ejemplo, la infección con la cepa wAlbB en *Ae. aegypti* muestra una mayor tolerancia al calor que la cepa wMel posiblemente porque la primera se encuentra naturalmente en *Ae. albopictus*, un mosquito originario del sudeste asiático; la tolerancia al calor relativamente mayor de esta cepa se puede haber desarrollado como respuesta a las temperaturas experimentadas en la distribución histórica de este mosquito (Ross et al., 2019b, 2017). Si bien los efectos producidos por la exposición a altas temperaturas pueden persistir a lo largo de las generaciones, las infecciones con *Wolbachia* se pueden recuperar si esta variable ambiental disminuye (Ulrich et al., 2016). Por el contrario, cuando las altas temperaturas se mantienen durante todas las etapas de la vida, las infecciones con wMel no se transmiten a la siguiente generación (Ross et al., 2017). Esto sugiere que la duración de la exposición a la temperatura máxima alcanzada afectaría la densidad de *Wolbachia*.

El efecto del estrés térmico sobre la densidad de *Wolbachia* durante el desarrollo larvario de su hospedador a veces se puede manifestar recién en la etapa adulta de este último (Ulrich et al., 2016). En el presente estudio las mediciones se realizaron sobre las larvas, pero no se verificó lo que ocurre con individuos maduros. Aunque las oscilaciones de temperatura estuvieron dentro del rango tolerable para *Wolbachia* (20°C a 30°C), el sitio de cría de *Ae. fluviatilis* presentó un pico en 37°C durante el mes de marzo, y en el sitio de cría del complejo *Cx. pipiens* hubo temperaturas por debajo de los 20°C durante varios meses. Si bien es posible que estas variaciones no hayan tenido ningún efecto en los estados inmaduros, podrían haberlo tenido en los adultos, que es algo que no se pudo evaluar en este trabajo.

Aunque se puede concluir que la temperatura del sitio de cría de las larvas (dado que la variable temperatura fue la medida en el campo) no afecta la prevalencia de *Wolbachia* en este estado del ciclo de vida, es necesario realizar ensayos de laboratorio donde se pueda determinar si condiciones más extremas de temperatura que las registradas en el presente trabajo (y quizás durante períodos prolongados de tiempo) pueden tener algún efecto sobre la frecuencia de la bacteria en la población. Además, es necesario descartar el posible efecto del estrés térmico durante el desarrollo larval en los adultos, ya que ellos son los que transmiten los arbovirus. Por lo tanto, es importante que estén infectados con la bacteria y a una densidad tal que puedan bloquear la transmisión viral; además, son los que producen la IC, otro factor importante cuando se evalúa el uso de *Wolbachia* como herramienta de biocontrol para el reemplazo de las poblaciones de campo.

4. Capítulo 4: Caracterización biológica y de la competencia vectorial de *Aedes albopictus* infectado con *Wolbachia*.

4.1. Introducción

La evidencia muestra que las infecciones por *Wolbachia* afectan varios aspectos de la biología, fisiología, inmunidad, ecología y evolución y reproducción del hospedador (Bourtzis et al., 2014; Rainey et al., 2014; Werren et al., 2008).

De las especies en las que se halló la infección con *Wolbachia* en este estudio se profundizó sobre los parámetros poblaciones y competencia vectorial de *Ae. albopictus* con el fin de aportar información sobre esta especie, y en un futuro evaluar si estos parámetros pueden estar alterados por la infección con *Wolbachia*.

Durante las últimas décadas *Ae. albopictus* se ha extendido desde el Pacífico occidental y sudeste de Asia hacia Europa, África, Medio Oriente, América del Norte y del Sur y el Caribe (Bonizzoni et al., 2013; Gratz, 2004). Su propagación se debió principalmente al transporte inadvertido de sus huevos a través del comercio internacional de neumáticos usados (Benedict et al., 2007). Este mosquito se adapta tanto a las regiones tropicales como a las templadas (Rai, 1991) y a las zonas urbanas y entornos peri-domésticos, donde se alimenta de humanos y animales domésticos, y ovipone en una variedad de contenedores naturales y artificiales (Hawley, 1988). Estas características biológicas son relevantes para la invasión de ambientes novedosos y la capacidad de desplazar a otras especies (Juliano & Lounibos, 2005). Una vez establecido, *Ae. albopictus* puede convertirse en una plaga. Pero como se comentó anteriormente, el mayor riesgo se debe a su potencial para vectorizar una amplia gama de patógenos humanos (Mitchell, 1995) dado que las especies de mosquitos invasores pueden mejorar la transmisión de un patógeno residente y/o introducir uno nuevo en una región (Juliano & Lounibos, 2005). Este mosquito es considerado un vector competente del dengue y del virus de la encefalitis Japonesa en su lugar de origen (Gratz, 2004). Además, es el principal vector de Chikungunya en África y Europa (Azar et al., 2017; Vega-Rúa et al., 2014; Paupy et al., 2012; Delatte et al., 2008). Se demostró que en condiciones

experimentales es competente para transmitir, al menos, 26 arbovirus (Azar et al., 2017; Ruiling et al., 2017; Vega-Rúa et al., 2014; Paupy et al., 2009; Reiter et al., 2006; Gratz, 2004). *Aedes albopictus* juega un papel relativamente menor en comparación con *Ae. aegypti* en la transmisión del dengue, en parte por las diferencias en las preferencias alimenticias del mosquito y la competencia reducida del vector (Lambrechts et al., 2010). Sin embargo, brotes recientes de chikungunya y dengue en Hawái, Mauricio, Gabón, Madagascar y La Reunión (Rezza, 2012) y la primera transmisión endógena de chikungunya en Europa (Rezza et al., 2007) demuestran el creciente impacto en la salud pública de esta especie de mosquito en todo el mundo. De hecho, estudios de competencia vectorial asociaron la aparición de una sola mutación en el virus Chikungunya que mejora la eficiencia de transmisión por *Ae. albopictus* (Tsetsarkin et al., 2007).

Este mosquito se introdujo a mediados de la década de 1980 en los Estados Unidos y Brasil (Forattini, 1986; Sprenger & Wuithiranyagool, 1986). Después de esta introducción, parecía superar a *Ae. aegypti* competitivamente (Hawley, 1988), experimentando una rápida expansión geográfica en el este de los EE. UU. (Moore & Mitchell, 1997), y en Brasil (Rai, 1991), registrándose en al menos 20 de los 27 estados brasileños (La Corte dos Santos, 2003). Sin embargo, ciertos rasgos biológicos como la diapausa de invierno exhibida por las poblaciones de EE. UU. No se han observado en Brasil (Hawley, 1988), quizás porque estas poblaciones son más semejantes a las del sudeste asiático tropical que a las poblaciones asiáticas templadas (Mousson et al., 2005).

En Argentina *Ae. albopictus* se detectó por primera vez en 1998 en dos localidades de Misiones (noreste de Argentina), cerca de la frontera con Brasil: San Antonio y Eldorado (Schweigmann et al., 2004; Rossi et al., 1999). Durante el período 2002-2004 se reportó su presencia en otras dos localidades de Misiones, Puerto Iguazú y Comandante Andresito (Rossi et al., 2006). Más recientemente se detectó en Colonia Aurora (Misiones) y en dos localidades de Corrientes: Garruchos y Gobernador Virasoro (Ruinas Jesuíticas "San Alonso") (Goenaga et al., 2020; Lizuain et al., 2019). Hasta donde se sabe, no hay otro registro de *Ae. albopictus* en Argentina y, a pesar del riesgo que representa, casi no hay información sobre rasgos biológicos como el ciclo de vida y sobre parámetros demográficos.

Los estudios de *Ae. albopictus* en el país son escasos y están orientados principalmente a su distribución actual. En este capítulo, se estudiaron las características biológicas que incluyen rasgos del ciclo de vida, parámetros demográficos y competencia del vector en la transmisión de dengue y Chikungunya, con el objetivo de incrementar el conocimiento para estudios futuros.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Mosquitos y recolección de datos ambientales

Se colectaron larvas de *Ae. albopictus* en el Parque Nacional Iguazú, para lo cual se obtuvo un permiso NEA 326 (Administración de Parques Nacionales). La identificación morfológica de los especímenes (larvas de 3^{er} y 4^{to} estadio) se realizó utilizando una clave dicotómica (Consoli & Oliveira, 1994), mientras que las de 1^{er} y 2^{do} estadio se criaron hasta el 4^{to} estadio y las pupas hasta la emergencia adulta. Las etapas inmaduras fueron transportadas al laboratorio para su posterior procesamiento. La temperatura y la humedad diarias se registraron cada hora utilizando un registrador de datos HOBO durante el mes de febrero en el Parque Nacional Iguazú. Estos datos se utilizaron para construir una curva de temperatura promedio de ciclo diario máximo a mínimo desde esta ubicación.

4.2.2. Relevamiento de *Ae. albopictus*

Se realizó un relevamiento de *Ae. albopictus* principalmente en contenedores artificiales de los cementerios de las localidades de Jardín América (27°1'42'' S – 55°13'56,7'' O), Montecarlo (26°33'52,7'' S – 54°47'06'' O), El Alcazar (26°42'39,7'' S – 54°48'56,6'' O) y San Ignacio (27°6'17,5'' S – 55°31'31,5'' O). Todos los sitios de colecta se ubican a lo largo de la Ruta Nacional 12 que conecta Posadas con Eldorado, ambas localidades ubicadas en la provincia de Misiones, Argentina. La metodología consistió en volcar el contenido de agua de los recipientes en una bandeja y en la subsiguiente recolección de larvas del género *Aedes* en un tarro plástico para su traslado. Para su identificación, en el laboratorio se separaron bajo

microscopio estereoscópico en base a la morfología de la larva mediante el empleo de claves dicotómicas (Consoli & Oliveira, 1994).

4.2.3. Características del ciclo de vida en condiciones de laboratorio y parámetros demográficos

Se colectaron larvas de *Ae. albopictus* en recipientes artificiales hallados en el PN Iguazú (Figura 12 D, Cap. 1) las cuales fueron acondicionadas en el laboratorio de las instalaciones del Centro de Investigaciones Ecológicas Subtropicales (CIES) de Puerto Iguazú. La metodología utilizada para la colecta de larvas hasta la obtención de los adultos fue la misma que se detalló en el apartado 1.2.2.3 *Ae. albopictus* y *Ae. fluviatilis*. Luego de 3-5 días de la emergencia de los adultos se les ofreció alimentación sanguínea con un hámster durante 45-60 minutos en tres oportunidades. Se colocó un recipiente circular con un papel de filtro y el algodón húmedo para la oviposición. El papel de filtro y el algodón húmedo fue cambiado cada vez que se observó la presencia de huevos. Los huevos junto con el papel de filtro y algodón fueron almacenados en una caja de Petri sellada con parafilm para preservar la humedad. Se obtuvieron un total de 500 huevos de la primera generación (filial 1, F1), 150 fueron utilizados para el ensayo de tabla de vida y el resto en los ensayos de competencia vectorial explicado más adelante en este capítulo.

Se colocaron 150 huevos separados en 2 bandejas de plástico con 1 L de agua declorinada en una incubadora con un ciclo de temperatura que fluctúa entre 21°C y 34°C y un fotoperíodo de verano de 14:10 (Luz:Oscuridad), simulando las condiciones registradas en el campo.

Cincuenta larvas de 1^{er} estadio se separaron en 1 L de agua declorinada en una bandeja de plástico (30 cm x 18 cm x 6 cm) con comida de cobayo finamente molida. La etapa larval y la mortalidad se registraron diariamente, así como el día de la pupación. Las pupas se colocaron en recipientes de plástico circulares (8 cm de alto x 3,5 cm de diámetro) y se les proporcionaron pasas de uva sobre la malla mosquitera de la tapa, en preparación para la emergencia. Después de la

emergencia, los adultos fueron sexados y colocados en una jaula de cartón circular (25 cm de alto x 22 cm de diámetro) durante 3 a 5 días para permitir el apareamiento. Luego, se les ofreció una alimentación sanguínea introduciendo un hámster inmovilizado en una jaula pequeña de metal el cual permaneció durante 45-60 minutos. Posteriormente, los adultos fueron trasladados a recipientes de plástico separados (8 cm de alto x 3,5 cm de diámetro) con papel de filtro y algodón húmedo en el fondo para la oviposición. Siete días después de la primera alimentación, las hembras adultas se colocaron juntas en una jaula de cartón circular (25 cm de alto x 22 cm de diámetro) para una segunda alimentación sanguínea y luego se colocaron nuevamente en recipientes individuales para oviponer. La mortalidad de los adultos se registró diariamente.

Se contaron los huevos depositados por cada hembra alimentada con sangre, se transfirieron a una placa de Petri sobre papel de filtro con algodón y se sellaron usando parafilm para mantener la humedad durante 7-10 días. Luego se volvieron a contar los huevos para verificar la cantidad y el estado de los mismos, y se colocaron en un recipiente de plástico con 250 ml de agua de clorinada y 10 mg de levadura para que las larvas se alimenten al eclosionar. Este procedimiento se realizó dos veces y los huevos que no eclosionaron no se examinaron para verificar la embriogénesis. Las larvas se contaron 48 horas después de cada inmersión.

La supervivencia se expresó como el porcentaje de individuos que alcanzaron el siguiente estado. También se midió el tiempo medio de desarrollo larval y pupal y la proporción de sexos de los adultos emergentes. La fecundidad se determinó como el número total de huevos puestos por mosquito sobre el número total de hembras alimentadas y la fertilidad como la proporción de huevos eclosionados sobre el número total de huevos por población. Se utilizaron los registros diarios de mortalidad para calcular la supervivencia desde el primer día en el primer estadio en función de la edad (l_x); el número de huevos puestos diariamente se usó para calcular la fecundidad específica por edad (m_x), dividiendo el número total de huevos puestos cada día (x) por el número de individuos vivos al final de ese día. Las variables l_x y m_x permitieron la estimación de parámetros demográficos como la

tasa intrínseca de aumento natural (r), la tasa reproductiva neta (R_0) y el tiempo medio de generación (T_g) (Rabinovich & Nieves, 2011).

4.2.4. Ensayos de competencia vectorial del virus dengue y Chikungunya

Infección peroral

Estos estudios se realizaron en el insectario BSL-3 en el Laboratorio de Arbovirus, Centro Wadsworth, Departamento de Salud del Estado de Nueva York (Albany, Nueva York, EE. UU.), utilizando huevos de la F1 obtenidos de la población de PN Iguazú mediante una colaboración internacional existente entre ambas instituciones, CEPAVE y Centro Wadsworth. Los ensayos de competencia vectorial se realizaron usando la cepa DENV-2 306 de Nicaragua (GenBank No. SAMN011003699) y la cepa CHIK 91077 (GenBank No. EF451145). Se preparó una ingesta sanguínea que contenía virus obtenido a partir de 4 (para Chikungunya) o 6 (para dengue) días de crecimiento en células del mosquito *Ae. albopictus* (C6 / 36, ATCC). Específicamente, para la preparación de la ingesta sanguínea se usaron 8,5 ml de sangre bovina desfibrinada y 0,5 ml de sacarosa al 50,0% (p / v). A ello se le agregó 1 ml de la suspensión de células infectadas con el arbovirus. Las hembras de cinco a siete días de edad se alimentaron de la sangre infectada durante 1 hora con un alimentador artificial.

Se guardó una suspensión de la sangre virémica a -80°C para determinar el título del virus en el momento de la alimentación del mosquito, para lo cual se utilizó un ensayo en placa. Las hembras completamente alimentadas se separaron y se mantuvieron en cajas de 0,5 L en incubadoras con ciclos de temperatura que fluctuaban entre 21°C y 34°C y un fotoperíodo de 12:12 (Luz:Oscuridad), y se les proporcionó una solución de sacarosa al 10% embebida en paños de algodón como fuente de hidratos de carbono para sostenimiento de los ejemplares expuestos a la sangre virémica. A los 5, 10, 14 y 21 días posteriores a la alimentación, las hembras fueron anestesiadas con trietilamina (Sigma, MO) y se obtuvieron somas, patas y secreciones salivales de cada mosquito individual para determinar las tasas de infección, diseminación y transmisión, respectivamente (Ebel et al., 2004). Además,

se obtuvo el período de incubación extrínseco para cada virus, calculado como el tiempo entre la infección oral y la presencia del virus en la saliva.

La diseminación y la transmisión se estimaron a través de la proporción de mosquitos con virus en las patas y en las secreciones salivales, respectivamente, sobre el número de mosquitos infectados. Las tasas se compararon entre grupos utilizando la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher, según corresponda de acuerdo con los tamaños muestrales. Todos los análisis se realizaron con el programa R v. v.4.1.0 (RC, 2019) ejecutado a través de RStudio v1.0.153 (RStudio, 2017).

4.3. Resultados

4.3.1. Relevamiento de *Ae. albopictus*

Durante el relevamiento que tuvo lugar a lo largo de la Ruta 12 que conecta Posadas con Eldorado, se detectó por primera vez la presencia de dos larvas del 3^{er} estadio de *Ae. albopictus* en el cementerio de Montecarlo, Misiones junto con adultos de *Ae. aegypti*. En el resto de los sitios muestreados se registró la presencia principalmente de *Ae. aegypti* (Figura 32).

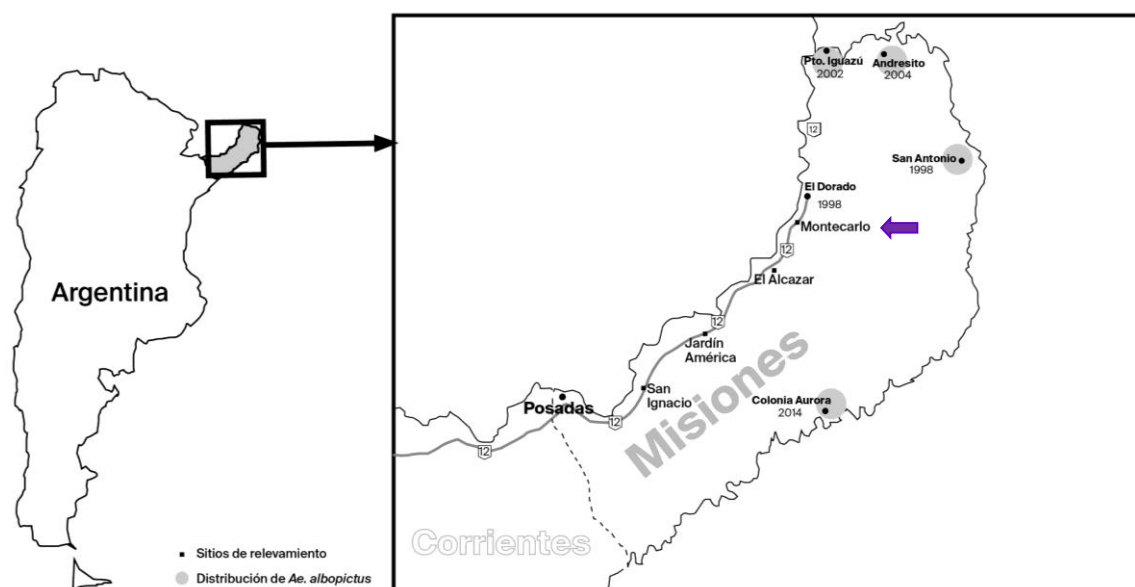


Figura 32. Mapa de los sitios de relevamiento de *Ae. albopictus* en la provincia de Misiones. Los círculos grises indican la distribución actual y la flecha violeta indica el nuevo registro de la especie.

4.3.2. Características del ciclo de vida en condiciones de laboratorio y parámetros demográficos

Se obtuvo un total de 49 adultos (29 machos y 20 hembras) a partir de las 50 larvas del 1^{er} estadio obtenidas de la F1 provenientes del campo del Parque Nacional Iguazú. Por lo tanto, la tasa de supervivencia de larvas del primer estadio a pupas fue del 98%. La proporción de sexos fue de 0,68 [♀ / ♂]. La fecundidad promedio fue de 30 huevos por hembra alimentada después de la primera alimentación sanguínea y de 82 huevos después de la segunda alimentación. Ecllosionaron solo el 10% de los huevos incubados. La longevidad promedio de los adultos fue de 16 días para las hembras y de 10 días para los machos. Los parámetros demográficos fueron los siguientes: la tasa reproductiva neta (R_0) fue de 0,512, el tiempo de generación de cohortes (T_g) fue de 33 días y la tasa intrínseca de crecimiento de la población (r) fue de -0,0197.

4.3.3. Ensayo de competencia vectorial del virus dengue y Chikungunya

El porcentaje de hembras de *Ae. albopictus* que se infectaron con el virus dengue después de alimentarse con sangre infectada que contenía $4,5 \times 10^6$ UFP / ml fue de 52,5% (N = 120 hembras alimentadas). Se detectó diseminación en el 36,5% de las hembras infectadas (N = 63). La diseminación del virus varió tal como se observa en la Figura 33 y como se detalla en la Tabla 7. El virus no se detectó en las secreciones salivales hasta el día 21 con solo un caso positivo (4,3%, N = 23).

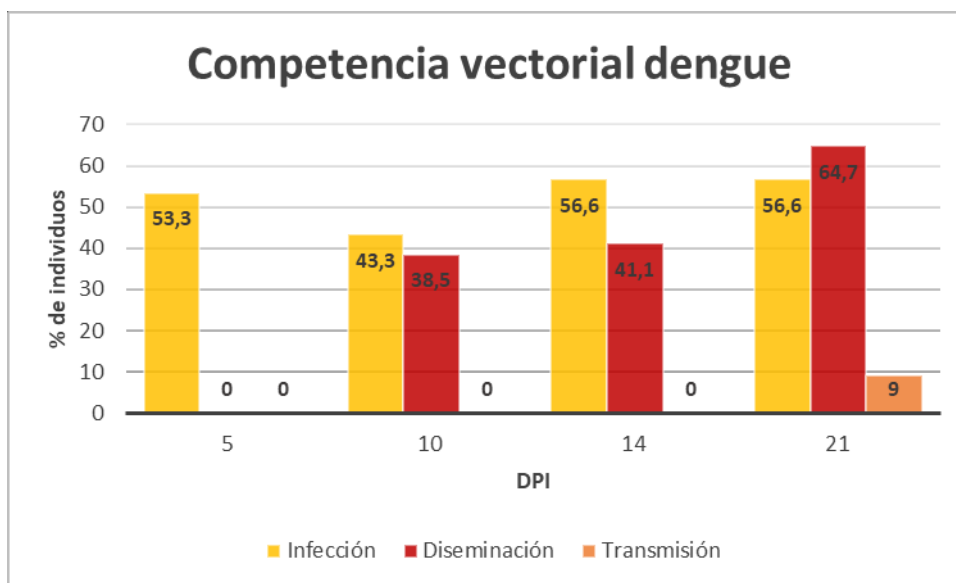


Figura 33. Porcentaje de individuos que presentaron infección, diseminación y transmisión de dengue para estudiar la competencia vectorial de este virus en *Ae. albopictus*.

Para el virus Chikungunya, el 69,8% de las hembras (N = 146 hembras alimentadas) fueron infectadas después de alimentarse con sangre con $1,7 \times 10^7$ UFP / ml. La diseminación de este virus comenzó el día 5 (40,9%) y alcanzó un valor máximo total de 57,8% (N = 102) en mosquitos infectados. La detección en saliva comenzó en hembras de 10 días post-infección (DPI) en un porcentaje total de 6,2% de individuos con infecciones diseminadas transmitidas (Figura 34 y Tabla 7). El período de incubación extrínseca fue de 16,5 días para el virus Chikungunya.

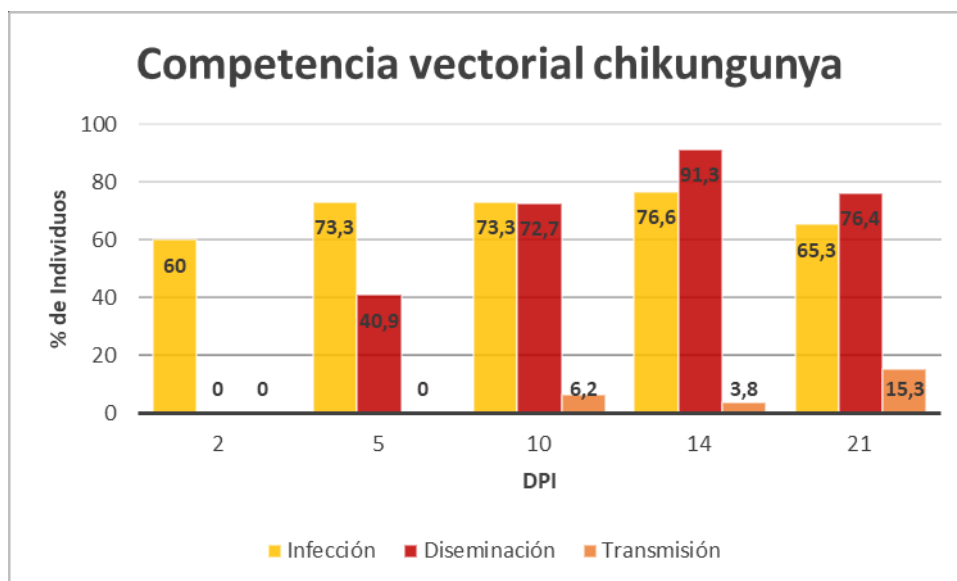


Figura 34. Porcentaje de individuos que presentaron infección, diseminación y transmisión de Chikungunya para estudiar la competencia vectorial de este virus en *Ae. albopictus*.

La proporción de mosquitos infectados con Chikungunya fue significativamente mayor que la infección por dengue (Prueba de χ^2 , p-valor= 0,005). Asimismo, la proporción de mosquitos con virus en las patas fue significativamente mayor para Chikungunya que para dengue (Prueba de χ^2 , p-valor= 0,01). Sin embargo, no hubo una diferencia significativa en las proporciones de mosquitos que transmiten los dos virus (Prueba de χ^2 , p-valor= 0,25) (Figura 35).

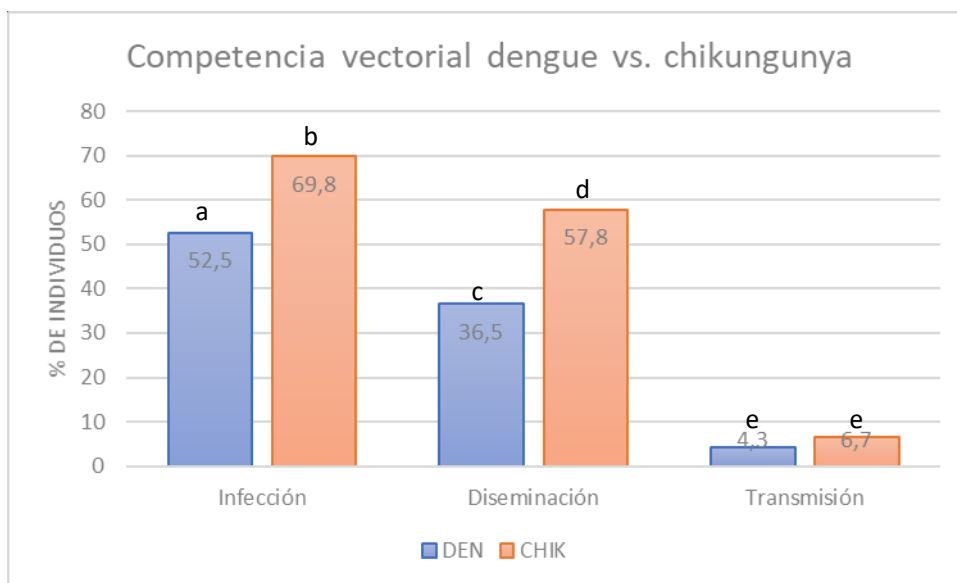


Figura 35. Comparación del porcentaje de infección, diseminación y transmisión de los virus dengue y Chikungunya en el estudio de competencia vectorial de *Ae. albopictus*. Las letras diferentes por encima de las barras indican diferencias significativas, por el contrario, letras iguales indican que no existen diferencias significativas.

Tabla 7. Competencia vectorial de dengue y Chikungunya en *Ae. albopictus* provenientes del Parque Nacional Iguazú, Misiones.

Virus	DPI	Título Viral	N° Mosq. alimentados	N° Infectado/ N° Mosq. alimentado (%)	N° Diseminado/ N° Infectado (%)	N° Transmisión/ N° Diseminación (%)	N° Transmisión/ N° Mosq. alimentados (%)
DENV 3065 (dengue)	5	$4,5 \times 10^6$	30	16/30 (53,3)	0/16 (0)	0/0 (0)	
	10		30	13/30 (43,3)	5/13 (38,5)	0/5 (0)	
	14		30	17/30 (56,6)	7/17 (41,1)	0/7 (0)	
	21		30	17/30 (56,6)	11/17 (64,7)	1/11 (9)	
			120	63/120 (52,5)	23/63 (36,5)	1/23 (4,3)	1/120 (0,8)
CHIKV 91077 (Chikungunya)	2	$1,7 \times 10^7$	30	18/30 (60)	0/18 (0)	0/0 (0)	
	5		30	22/30 (73,3)	9/22 (40,9)	0/9 (0)	
	10		30	22/30 (73,3)	16/22 (72,7)	1/16 (6,2)	
	14		30	23/30 (76,6)	21/23 (91,3)	1/21 (3,8)	
	21		26	17/26 (65,3)	13/17 (76,4)	2/13 (15,3)	
			146	102/146 (69,8)	59/102 (57,8)	4/59 (6,7)	4/146 (2,8)

4.4. Discusión

La distribución actual de *Ae. albopictus* en Argentina se limita a la provincia de Misiones y de Corrientes (Goenaga et al., 2020; Lizuain et al., 2019; Schweigmann et al., 2004; Rossi et al., 1999), en localidades puntuales que fueron nombradas en la introducción de este capítulo. A partir del presente trabajo de tesis se detectó la presencia de *Ae. albopictus* en Montecarlo, siendo este el primer reporte en la localidad. Las densidades de este mosquito en el campo fueron menos abundantes que las de Otras especies.

En este estudio, los parámetros poblacionales presentaron algunas diferencias en comparación con otras poblaciones de *Ae. albopictus* estudiadas en América y Asia (Maimusa et al., 2016; Tsuda et al., 1994; Iv et al., 1989). Para evaluar si estos resultados son consistentes en el tiempo o si fueron un resultado al azar, sería conveniente repetir este ensayo, considerando que se realizó una sola réplica. En la población estudiada se obtuvo una tasa intrínseca de crecimiento poblacional negativa y una tasa de reproducción neta menor a 1. Dado que la supervivencia de larvas a pupas fue alta, esto se puede deber a la baja tasa de eclosión de los huevos. Estos valores indican que la población está en decrecimiento, lo que se puede deber a una baja adaptación del mosquito a las variables ambientales existentes en el área de colonización (Reisen et al., 1979). Si bien la mayor mortalidad de *Ae. albopictus* se da en la etapa de huevo, durante la cual las larvas no emergen (Rozilawati et al., 2017), en otras poblaciones de *Ae. albopictus* se registraron tasas de eclosión más altas, como en la cepa de Nueva Orleans (57%) y en la de Houston (93%) (Iv et al., 1989). Una posible explicación para la baja tasa de eclosión de la población de *Ae. albopictus* de Puerto Iguazú (provincia de Misiones), es el estado de infección con *Wolbachia*: debido a que la bacteria no está fijada en esta población (Capítulo 1), los cruzamientos entre hembras no infectadas y machos con simple o doble infección podrían resultar incompatibles (Werren et al., 2008). Otro factor que podría afectar la tasa de eclosión es la temperatura: se ha observado que a 18-20°C la tasa de eclosión fue del 19% en una cepa de Asia tropical de *Ae. albopictus*, luego de ser sometidos a un tratamiento de frío (Thomas et al., 2012). Además, en

estudios bajo condiciones seminaturales la tasa de eclosión disminuyó de 77% a 54% cuando se redujo la temperatura (Yang et al., 2020).

La longevidad promedio de los adultos fue de 16 días para las hembras y de 10 días para los machos. Si bien una mayor longevidad en hembras coincide con otros estudios (e.g. Rozilawati et al., 2017), los valores promedio encontrados en este estudio en ambos sexos fueron más bajos con respecto a otras poblaciones: en dos cepas de *Ae. albopictus*, una de laboratorio y otra de campo provenientes de Malasia, la longevidad promedio de las hembras se registró en 26 y 33 días, respectivamente, y para machos en 25 y 28 días, respectivamente (Rozilawati et al., 2017). Por otro lado, Hashim et al. (2008), reportaron una longevidad semejante a la hallada en el presente estudio en individuos de la ciudad de Penang, Malasia: para los machos fue de 10,17 días y para las hembras fue de 19,47 días. La longevidad de los adultos puede verse influida por las condiciones de cría, como la temperatura y la humedad, así como también por la nutrición. Si bien este trabajo se realizó bajo condiciones de laboratorio, se simularon las condiciones registradas en el campo. A su vez, la longevidad de las hembras se relaciona con su capacidad como vectores de patógenos. La longevidad promedio de las hembras reportada en este estudio es igual o más corta que el período de incubación extrínseco hallado para los virus Chikungunya (16,5 días) y virus dengue (21 días). Esto hace que sean menos eficientes en la transmisión de estos virus.

La proporción de sexos halladas en este trabajo coincide con el estudio de Yang et al. (2020), quienes realizaron un estudio a semi-campo en Guangzhou, China, durante los meses de agosto a noviembre y reportaron que la proporción de sexos varió de un mes a otro, registrando un valor de 0,71 en agosto (periodo estival del hemisferio norte y que coincide con el momento de la medición hecha en el presente trabajo) y de 1,20 en noviembre.

En el presente trabajo también se estudió la competencia vectorial de esta población de mosquitos para determinar su importancia potencial en la transmisión de dengue y Chikungunya en el área noreste de Argentina. Los resultados obtenidos indicaron que *Ae. albopictus* de la Argentina subtropical es un vector competente pero relativamente ineficiente tanto para el virus Chikungunya como para dengue.

La transmisión de dengue, en particular, fue baja y tardía, con un período de incubación extrínseco de 21 días identificando un único individuo con infección en la saliva. El período de incubación extrínseco extendido y las bajas tasas de transmisión de dengue por *Ae. albopictus* del Parque Nacional Iguazú indica que es poco probable que esta población contribuya significativamente a la propagación de dengue en la región. A pesar de haber mostrado un período de incubación extrínseco más corto y una mayor tasa de diseminación para Chikungunya, la transmisión de este virus también resultó relativamente ineficiente en condiciones experimentales. A nivel de la población, si bien se utilizaron diferentes títulos virales, no se registraron diferencias significativas entre la transmisión de los virus Chikungunya y dengue al observar todos los mosquitos expuestos a la sangre infectada. Estos resultados son similares a los encontrados por Vega-Rúa et al. (2014), y sugieren que existe una barrera a nivel de la glándula salival que disminuye los niveles y la eficiencia de transmisión por esta población de *Ae. albopictus* para ambos arbovirus. Del mismo modo, Mousson et al. (2012) mostraron que la infección natural con *Wolbachia* en *Ae. albopictus* de la isla Reunión limita la diseminación del virus DEN-2 y la infección de las glándulas salivales.

Aunque este capítulo no se trató sobre *Wolbachia*, varios de los resultados hallados, como la ineficiencia en la competencia vectorial de *Ae. albopictus* y la baja tasa de eclosión de los huevos, abren camino a futuras investigaciones partiendo de la hipótesis de que *Wolbachia* podría ser uno, pero no el único, de los factores que está alterando estos parámetros. Para contrastar dicha hipótesis, se debería evaluar la competencia vectorial para estos virus en líneas de *Ae. albopictus* libres de infección con *Wolbachia*. Además, otro punto interesante para estudiar es la competencia vectorial de individuos discriminando el estatus de infección, dado que se encontraron individuos infectados con *wAlbB*, superinfectados y libres de la infección. Este polimorfismo de infección hallado en la población estudiada además podría ocasionar IC que se puede expresar en la baja tasa de eclosión de los huevos.

Conclusiones generales y perspectivas futuras

Como se comentó en esta tesis los arbovirus transmitidos por mosquitos son una de las principales causas de enfermedades humanas a nivel mundial. Actualmente, la bacteria endosimbiótica *Wolbachia*, se ha propuesto como una estrategia eficaz para el control biológico de mosquitos vectores. Los antecedentes de la infección con esta bacteria en poblaciones de mosquitos de Argentina son escasos y se centran, principalmente, en especies del complejo *Cx. pipiens*.

En este estudio se aportó información sobre las cepas de *Wolbachia* presentes en poblaciones naturales de mosquitos de la provincia de Buenos Aires y Misiones, detectándose la presencia de cuatro cepas. A fin de acrecentar el conocimiento de la biología de las cepas que se encuentran en Argentina, se estudiaron algunos factores que podrían afectar la densidad de *Wolbachia*, por ser esta una variable de suma importancia en la manifestación de los fenotipos inducidos por esta bacteria en sus hospedadores. Así, se comprendió que longevidad no causó efectos significativos en los machos. Por otro lado, se obtuvieron diferencias significativas de la densidad bacteriana de acuerdo a la localización de *Wolbachia*.

En cuanto al estudio de la relación entre la temperatura y la prevalencia de infección con *Wolbachia* en las especies estudiadas, se comprobó la independencia de la primera con respecto a la segunda.

Los resultados abren interrogantes para investigaciones futuras que se enumeran a continuación:

- El polimorfismo de infección hallado en *Ae. albopictus* deja planteada la posibilidad de IC en la población estudiada. Sería interesante explorar los cruzamientos entre machos superinfectados y hembras infectadas con la cepa *wAlbB* y de esta manera medir los niveles de penetrancia de IC.
- Considerando que los genes del MLST tipificados no presentan diferencias entre las cepas *wPip*, la profundización de este estudio con marcadores de evolución rápida como los genes *ank2* y *pk1*, es otro punto pertinente teniendo en cuenta que éste es el primer reporte de esta cepa en individuos híbridos del complejo *Cx. pipiens* de Argentina.

- Investigar la presencia de *Wolbachia* en mosquitos de género *Anopheles* en Argentina, otro vector de importancia sanitaria responsable de paludismo, el cual cuenta con reportes recientes de infección con *Wolbachia* en otros países.
- Considerando que la ausencia de infección con *Wolbachia* en *Ae. albifasciatus* se podría relacionar con la microbiota asociada en este mosquito, resultaría interesante realizar un estudio sobre sus comunidades bacterianas con el objetivo de detectar una posible barrera que inhiba la infección.
- Sería interesante evaluar el uso de las cepas halladas en este estudio para el posible desarrollo de herramientas locales de biocontrol, generando líneas de *Ae. aegypti* transinfectados capaces de bloquear la transmisión de dengue y otros arbovirus.
- Continuar la búsqueda de un método de extracción de ADN que arroje un mejor rendimiento en los ensayos de PCR en tiempo real.
- Evaluar si existe una variación entre la densidad de *Wolbachia* luego de alimentación sanguínea en las hembras de mosquitos.
- Profundizar sobre cuáles son los tejidos del soma que se hallan infectados, lo cual podría aportar información sobre la posible interferencia en la transmisión de arbovirus.
- Ahondar sobre la posible variación en la densidad bacteriana según la temperatura en individuos adultos.
- Realizar ensayos donde los individuos se puedan someter a un estrés de calor controlado y prolongado para estudiar si la duración de la exposición puede tener algún efecto en la densidad y la frecuencia de *Wolbachia* en sus hospedadores.
- Estudiar el efecto del estrés térmico durante el desarrollo larval en el estado adulto.
- Por otro lado, evaluar en las especies de mosquitos en las que se halló la infección con *Wolbachia*, si su presencia puede influir en la competencia vectorial en la transmisión de los virus de importancia sanitaria. Para esto es necesario obtener líneas aposimbióticas de mosquitos, e.g. curadas de la infección de la bacteria con un antibiótico como la tetraciclina o la rifampicina.

ANEXOS

ANEXO A

En la tabla A-A1 se detallan los datos de las secuencias utilizadas en el análisis filogenético de las cepas halladas en el capítulo 1 en el apartado 1.2.6. *Identificación de cepas de Wolbachia y análisis filogenético.*

Tabla A-A1. Detalles taxonómicos de las cepas de *Wolbachia* utilizadas para la caracterización filogenética de los aislamientos recuperados de tres especies de mosquitos. Se consignan el supergrupo, la especie hospedadora y el identificador de las 52 cepas extraídas de la base de datos de *Wolbachia* (<http://pubmlst.org/wolbachia>).

Nombre de la cepa	Supergrupo	ID	Nombre del hospedador
Aalb_A	A	12	<i>Aedes albopictus</i>
Dmel_A_wMel	A	1	<i>Drosophila melanogaster</i>
Sinv_A	A	2	<i>Solenopsis invicta</i>
Cpen_A	A	4	<i>Camponotus pennsylvanicus</i>
Nlon_A_2.1	A	16	<i>Nasonia longicornis</i>
Aape_A_CDP21	A	68	<i>Agelenopsis aperta</i>
wCer1_A	A	55	<i>Rhagoletis Cerasi</i>
wAlu	A	96	<i>Aganaspisa lujai</i>
Pmin_A	A	117	<i>Pheidole minutula</i>
Cleo_A	A	120	<i>Camponotus leonardi</i>
Epa_A	A	142	<i>Evagetes parvus</i>
Apen_A_CBP29	A	180	<i>Agelenopsis pennsylvaniCa</i>
Gbre_A_09.7G	A	350	<i>Glossina brevipalpis</i>
Ddel_A	A	1678	<i>Diplazondeletus</i>
Sasp_A	A	1682	<i>Syrphophilus asperatus</i>
Abro_A	A	496	<i>Aedes bromeliae</i>
Amet_A	A	497	<i>Aedes metallicus</i>
Cpip_B	B	29	<i>Culex pipiens</i>
wPip	B	1808	<i>Culex quinquefasciatus</i>
CAIT_B	B	19	<i>Chelymorpha alternans</i>
TTAi_B	B	25	<i>Teleogryllus taiwanemma</i>
Nvit_B_4.9	B	34	<i>Nasonia vitripennis</i>
Pdom_B_JKS1	B	69	<i>Polistes dominulus</i>
Dinn_B	B	87	<i>Drosophila innubila</i>
Avul_B	B	28	<i>Armadillidium vulgare</i>
Amir_B	B	128	<i>Azanusmirza</i> sp.
Sepi_B	B	102	<i>Spalgisepius</i> sp.
Cner_B_wNer	B	212	<i>Cepora nerissa</i>
Ehec_B_wHec	B	219	<i>Eurema hecabe</i>
Tbet_B	B	473	<i>Thecla beTulea</i>
Deur_B_wEur	B	1595	<i>Dictyophara europaea</i>

<i>Pica_B</i>	B	471	<i>Polyommatus icarus</i>
<i>Mafr_B</i>	B	499	<i>Mansonia africana</i>
<i>OCer_C_OC1</i>	C	505	<i>Onchocerca cervipedis</i>
<i>Osp_C_347</i>	C	506	<i>Onchocerca</i> sp.
<i>BmAl_D</i>	D	37	<i>Brugia malayi</i>
<i>Clec_F</i>	F	36	<i>Cimex lectularius</i>
<i>Ogra_F_100840</i>	F	42	<i>Opisththalmus granifrons</i>
<i>Ocap_F_100812</i>	F	43	<i>Opisththalmus capensis</i>
<i>Olat_F_100860</i>	F	44	<i>Opisththalmus latimanus</i>
<i>Apal_F_Panbci</i>	F	164	<i>Apoica pallens</i>
<i>Plon_F_WolPIF</i>	F	1828	<i>Paratrechina longicornis</i>
<i>Ohor_F_t21</i>	F	253	<i>Odontotermes horni</i>
<i>Dtri_F_Odo1</i>	F	358	<i>Diplacodes trivialis</i>
<i>Agut_F_Odo2</i>	F	359	<i>Anax guttatus</i>
<i>Bcon_F_Odo3</i>	F	360	<i>Brachythemis Contaminata</i>
<i>Pfla_F_Odo4</i>	F	361	<i>Pantala flavescens</i>
<i>Tpal_F_Odo5</i>	F	362	<i>Trithemis pallidinervis</i>
<i>Dtri_F_Odo9</i>	F	368	<i>Diplacodes Trivialis</i>
<i>Ntul_F_Odo11</i>	F	370	<i>Neurothemis tullia</i>
<i>Irap_F_Odo21</i>	F	381	<i>Ictinogomphus rapax</i>
<i>Zang_H</i>	H	207	<i>Zootermes angusticollis</i>

ANEXO B

En la Figura A-B1 se observa la amplificación de las muestras utilizadas para la identificación del complejo *Cx. pipiens* en la zanja de La Plata. Se observa un patrón de bandeo inespecífico.

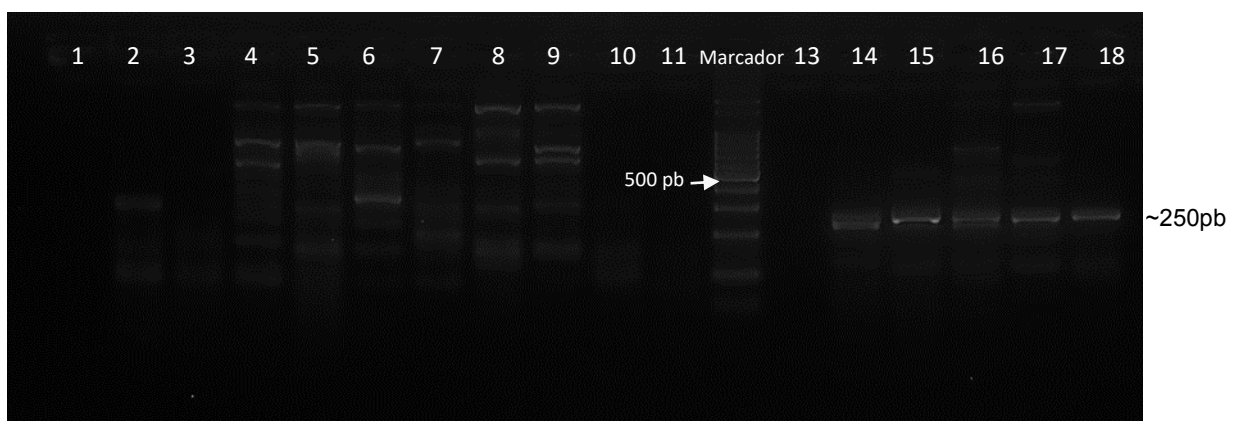


Figura A-B1. Identificación de los ecotipos de *Cx. pipiens* en individuos de la zanja de La Plata. Calles 1-11: identificación el ecotipo *pipiens*, calle 12: marcador de peso molecular (100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos, Bs. As.) y calles 13-18: identificación el ecotipo *molestus*. Las calles 1 y 13 corresponden a los controles negativos de las PCR.

- ✚ Si bien se observa un patrón de bandeo inespecífico en el gel, las muestras 14-18 presentan una banda a la altura ~250pb que indica la presencia del ecotipo molestus. Sin embargo, en las muestras 2-11 el bandeo inespecífico no permite descartar con certeza ni la ausencia ni la presencia del ecotipo pipiens, ya que no se identifica una banda definida a la altura de 190-200pb.

En los siguientes ANEXOS (C a H) se detallan los ensayos de puesta a punto de la PCR en tiempo real del Capítulo 2.

ANEXO C

Ensayos para evaluar la eficiencia de los cebadores ActAlb_dir y ActAlb_rev (Raquin et al., 2015), utilizados en la amplificación del gen actina; GF-BR, utilizados en la amplificación del gen *wsp* de la cepa wAlbB, y AR-BR, utilizados en la amplificación del gen *wsp* de la cepa wAlbA (Ahantarig et al., 2008).

Nota: en la tipografía **negrita** se resalta la variable que se fue modificando en los diferentes ensayos.

Ensayo 1: Curva de calibración estándar para la detección por PCR en tiempo real de diluciones seriadas del gen actina utilizando los cebadores ActAlb_dir y ActAlb_rev.

Reacción de amplificación en un volumen final de 20 µl: 10 µl de Sybr Green (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), 8,6 µl de agua libre de DNAsas, **0,2 µl de cada cebador (5 µM)** (Macrogen Inc., Corea) y 1 µl de ADN Molde o agua libre de DNAsas para el control negativo.

Diluciones seriadas (1/10) partiendo de una concentración de ADN inicial de 40 ng/µl, se corrieron cuatro puntos en total: 40 ng/µl -4 ng/µl -0,4 ng/µl -0,04 ng/µl.

Condiciones de ciclado: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C.

En la Figura A-C1 se detallan los gráficos de la curva de fusión y de amplificación. En Figura A-C2 se representa el gráfico de la curva estándar, la pendiente de la recta es -2,3374, lo que indica una eficiencia de los cebadores de 167,81%.

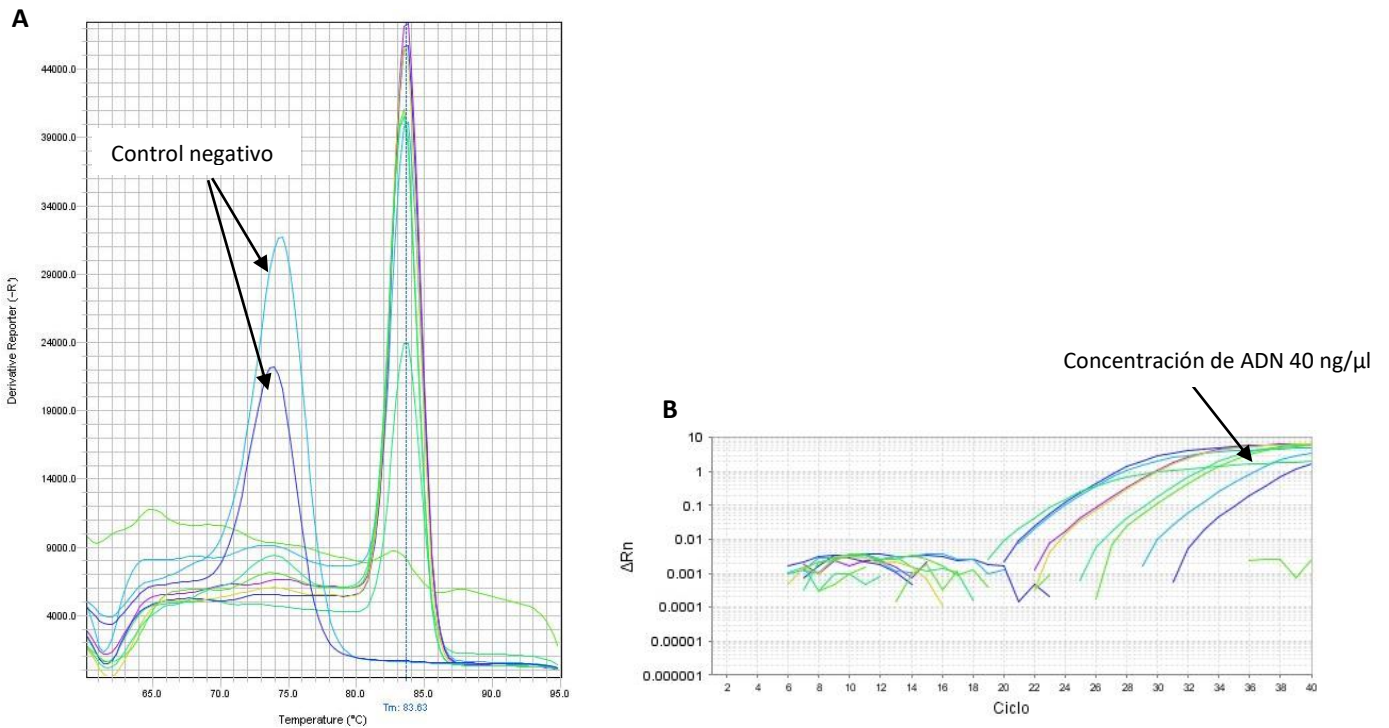


Figura A-C1. Curva de fusión **(A)** y gráfico de amplificación **(B)** del gen actina con los cebadores ActAlb_dir y ActAlb_rev, para verificar la especificidad de la reacción y la amplificación exitosa, respectivamente.

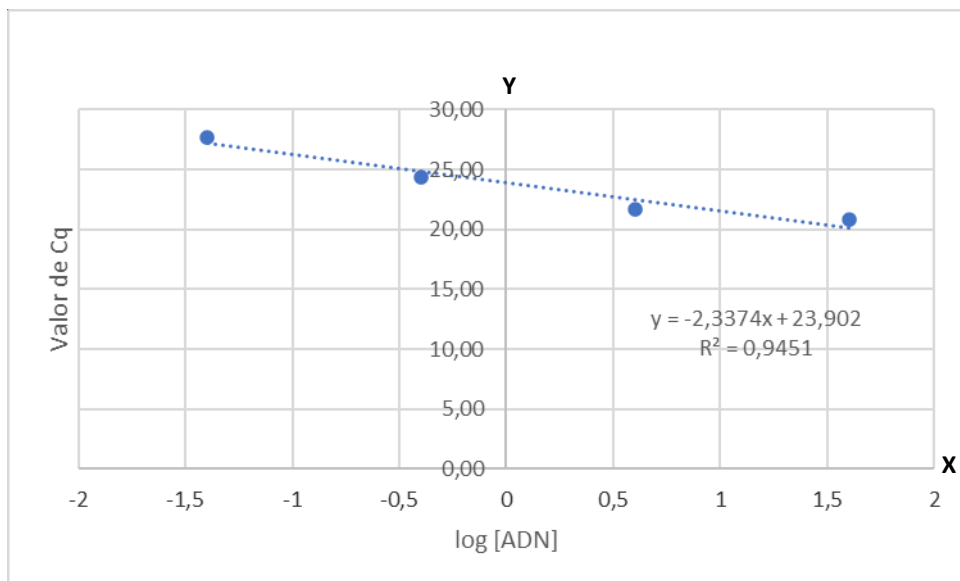


Figura A-C2. Curva de calibración estándar para la detección por PCR en tiempo real de diluciones seriadas del gen actina usando Sybr Green (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). El eje X representa las copias del gen de interés y el eje Y representa el ciclo de cuantificación (Cq).

Ensayo 2: Se repitió el ensayo 1 cambiando las concentraciones de los cebadores.

Reacción de amplificación en un volumen final de 20 μl : 10 μl de Sybr Green (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), 8,2 μl de agua libre de DNAsas, **0,4 μl de cada cebador (5 μM)** (Macrogen Inc., Corea) y 1 μl de ADN Molde o agua libre de DNAsas para el control negativo.

Diluciones seriadas (1/10) de ADN: 40 $\text{ng}/\mu\text{l}$ - 4 $\text{ng}/\mu\text{l}$ - 0,4 $\text{ng}/\mu\text{l}$ - 0,04 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Condiciones de ciclado: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C.

En la Figura A-C3 se detallan los gráficos de la curva de fusión y de amplificación. En la Figura A-C4 se representa el gráfico de la curva estándar. La pendiente de la recta es -2,2194, lo que indica una eficiencia de los cebadores de 182,21%.

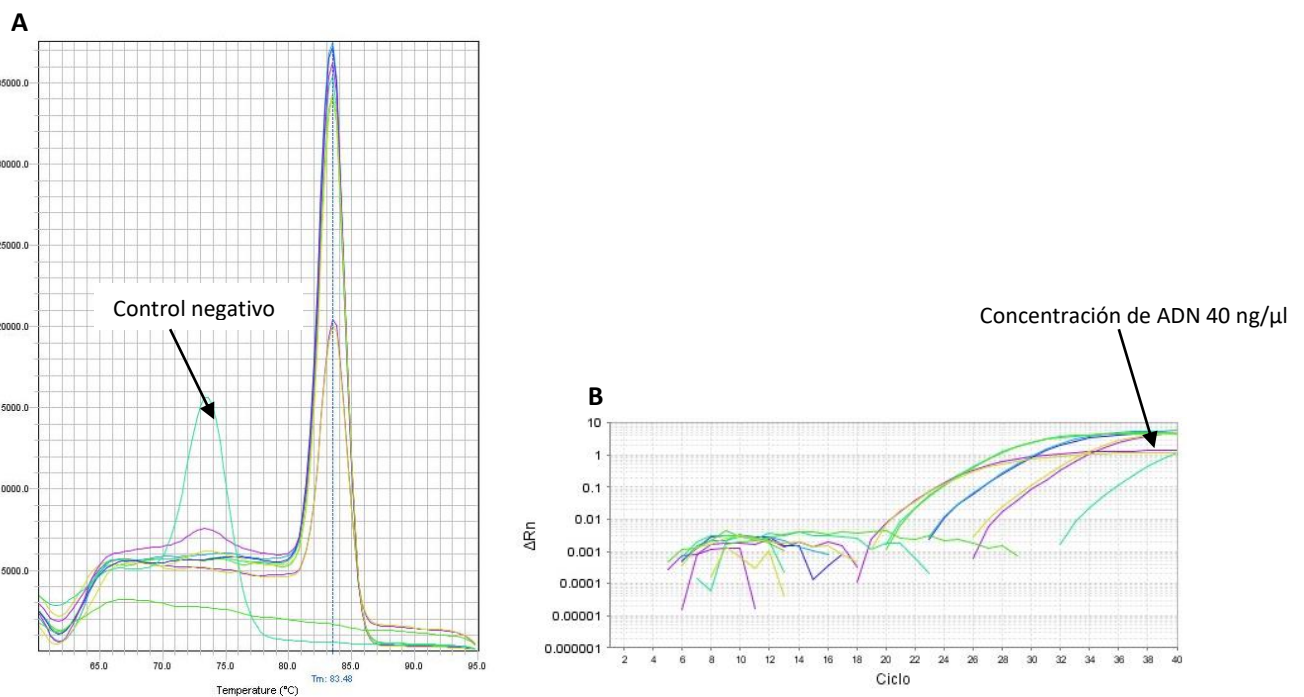


Figura A-C3. Curva de fusión **(A)** y gráfico de amplificación **(B)** del gen actina con los cebadores ActAlb_dir y ActAlb_rev para verificar la especificidad de la reacción y la amplificación exitosa.

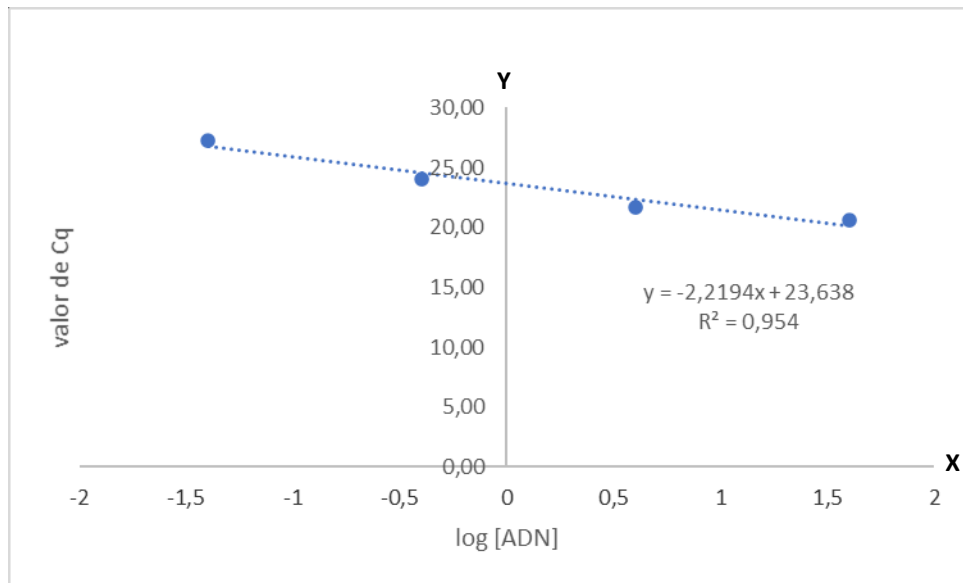


Figura A-C4. Curva de calibración estándar para la detección por PCR en tiempo real de diluciones seriadas del gen actina usando Sybr Green (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). El eje X representa las copias del gen de interés y el eje Y representa el ciclo de cuantificación (Cq).

✚ Tanto en el Ensayo 1 como en el ensayo 2, los cuales se diferencian únicamente en la concentración de los cebadores, siendo menor la concentración en el ensayo 1, se observa una clara amplificación de los controles negativos, lo que puede estar indicando la formación de estructuras secundarias (como homodímeros o heterodímeros de cebadores). Además en ambos gráficos de amplificación se ve que a una concentración de ADN de 40 ng/μl la curva satura a una altura más baja que los demás puntos amplificados y entre la concentración de 40 ng/μl y 4 ng/μl se observa que los Cq están muy próximos (e.g. existe un valor de Cq que diferencia a ambos puntos mientras que los demás puntos se diferencian en tres valores de Cq). Esto hace que se pierda la linealidad de la recta y puede estar indicando que algún artefacto está interviniendo en la fluorescencia. Dado que en la composición de la muestra lo que cambia es la concentración del ADN, se puede suponer que dicho artefacto es algún componente remanente del método de extracción del ADN. A partir de la pendiente de la recta, el cálculo de la eficiencia dio un valor de 167,81% para el ensayo 1 y de 182,21% para el ensayo 2. Estos valores se hallan muy alejados de la eficiencia aceptable, que va de 90 a 110%.

Ensayo 3: Amplificación de gen actina con los cebadores ActAlb_dir y ActAlb_rev para tres concentraciones de ADN diferentes.

Reacción de amplificación en un volumen final de 20 μl : 10 μl de Sybr Green (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), 7,8 μl de agua libre de DNAsas, **0,6 μl de cada cebador (5 μM)** (Macrogen Inc., Corea) y 1 μl de ADN Molde o agua libre de DNAsas para el control negativo.

Se probaron tres concentraciones de ADN: 25 ng/ μl - 50 ng/ μl - 100 ng/ μl .

Condiciones de ciclado: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C.

En la Figura A-C5 se detallan las curvas de fusión y de amplificación.

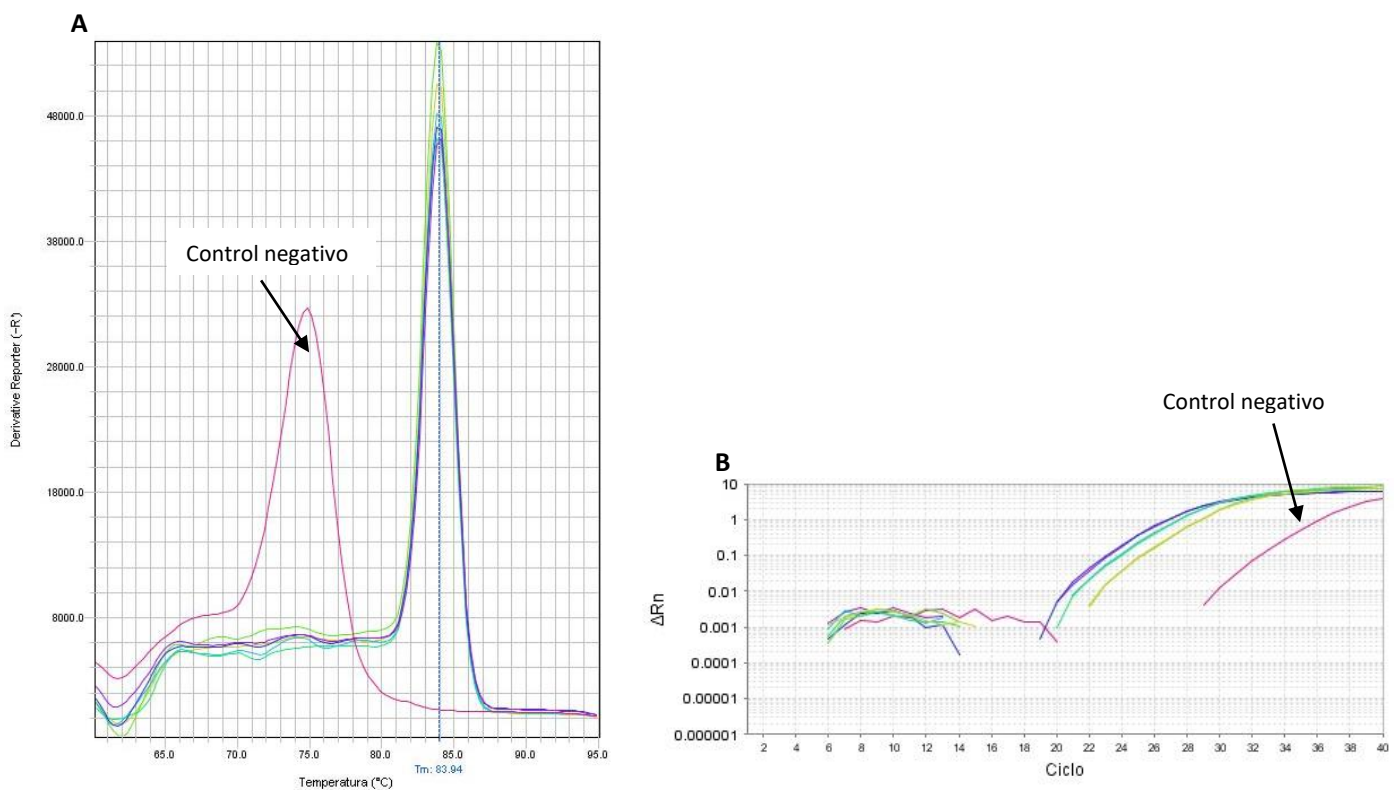


Figura A-C5. Curva de fusión **(A)** y gráfico de amplificación **(B)** del gen actina con los cebadores ActAlb_dir y ActAlb_rev, para verificar la especificidad de la reacción y la amplificación exitosa, respectivamente.

Este ensayo fue a modo de prueba y se corrió un solo control negativo, el cual amplificó a una temperatura de fusión diferente de la del gen actina, por lo que se tuvo que descartar.

Ensayo 4: Amplificación del gen *wsp* de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* utilizando los cebadores AR-GF y BR-GF, respectivamente.

Reacción de amplificación en un volumen final de 20 μ l: 10 μ l de Sybr Green (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), 8,2 μ l de agua libre de DNAsas, **0,4 μ l de cada cebador (5 μ M)** (Macrogen Inc., Corea) y 1 μ l de ADN Molde o agua libre de DNAsas para el control negativo.

Los cebadores fueron probados con una concentración de ADN 40 ng/ μ l.

Condiciones de ciclado: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C.

En la Figura A-C6 se muestran las curvas de fusión y de amplificación de los cebadores.

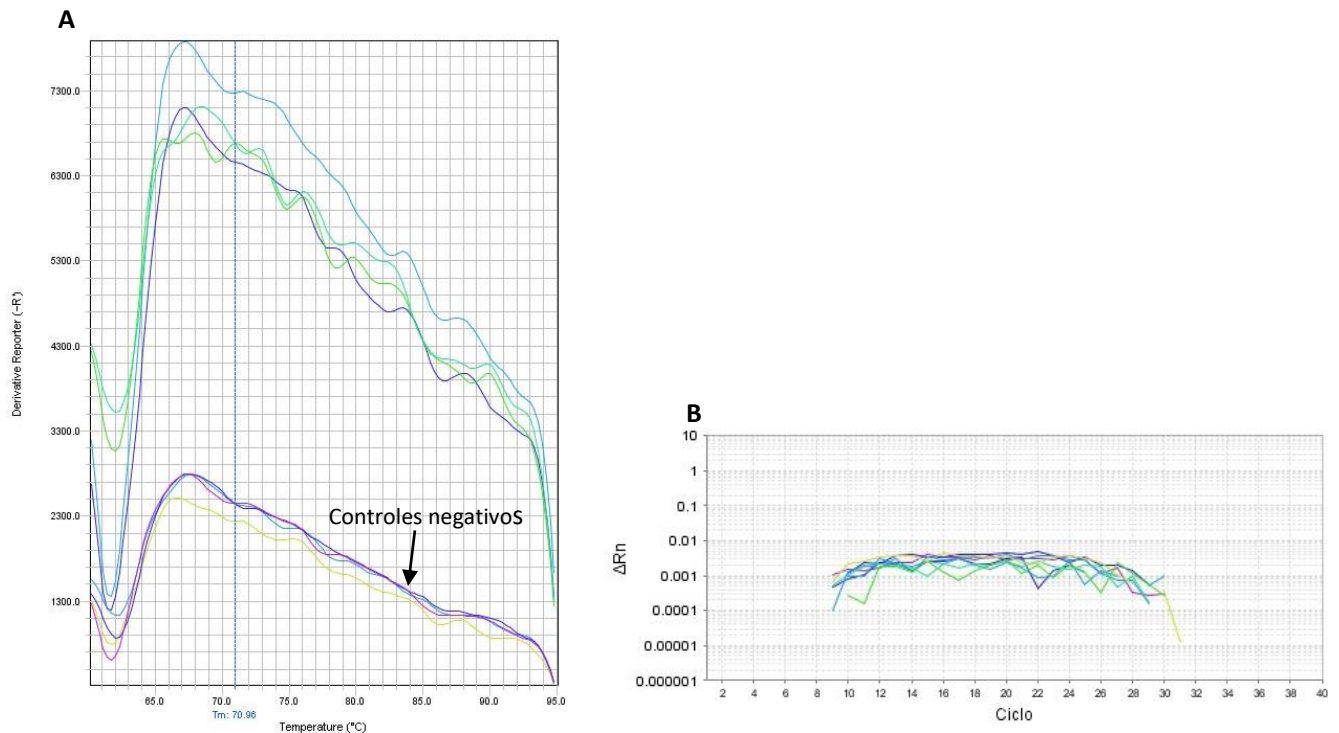


Figura A-C6. Curva de fusión (**A**) y gráfico de amplificación (**B**) para los cebadores AR-GF, que amplifican la cepa *wAlbA*, y BR-GF, que amplifican la cepa *wAlbB*.

Este ensayo fue descartado ya que no hubo amplificación de ninguno de los genes estudiados.

Ensayo 5: Amplificación del gen *wsp* los de la cepa *wAlbA* de *Wolbachia* utilizando dos concentraciones de los cebadores AR-GF.

Reacción de amplificación en un volumen final de 20 μl : 10 μl de Sybr Green (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), 8,2 μl o 7,8 μl de agua libre de DNAsas, **0,4 μl o 0,6 μl de cada cebador (5 μM)** (Macrogen Inc., Corea) y 1 μl de ADN Molde o agua libre de DNAsas para el control negativo.

La muestra fue corrida con una concentración de ADN 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

En la Figura A-C7 se muestran las curvas de fusión y de amplificación de los cebadores AR-GR y en la Tabla A-C1 se detallan los valores de Cqs obtenidos.

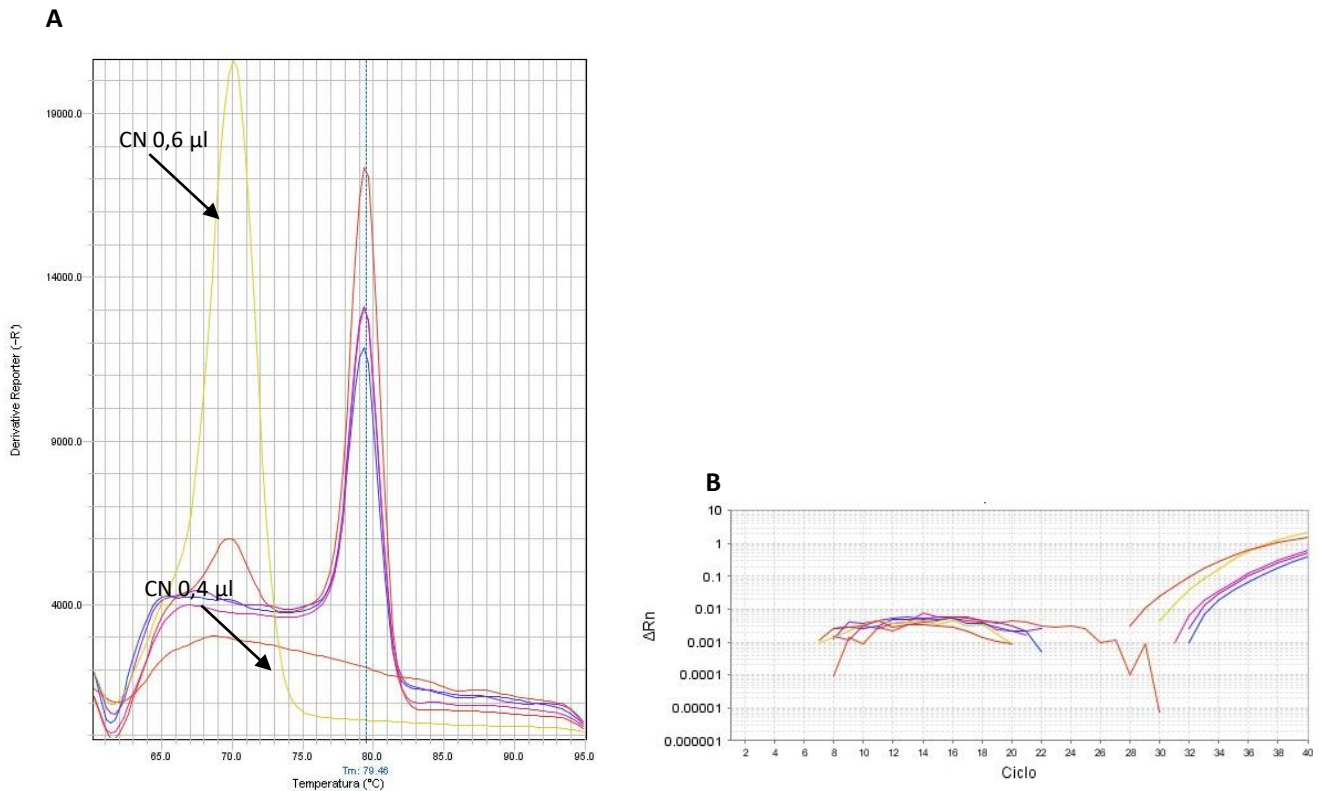


Figura A-C7. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) obtenidos con los cebadores AR-GF, que amplifica la cepa wAlbA.

Tabla A-C1. Valores de Cqs del gen *wsp* de la cepa wAlbA para dos concentraciones de los cebadores.

[ADN] $\text{ng}/\mu\text{l}$	μl Cebador	Cq Mean	Cq Threshold
100	0,4	36,37	0,11
100	0,6	32,23	0,11

- En este ensayo se evaluaron dos concentraciones de cebadores que amplifican el gen *wsp* de la cepa wAlbA. Se observa que los controles negativos amplifican a ambas concentraciones; incluso en el gráfico de amplificación no se logra

diferenciar dicho producto de las muestras corridas mostrando valores de Cqs muy similares.

- Los cebadores probados en los ensayos 1 a 5 ActAlb_dir-ActAlb_rev, AR-GF, BR-GF que amplifican los genes actina, *wsp* de la cepa *wAlbA* y *wAlbB*, respectivamente fueron descartados.

ANEXO D

Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa *wAlbB* en función de la edad de los machos.

Ensayo 1: Amplificación del gen *wsp* de la cepa *wAlbB* de *Wolbachia* utilizando los cebadores *wspAlbB_F* y *wspAlbB_R* con una concentración de **ADN 5 ng/μl**. Muestras 1 - 10.

La reacción de amplificación y condiciones de ciclado fueron misma que se detallaron en el apartado 2.2.5.4. *Curva estándar*.

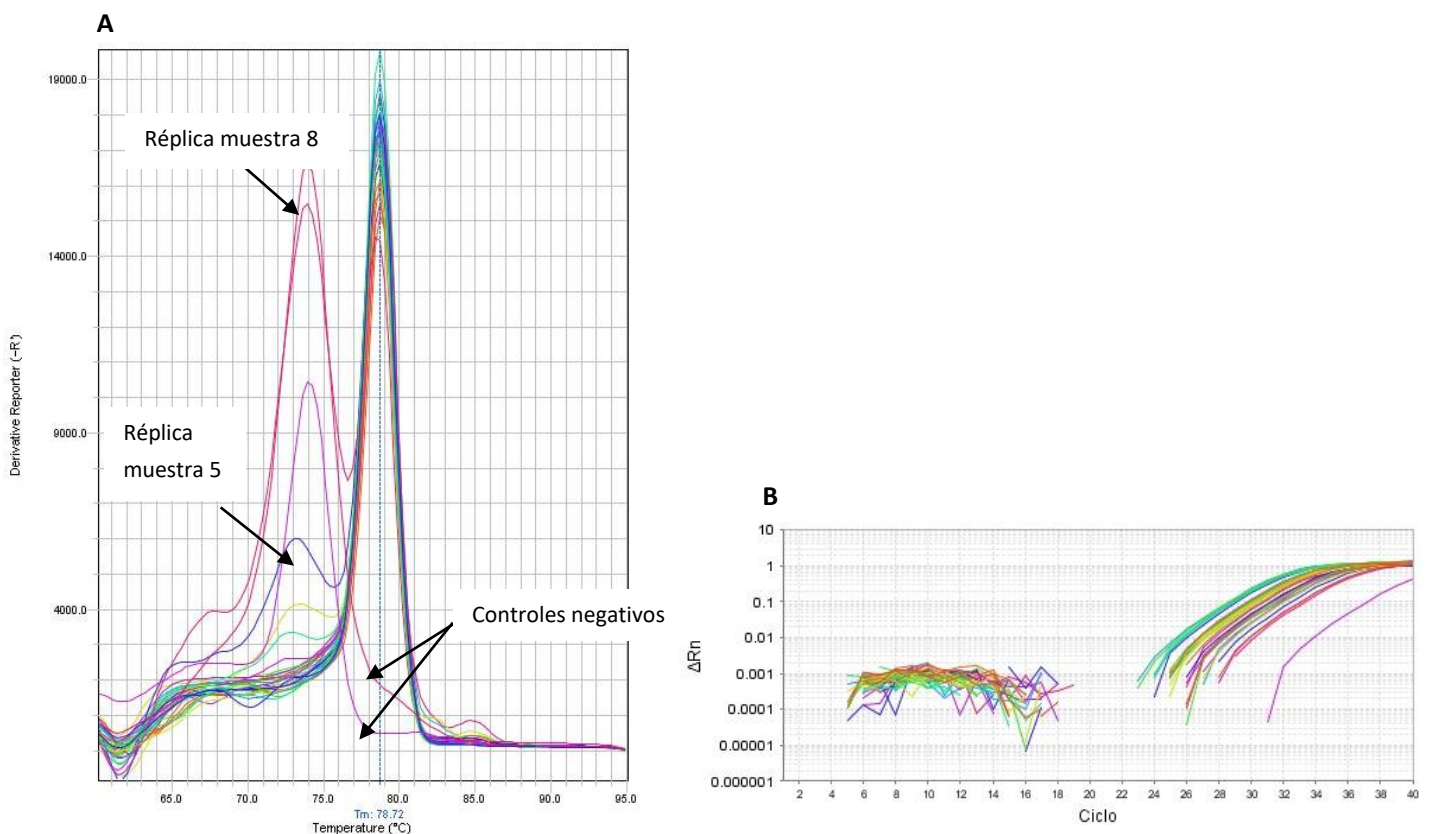


Figura A-D8. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) del gen *wsp* de la cepa *wAlbB* de las muestras 1-10 del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa *wAlbB* en función de la edad de los machos.

Tabla A-D2. Valores de Cq's de las muestras 1-10 del la PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa wAlbB en función de la edad de los machos. Las muestras 1 a 5 corresponden al tiempo 0 (T0) y las muestras 6 a 10 al tiempo 1 (T1).

Muestra	Ct	Ct Threshold
1	28,66	0,013
2	27,15	0,013
3	30,29	0,013
4	27,23	0,013
5	29,12	0,013
6	27,06	0,013
7	25,83	0,013
8	28,47	0,013
9	27,53	0,013
10	26,18	0,013

En la curva de fusión del gen *wsp* de la cepa wAlbB se observan algunas amplificaciones inespecíficas tanto de los controles negativos como de algunas réplicas técnicas de algunas muestras. En esta oportunidad este ensayo se repitió agregando mayor cantidad de ADN (ver en Metodología 3.2.4.7. *Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa wAlbB en función de la longevidad de los machos*), debido a que varios valores de Cq's obtenidos se encontraban por fuera de la curva estándar de los cebadores utilizados.

ANEXO E

Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa wAlbA en función de la edad de los machos.

Ensayo 1: Amplificación del gen *wsp* de la cepa wAlbA de *Wolbachia* empleando los cebadores *wspAlbA_F* y *wspAlb_R* con una concentración de **ADN 5 ng/μl**. Muestras 1 - 10.

La reacción de amplificación y condiciones de ciclado fueron misma que se detallaron en el apartado 2.2.5.4. *Curva estándar*.

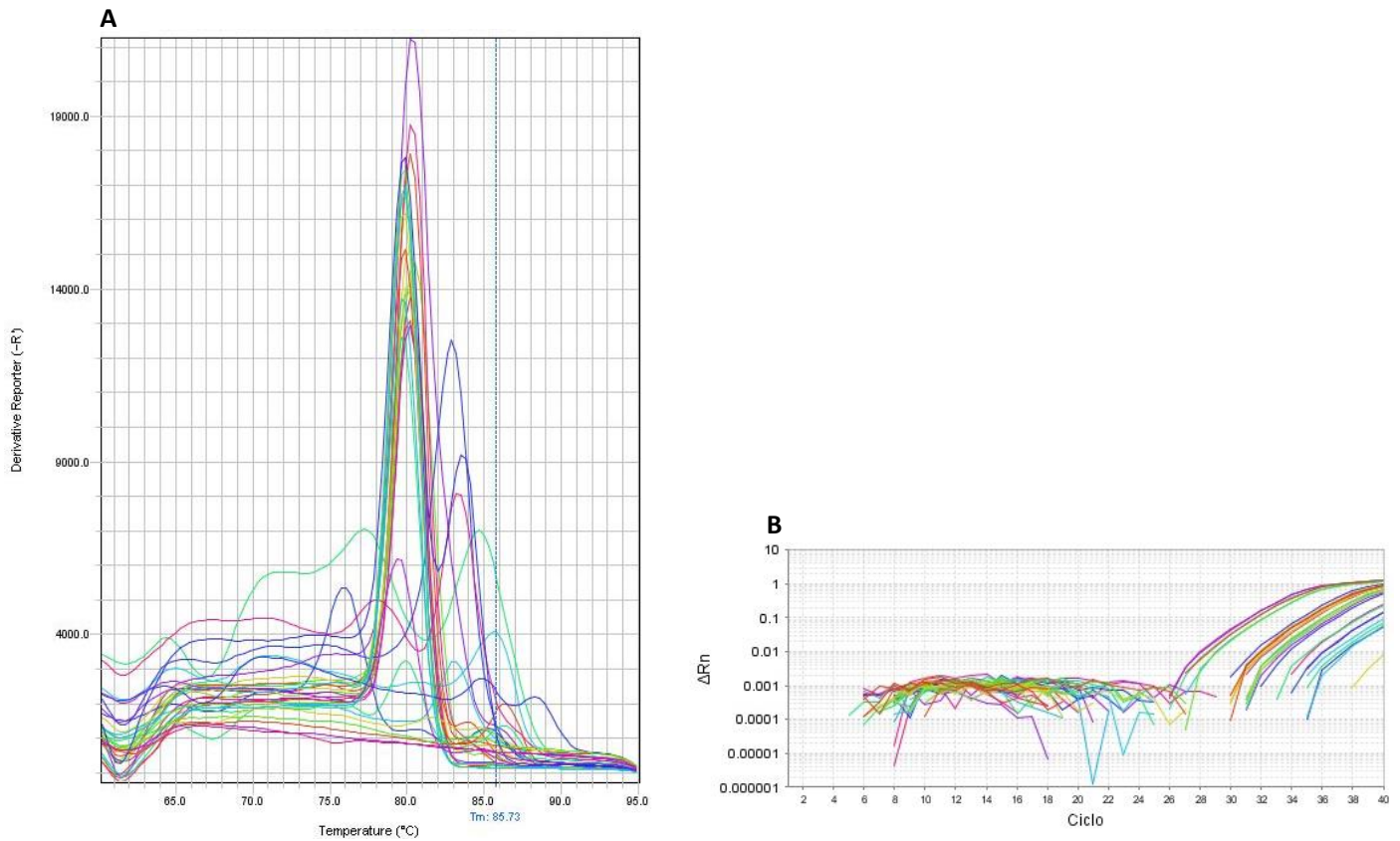


Figura A-E9. Curva de fusión **(A)** y gráfico de amplificación **(B)** del gen *wsp* de la cepa *wAlbA* de las muestras 1-10 del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa *wAlbA* en función de la edad de los machos.

Tabla A-E3. Valores de Cq de las muestras 1-10 del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa *wAlbA* en función de la edad de los machos. Las muestras 1 a 5 corresponden al tiempo 0 (T0) y las muestras 6 a 10 al tiempo 1 (T1).

Muestra	Cq	Cq Threshold
1	32,50	0,013
2	36,37	0,013
3	28,46	0,013
4	33,43	0,013
5	34,01	0,013
6	32,28	0,013
7	29,44	0,013
8	36,65	0,013
9	No amplificó	0,013
10	33,49	0,013

Este ensayo fue descartado debido a las amplificaciones inespecíficas que se observan en el gráfico de la curva de fusión del gen *wsp* de la cepa *wAlbA*.

Ensayo 2: Amplificación del gen *wsp* de la cepa *wAlbA* de *Wolbachia* empleando los cebadores *wspAlbA_F* y *wspAlb_R* con una concentración de ADN 500 ng/μl. Muestra 1, 2, 6 y 7.

La reacción de amplificación fue la misma que en el ensayo 1.

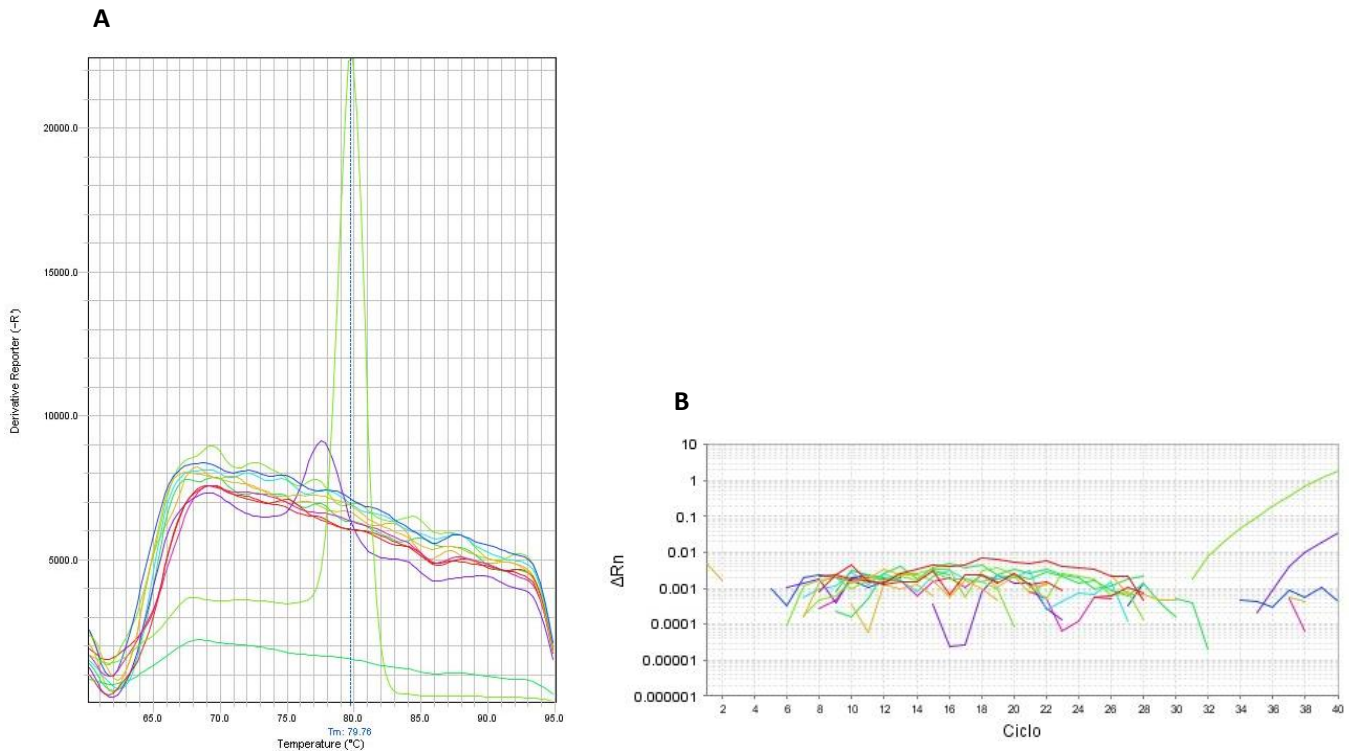


Figura A-E10. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) del gen *wsp* de la cepa *wAlbA* de las muestras 1, 2, 6 y 7 del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa *wAlbA* en función de la edad de los machos.

Tabla A-E4. Valores Cq de las muestras 1, 2, 6 y 7 del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa *wAlbB* en función de la edad de los machos. Las muestras 1 y 5 corresponden al tiempo 0 (T0) y las muestras 6 y 7 al tiempo 1 (T1).

Muestra	Cq	Cq Threshold
1	No amplificó	0,026
2	No amplificó	0,026
6	39,41	0,026
7	No amplificó	0,026

Tomando como referencia los valores obtenidos en el ensayo 1 del ANEXO C, se decidió realizar un nuevo ensayo con una concentración de ADN mayor, en este ensayo los valores de Cq indican que no hubo amplificación del gen *wsp*. Esto puede deberse a una inhibición de la PCR debido a la gran cantidad de ADN utilizado.

Ensayo 3: Amplificación del gen *wsp* de la cepa *wAlbA* de *Wolbachia* con los cebadores *wspAlbA_F* y *wspAlb_R* con una concentración de **ADN 100 ng/μl**. Muestras 1 - 15.

La reacción de amplificación y condiciones de ciclado fueron las mismas que se detallaron en el apartado 2.2.5.4. *Curva estándar*.

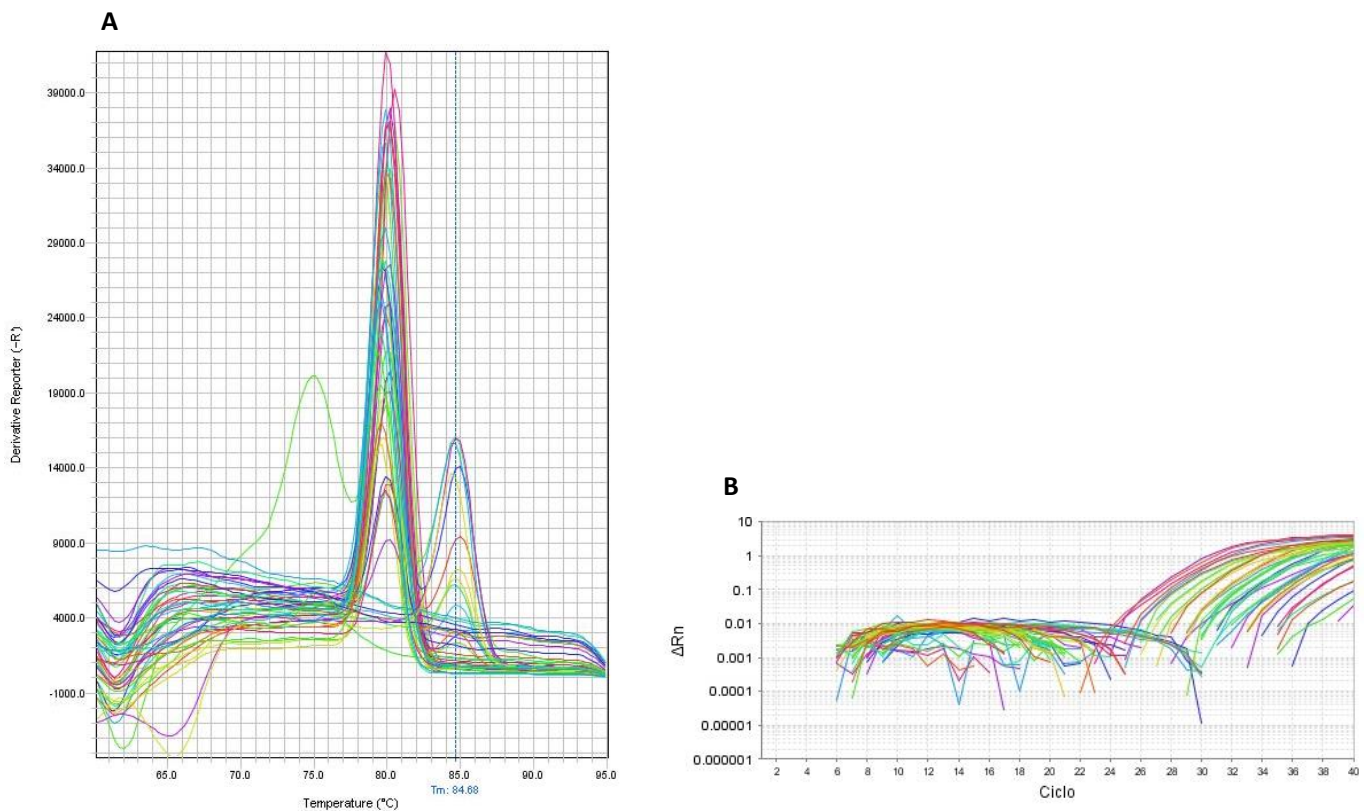


Figura A-E11. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) del gen *wsp* de la cepa *wAlbA* de las muestras 1-15 del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa *wAlbA* en función de la edad de los machos.

Tabla A-E5. Valores de Cq de las muestras 1-10 del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la cepa wAlbA en función de la edad de los machos. Las muestras 1 a 5 corresponden al T0, las muestras 6 a 10 al T1 y las muestras 11 a 15 al T2. CN=control negativo.

Muestra	Cq Mean	Cq Threshold
1	29,77	0,022
2	35,87	0,022
3	26,94	0,022
4	31,43	0,022
5	33,56	0,022
6	32,71	0,022
7	27,84	0,022
8	36,80	0,022
9	33,77	0,022
10	35,39	0,022
11	28,52	0,022
12	33,41	0,022
13	34,23	0,022
14	35,54	0,022
15	30,84	0,022
CN	36,14	0,022

Este ensayo fue desestimado debido a la amplificación inespecífica que se visualizó a través de la curva de fusión del gen *wsp* de la cepa wAlbA.

Finalmente, no se logró la amplificación del gen *wsp* de la cepa wAlbA en el ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de su densidad bacteriana en función de la edad de los machos.

ANEXO F

Ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de las cepas wAlbA y wAlbB en función de la longevidad de las hembras.

La amplificación del gen *wsp* de las cepas de *Wolbachia* se realizó con los cebadores *wspAlbA_F* y *wspAlb_R*, y *wspAlbB_F* y *wspAlb_R* y la amplificación del gen control actina con los cebadores *Act_F* y *R*.

Primero se construyó la curva estándar para obtener la eficiencia de los cebadores. Se realizó un *pool* con todas las muestras incógnita y se hicieron diluciones seriadas al ¼ empezando con una concentración de ADN de 200 ng/μl. La recta consistió en 5 puntos: 200 ng/μl, 50 ng/μl, 12,5 ng/μl, 3,12 ng/μl y 0,78 ng/μl.

Como se observa en la Tabla A-F6 los valores de Cq de las concentraciones de ADN de 200 ng/ μ l y 50 ng/ μ l prácticamente no muestran diferencias en su valor para los genes actina y *wsp* de la cepa wAlbA, y para el gen *wsp* de la cepa wAlbB el valor de Cq de la concentración de 200 ng/ μ l es igual a la concentración de 12,5 ng/ μ l. Esto hace que en el gráfico de la recta se pierda la linealidad y se vea afectada la eficiencia de los cebadores. Por esta razón el punto de 200 ng/ μ l fue descartado y las rectas obtenidas se muestran en la Figura A-F12.

Tabla A-F6. Valores de Cq de la recta de los genes de actina y *wsp* de las cepas wAlbA y wAlbB del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de la *Wolbachia* en función de la longevidad de las hembras.

[ADN]	Cq Actina	Cq wAlbA	Cq wAlbB
200	20,26	22,60	24,04
50	20,55	22,90	22,61
12,5	22,25	24,87	24,51
3,12	24,38	26,54	26,32
0,78	26,33	29,43	28,35

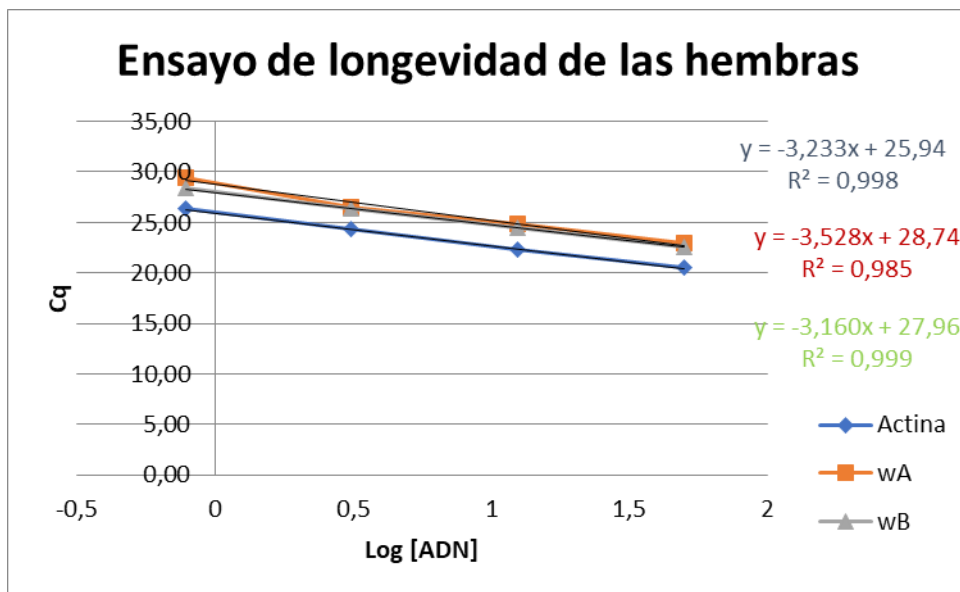


Figura A-F12. Curva estándar de los genes actina y *wsp* de la cepa wAlbA (wA) y wAlbB (wB) del ensayo PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de las cepas wAlbA y wAlbB en función de la longevidad de las hembras.

A continuación, se muestran los gráficos de amplificación y las curvas de fusión de todas las muestras corridas en el ensayo de longevidad de las hembras y la tabla con los Cqs de los

genes estudiados. Todas las muestras fueron amplificadas con una concentración de ADN 5 ng/ μ l.

La reacción de amplificación y condiciones de ciclado fueron misma que se detallaron en el apartado 2.2.5.4. *Curva estándar*.

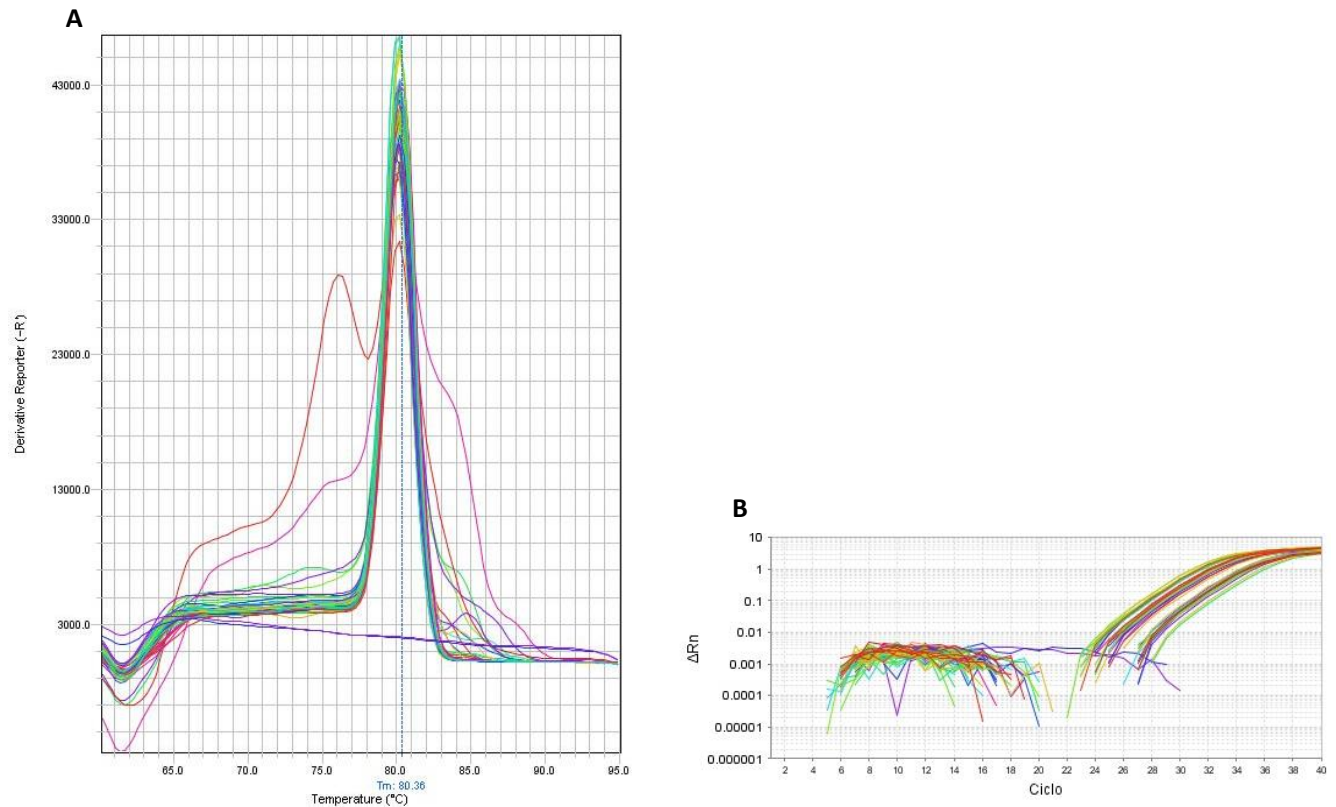


Figura A-F13. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) del gen *wsp* de la cepa *wAlbA* de las muestras 1-15 del ensayo PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en función de la longevidad de las hembras.

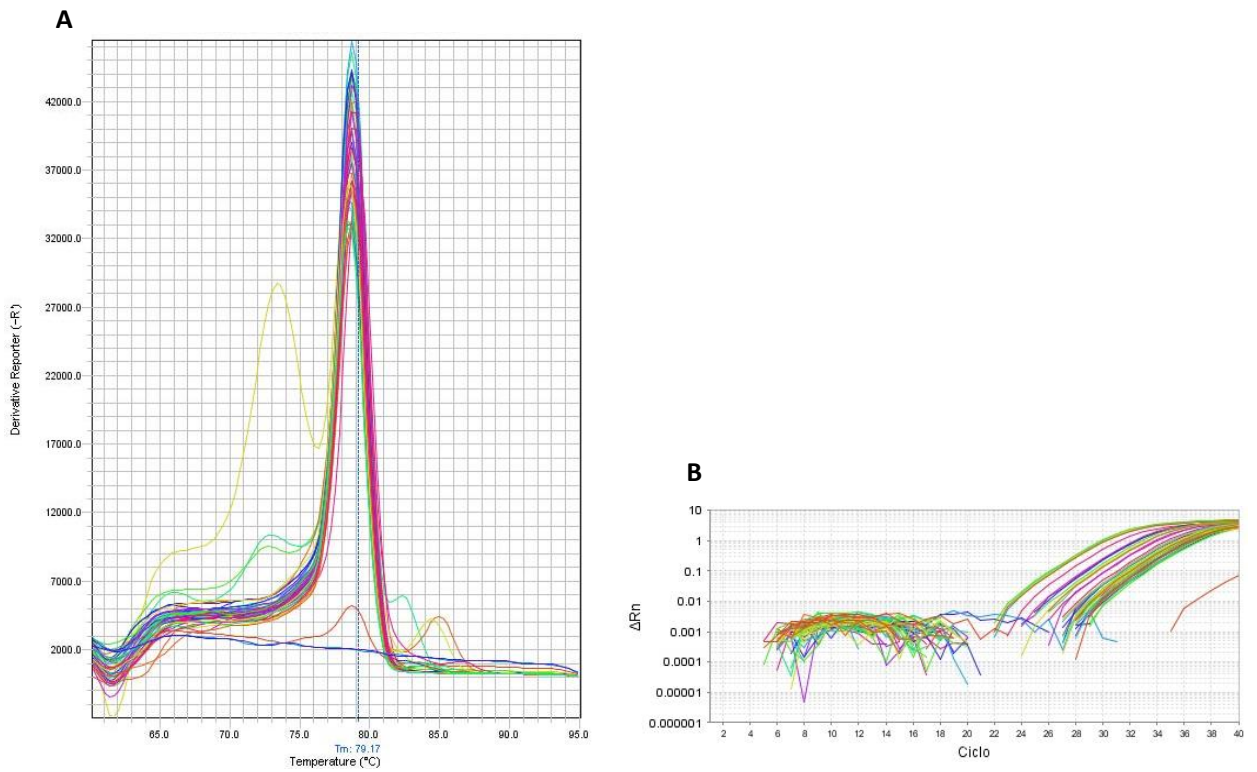


Figura A-F14. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) del gen *wsp* de la cepa *wAlbB* de las muestras 1-15 del ensayo PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en función de la longevidad de las hembras.

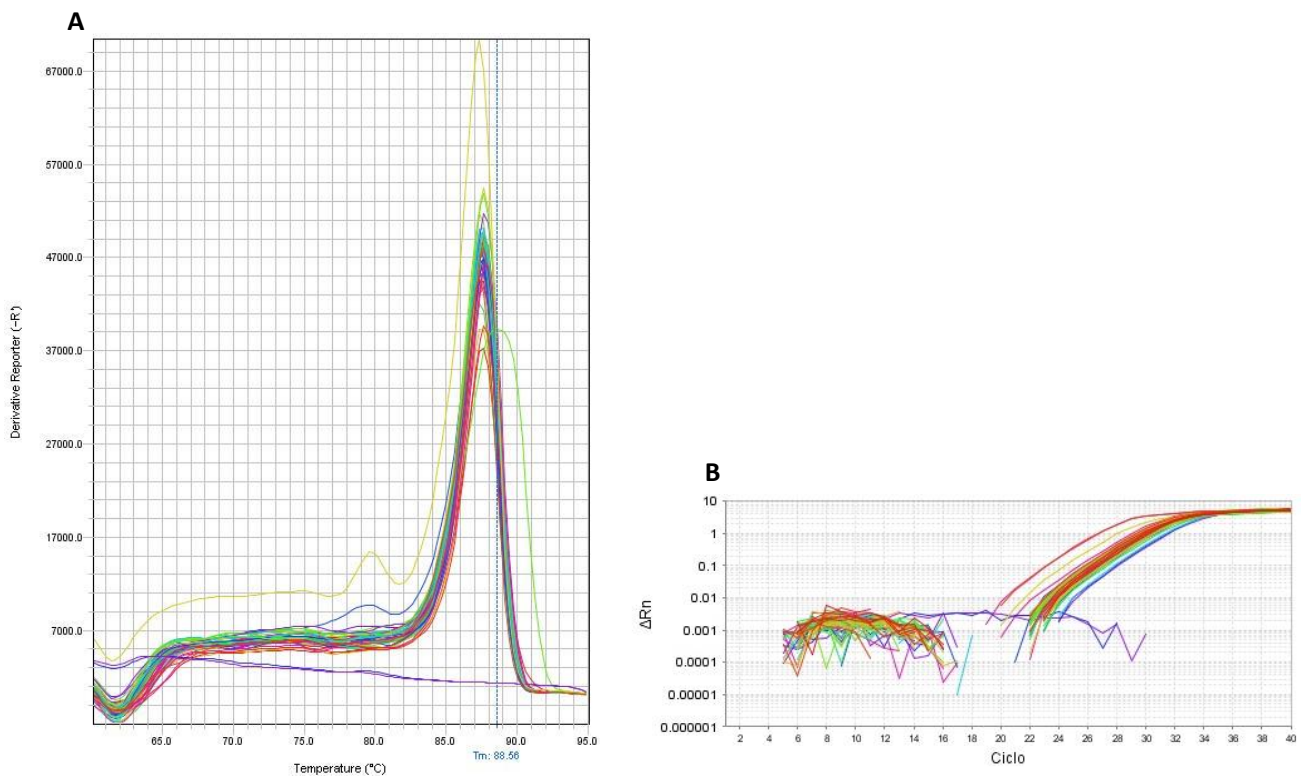


Figura A-F15. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) del gen actina de las muestras 1-15 del ensayo PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en función de la longevidad de las hembras.

Tabla A-F7. Valores de Cq de los genes *wsp* de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* y actina de las muestras 1-15 del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en función de la longevidad de las hembras. Las muestras 1 a 5 corresponden al T0, 6 a 10 al T1 y 11 a 15 al T2.

	Cq medio <i>wAlbA</i>	Cq medio <i>wAlbB</i>	Cq medio Actina	Cq Threshold
T0	28,484	28,778	23,676	0,013
T0	28,790	28,981	24,543	0,013
T0	28,752	26,064	23,963	0,013
T0	29,690	30,356	24,619	0,013
T0	28,522	29,450	23,559	0,013
T1	27,014	29,923	24,160	0,013
T1	25,962	26,867	23,589	0,013
T1	26,462	28,966	23,486	0,013
T1	26,252	23,760	24,211	0,013
T1	25,261	23,692	24,339	0,013
T2	25,892	28,687	23,940	0,013
T2	24,847	29,750	23,602	0,013
T2	26,588	30,208	25,505	0,013
T2	25,281	27,610	23,168	0,013
T2	25,300	29,408	23,543	0,013

🚦 Durante este ensayo se obtuvo una eficiencia de los cebadores apropiada, siendo para el gen actina 103,85%, para el gen *wsp* de la cepa *wAlbA* 92,06% y para el gen *wsp* de la cepa *wAlbB* 107,23%. El problema que se presentó en esta oportunidad fue que en las curvas de fusión de las muestras incógnita para los genes *wsp* de las cepas *wAlbA* y *wAlbB* se observaron varias amplificaciones inespecíficas; además, los valores de Cqs resultaron altos y cayeron al límite o por fuera de la curva estándar, lo que imposibilitó el cálculo de las concentraciones de ADN a partir de la recta. Este ensayo no se repitió debido a que no se pudo acceder al laboratorio durante el ASPO producto de la pandemia global.

ANEXO G

Con el objetivo de comparar el rendimiento de la extracción de ADN mediante el método de fenol-cloroformo con la resultante mediante el uso del kit REEXTRACT-N-AMP FOR TISSUE (Sigma-Aldrich, Alemania) se realizó el siguiente ensayo de PCR en tiempo real:

Protocolo de extracción de ADN con Fenol-Cloroformo (Anthony et al., 2000)

1. Retirar de la muestra el etanol de almacenamiento y dejar secar. Fijar la incubadora a 65°C.
2. Suspender la muestra en 220 µl de tampón de homogeneización (EDTA 80 mM, Tris HCl 100 mM, SDS 20%, proteinasa K 10 mg / ml)
3. Machacar el mosquito con un mortero hasta que la mezcla esté bastante homogénea (e.g. sin restos grandes de tejido del mosquito). Agitar en vórtex y centrifugar brevemente.
4. Incubar a 65°C durante 1-2 horas.
5. Agregar 180 µl de agua destilada.
6. En una campana extractora, agregar un volumen igual (400 µl) de PCI (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 24:24: 1).
7. Centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos, retirar la capa superior (acuosa) y colocar en un tubo nuevo de 1,5 ml.
8. Agregar 400 µl de CI (cloroformo: alcohol isoamílico, 24: 1), mezclar bien y centrifugar nuevamente durante 5 minutos a 14000 rpm.
9. Con cuidado, retirar la capa acuosa superior y colocar en un tubo nuevo de 1,5 ml.
10. Añadir 800 µl de etanol al 100% a -20°C.
11. Mezclar y colocar los tubos a -20°C por 15 minutos para facilitar la precipitación.
12. Sedimentar el ADN centrifugando a 14000 rpm durante 15 minutos.
13. Retirar el etanol y lavar el sedimento con 700 µl de etanol al 70% a -20°C
14. Agitar en el vórtex hasta que el sedimento se suspenda y luego centrifugar durante 10 minutos nuevamente a 14000 rpm.
15. Eliminar el exceso de etanol cuidadosamente y colocar el *pellet* en la campana para que se evapore el resto por completo.
16. Resuspender el *pellet* en 35-50 µl de agua destilada.

Ensayo de PCR en tiempo real:

Se corrieron dos muestras, una extraída con el protocolo de Fenol-Cloroformo y otra con el kit REDEXTRACT-N-AMP FOR TISSUE (Sigma-Aldrich, Alemania); se usaron dos concentraciones de ADN (5 ng/ μ l y 0,31 ng/ μ l) y se compararon los valores Cq promedio.

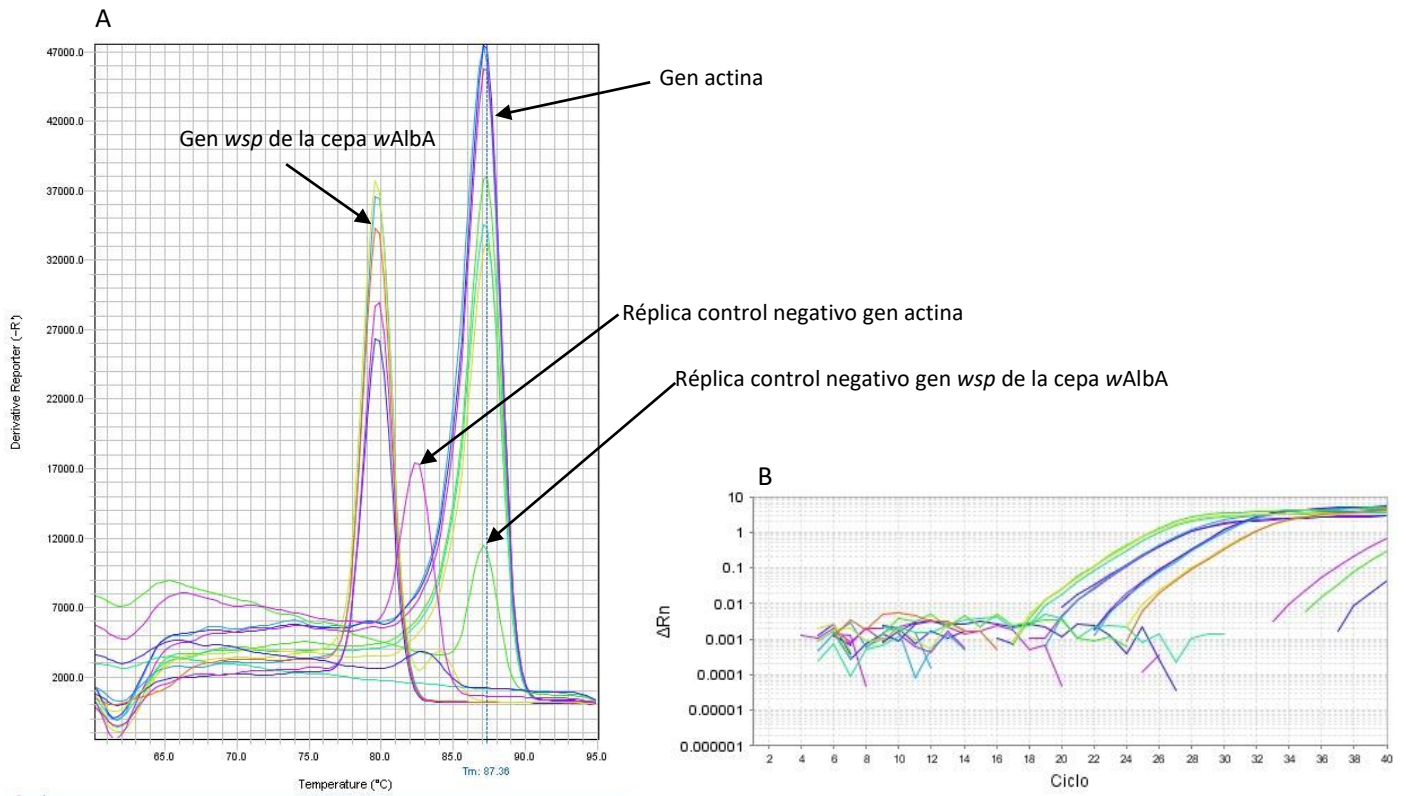


Figura A-G16. Curva de fusión **(A)** y gráfico de amplificación **(B)** de los genes actina y *wsp* de la cepa *wAlbA* de muestras extraídas con fenol-cloroformo.

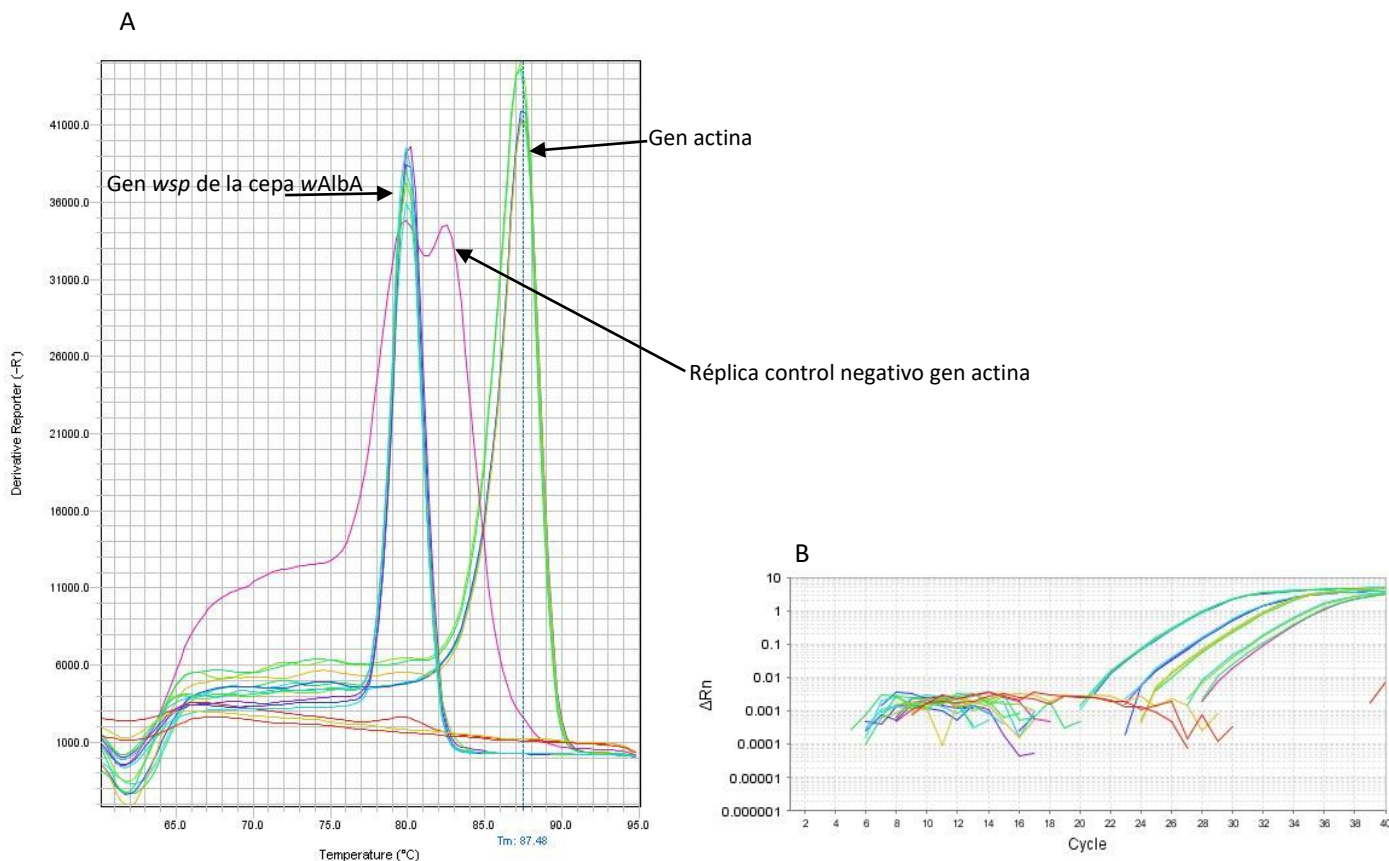


Figura A-G18. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) de los genes actina y *wsp* de la cepa *wAlbA* de muestras extraídas con kit sigma.

Tabla A-G8. Comparación de los valores de Cq de muestras extraídas con el protocolo de Fenol-Cloroformo y con el kit Sigma.

Actina [ng/ul]	Cq promedio con fenol cloroformo	Cq promedio con kit sigma
5	19,236	21,890
0,31	23,761	25,880
wA [ng/ul]		
	Cq promedio con fenol cloroformo	Cq promedio con kit sigma
5	21,212	24,548
0,31	25,543	28,420

En este ensayo se puede ver como con la extracción de ADN con un protocolo de Fenol-Cloroformo las curvas de amplificación se corren dos Cqs hacia la derecha (i.e. disminuyen el Cq, mostrando una mayor concentración de ADN) tanto para el gen actina como para el gen *wsp* de la cepa *wAlbA*. No obstante, en la curva de fusión se observa la amplificación de una de las réplicas de los controles de los negativos.

ANEXO H

Curva estándar realizada en el ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de las cepas wAlbA y wAlbB en hembras con alimentación sanguínea vs. hembras alimentadas con pasas de uva.

Las muestras fueron extraídas con el protocolo de Fenol-Cloroformo y la curva estándar se realizó a partir de un *pool* con todas las muestras a ensayar. Se realizaron diluciones seriadas de 1/10 a partir de una concentración inicial de ADN de 10 ng/ μ l y se corrieron un total de 4 puntos con tres réplicas técnica cada uno.

Las concentraciones de ADN de los cuatros puntos fueron: 10 ng/ μ l - 1 ng/ μ l - 0,1 ng/ μ l - 0,01 ng/ μ l.

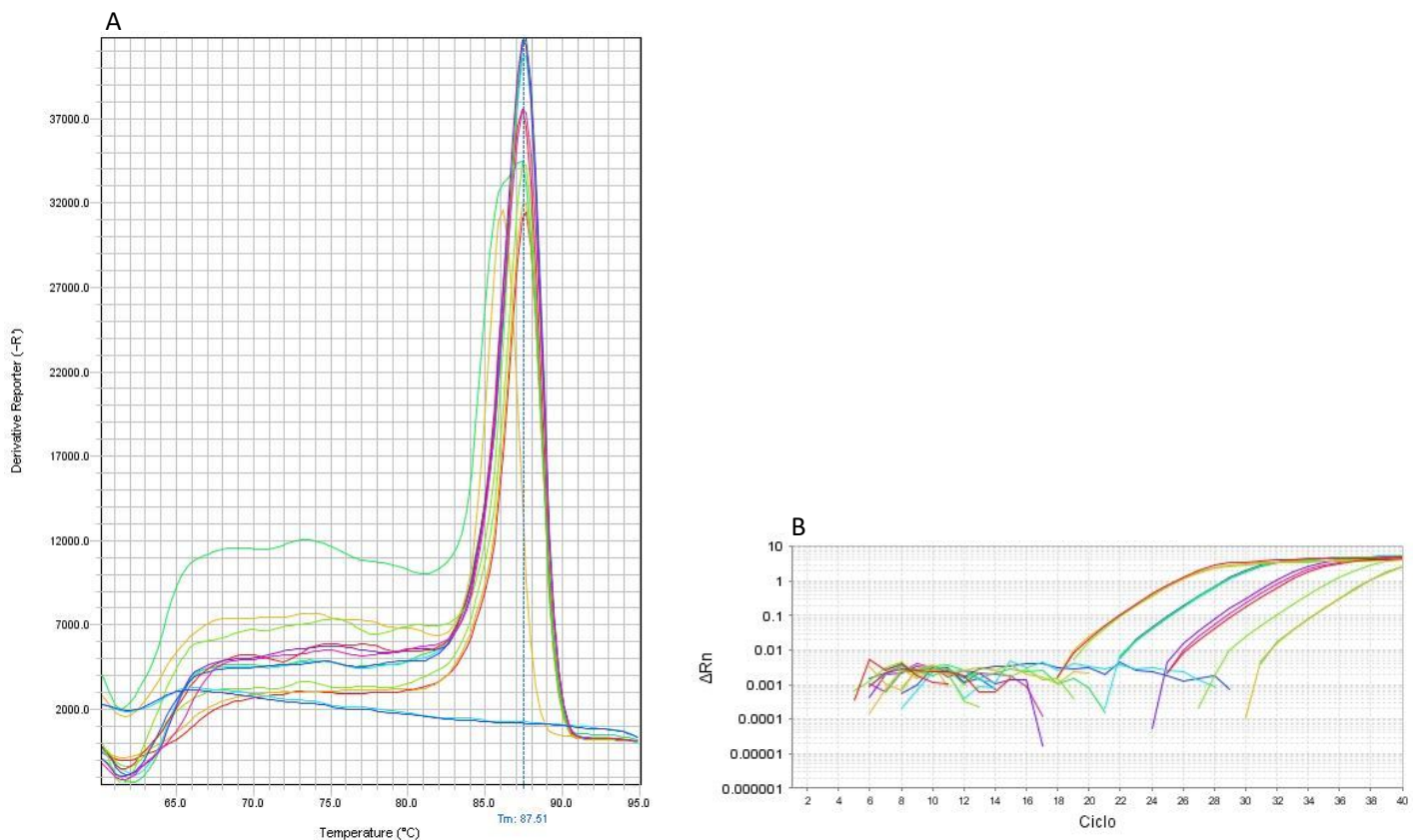


Figura A-H17. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) de la curva estándar del gen actina del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en hembras con alimentación sanguínea vs. hembras alimentadas con pasas de uva.

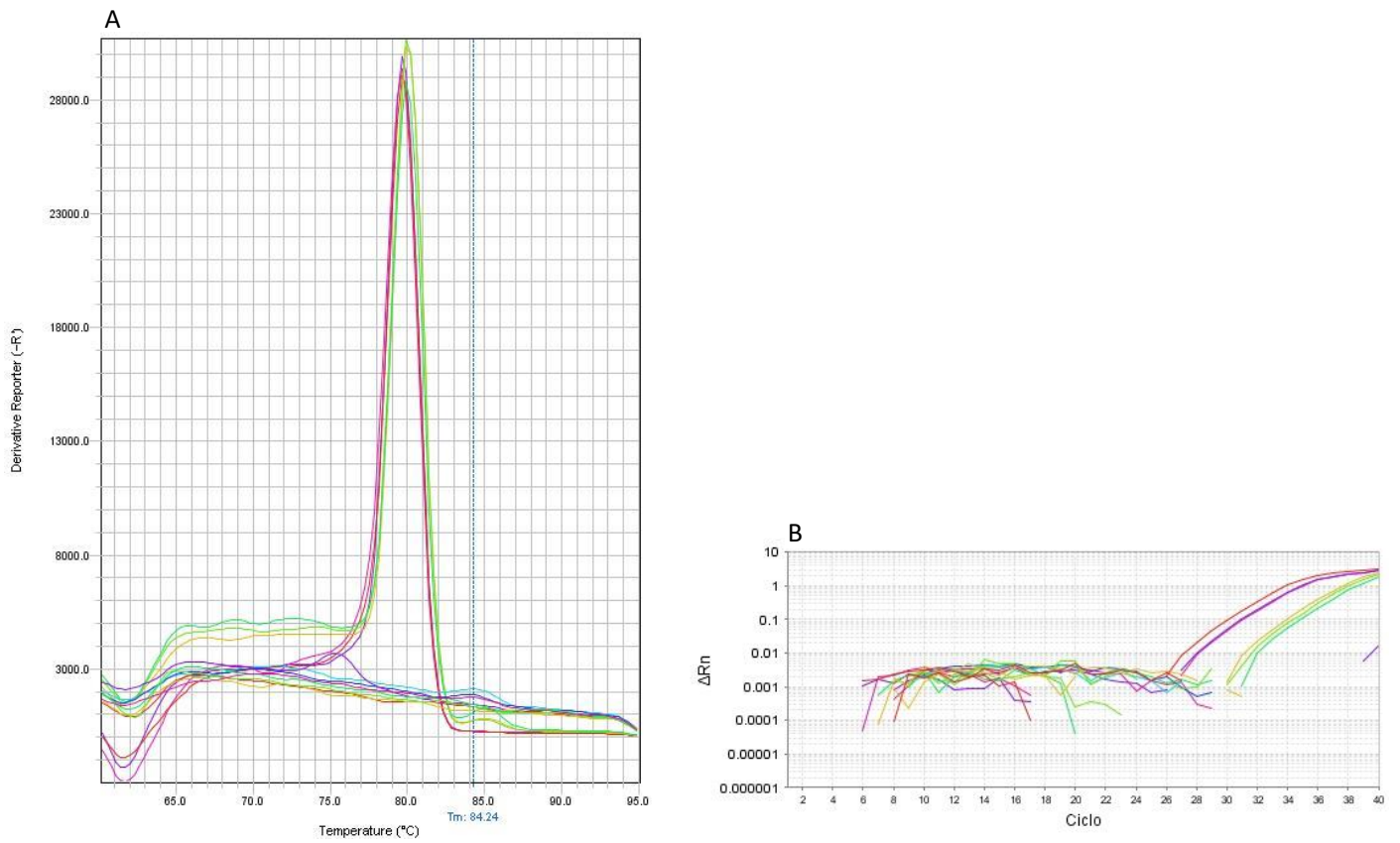


Figura A-H18. Curva de fusión **(A)** y gráfico de amplificación **(B)** de la curva estándar del gen *wsp* de la cepa wAlbA del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en hembras con alimentación sanguínea vs. hembras alimentadas con pasas de uva.

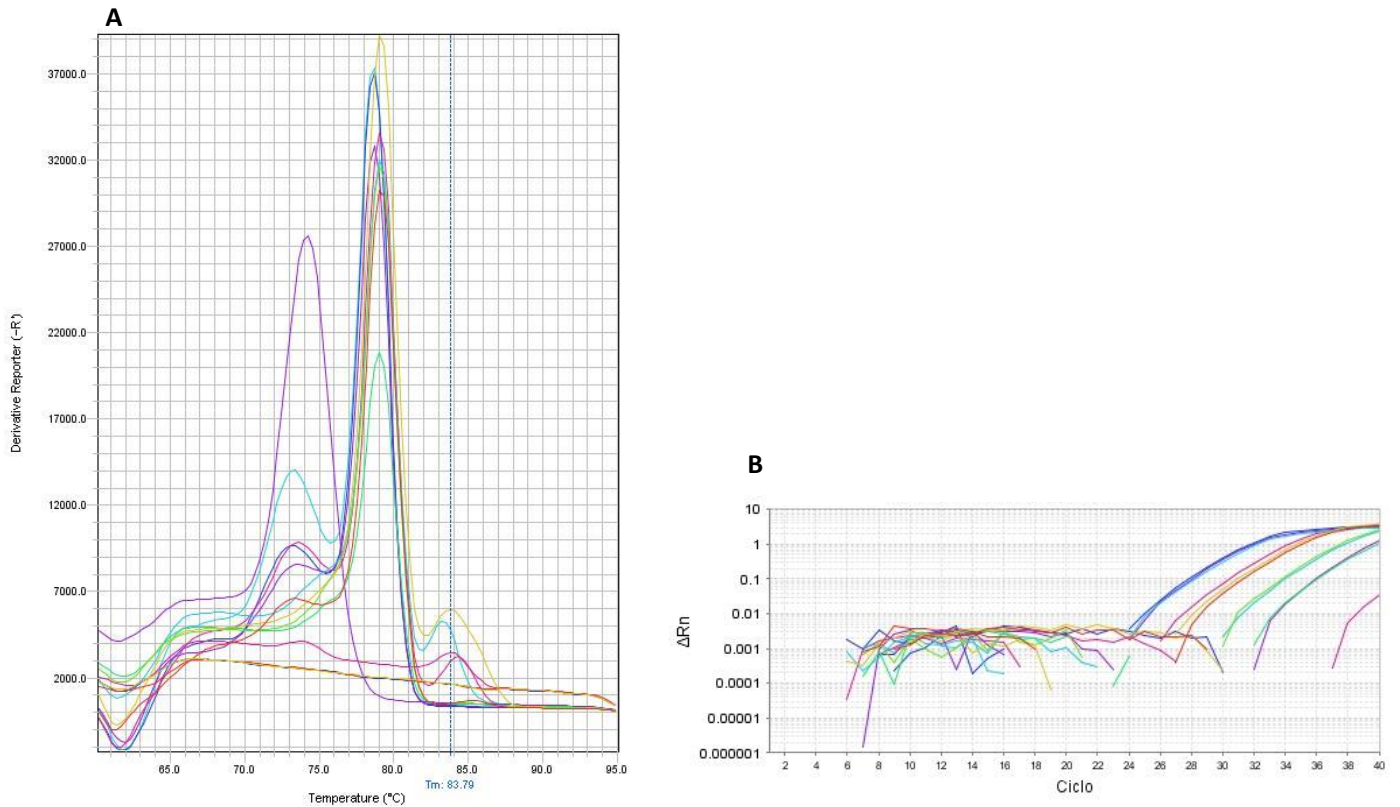


Figura A-H19. Curva de fusión (A) y gráfico de amplificación (B) de la curva estándar del gen *wsp* de la cepa wAlbB del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en hembras con alimentación sanguínea vs. hembras alimentadas con pasas de uva.

Tabla A-H9. Valores de Cq de los genes actina y *wsp* de las cepas wAlbA y wAlbB de la curva estándar del ensayo de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana en hembras con alimentación sanguínea vs. hembras alimentadas con pasas de uva.

[ADN] ng/μl	Cq Mean Actina	Cq Mean wAlbA	Cq Mean wAlbB	Cq Threshold
10	19,75	30,08	30,73	0,0158
1	28,89	36,49	34,43	0,0158
0,1	31,90	Undetermined	35,59	0,0158
0,01	36,17	Undetermined	37,03	0,0158

En las curvas de fusión de los genes *wsp* de las cepas wAlbA y wAlbB se observan amplificaciones inespecíficas que pueden indicar contaminación y dímeros de cebadores. Además, los Cqs que se muestran en la Tabla A-H9 son mayores a 30, lo que indicaría una pérdida de especificidad cuando se trabaja con SyBR Green (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Incluso en la cepa wAlbA los dos últimos puntos de la curva no rindieron un producto de amplificación. Al observar los valores de Cq del gen actina en la tabla precedente, puede notarse una variación irregular entre los distintos puntos: por ejemplo, de una concentración de ADN 10 ng/μl a una de 1 ng/μl incrementa en 9 Cqs, pero de una concentración de 1 ng/μl a una de 0,1 ng/μl incrementa en 2 Cqs, lo que indicaría una baja

eficiencia de amplificación, como consecuencia de la falta de linealidad entre los Cqs correspondientes a las distintas diluciones seriadas. En parte esto pudo deberse a que al extraer los ovarios la densidad de *Wolbachia* seguramente era baja, y con ello la concentración de ADN bacteriana es mucho menor a la del genoma del hospedador, por lo que globalmente la cantidad de ADN que se usó como molde en la PCR pudo haber sido baja. Por estas razones este ensayo fue descartado.

Comentarios finales de los ANEXOS C a H

- La puesta a punto de la PCR en tiempo real fue uno de los mayores desafíos de esta tesis. Si bien se obtuvo una buena eficiencia para los cebadores diseñados en esta tesis, se lograron curvas estándar de 4 puntos y diluciones al ¼. En partes, esto se debió a que en valores más diluidos de ADN la amplificación comenzaba en Cqs mayores a 30, los cuales no son adecuados cuando se trabaja con SybrGreen, ya que al tratarse de un intercalante de ADN valores altos de Cq pueden sugerir falta de especificidad. Cuando se realizaron diluciones al cuarto se vio que los puntos de mayor concentración presentaban valores de Cq iguales, lo que resultaba en una pérdida de linealidad de la recta y una baja eficiencia. Esto mejoraba al eliminar el punto con mayor concentración de ADN, tal como se explicó en el ANEXO F. Una hipótesis posible para explicar los problemas presentados es el método de extracción utilizado (*kit Sigma*), el cual, si bien rinde una concentración de ADN adecuada para esta técnica, también produce impurezas y elevada espuma, sugiriendo que la gran cantidad de detergente de dicho kit podría interferir en la fluorescencia de la PCR. Debido a que la colección del material no es de fácil acceso, lamentablemente no fue posible obtener material nuevamente y extraer el ADN mediante otro método. Otra dificultad presentada fue la cuantificación de ADN, la cual se realizó en base al ADN genómico total (mosquito + bacteria), por lo que resulta imposible saber cuánto ADN bacteriano se está utilizando; este pudo haber sido un inconveniente en el ensayo *de PCR en tiempo real para estudiar la evolución de la densidad bacteriana de las cepas wAlbA y wAlbB en hembras con alimentación sanguínea vs. hembras alimentadas con pasas de uva* (ANEXO H), en el cual se extrajeron los ovarios de las hembras, órgano principal de localización de la bacteria. Probablemente en este ensayo se debería usar una concentración de ADN mayor a la ensayada.
- A pesar de los problemas comentados, se observó que el gen actina funcionó muy bien como gen de referencia con los cebadores diseñados ya que su amplificación fue constante

en los distintos ensayos entre las diferentes muestras. Además, se logró medir la densidad de la cepa wAlbB, la cual puede ser evaluada para el uso de ensayos de transinfección ya que presentó resultados positivos en el bloqueo de arbovirus como el dengue en *Ae. aegypti* (Nazni et al., 2019). De todos modos, este estudio sienta un primer antecedente y plantea las bases para estudios futuros, pudiendo mejorarse la técnica a partir de la experiencia comentada a lo largo del Capítulo 2 y de los ANEXOS.

Bibliografía

- Achinelly, M.F., Micieli, M. V., 2016. Entomonematodos como agentes de control biológico de mosquitos en Argentina. *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina*. Ed, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP). p. 275-283
- Ahantarig, A., Trinachartvanit, W., Kittayapong, P., 2008. Relative *Wolbachia* density of field-collected *Aedes albopictus* mosquitoes in Thailand. *Journal of Vector Ecology*, 33(1), 173–177. [https://doi.org/10.3376/1081-1710\(2008\)33\[173:RWDOFA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3376/1081-1710(2008)33[173:RWDOFA]2.0.CO;2)
- Ahmed, M.Z., Li, S.J., Xue, X., Yin, X.J., Ren, S.X., Jiggins, F.M., Greeff, J.M., Qiu, B.L., 2015. The intracellular bacterium *Wolbachia* uses parasitoid wasps as phoretic vectors for efficient horizontal transmission. *PLoS Pathogens*, 11(2), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004672>
- Almirón, W.R., Humeres, S.G., Gardenal, C.N., 1995. Distribution and Hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90(4), 469–473. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761995000400007>
- Alonso, A.C., 2020. “Interacciones competitivas entre poblaciones naturales de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Misiones: una perspectiva desde la patogenicidad diferencial de los parásitos naturales.” Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensur, Argentina.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7>
- Andrews, E.S., Crain, P.R., Fu, Y., Howe, D.K., Dobson, S.L., 2012. Reactive Oxygen Species Production and *Brugia pahangi* Survivorship in *Aedes polynesiensis* with Artificial *Wolbachia* Infection Types. *PLoS Pathogens*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003075>
- Anthony, T.G., Trueman, H.E., Harbach, R.E., Vogler, A.P., 2000. Polymorphic microsatellite markers identified in individual *Plasmodium falciparum* oocysts

- from wild-caught *Anopheles* mosquitoes. *Parasitology*, 121(2), 121–126.
<https://doi.org/10.1017/S003118209900623X>
- Área de Vigilancia de la Salud–Dirección de Epidemiología., 2015. Brote de Encefalitis de San Luis en Pergamino. Alerta N°2-SE16.
- Armbruster, P., Damsky, W.E., Giordano, R., Birungi, J., Munstermann, L.E., Conn, J.E., 2003. Infection of New- and Old-World *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the Intracellular Parasite *Wolbachia*: Implications for Host Mitochondrial DNA Evolution. *Journal of Medical Entomology*, 40(3), 356–360.
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.3.356>
- Atyame, C.M., Delsuc, F., Pasteur, N., Weill, M., Duron, O., 2011. Diversification of *Wolbachia* Endosymbiont in the *Culex pipiens* Mosquito. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2761–2772. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr083>
- Atyame, C.M., Labbé, P., Dumas, E., Milesi, P., Charlat, S., Fort, P., Weill, M., 2014. *Wolbachia* Divergence and the Evolution of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens*. *PLoS One*, 9(1), 21–26.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087336>
- Augustinos, A.A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Doudoumis, V., Ramos, S., Aguiar, A.F., Borges, P.A. V., Khadem, M., Latorre, A., Tsiamis, G., Bourtzis, K., 2011. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of Aphids: Is the hidden diversity fully unraveled?. *PLoS One*, 6(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028695>
- Azar, S.R., Roundy, C.M., Rossi, S.L., Huang, J.H., Leal, G., Yun, R., Fernandez-Salas, I., Vitek, C.J., Paploski, I.A.D., Stark, P.M., Vela, J., Debboun, M., Reyna, M., Kitron, U., Ribeiro, G.S., Hanley, K.A., Vasilakis, N., Weaver, S.C., 2017. Differential Vector Competency of *Aedes albopictus* populations from the Americas for Zika Virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(2), 330–339.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0969>
- Bahnck, C.M., Fonseca, D.M., 2006. Rapid Assay to Identify the Two Genetic Forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and Hybrid Populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(2), 251–255.
- Balaji, S., Jayachandran, S., Prabakaran, S.R., 2019. Evidence for the natural

- occurrence of *Wolbachia* in *Aedes aegypti* mosquitoes. *FEMS Microbiology Letters*, 366(6). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz055>
- Baldini, F., Segata, N., Pompon, J., Marcenac, P., Shaw, W.R., Dabiré, R.K., Diabaté, A., Levashina, E.A., Catteruccia, F., 2014. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature Communications*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms4985>
- Baldini, F., Rougé, J., Kreppel, K., Mkandawile, G., Mapua, S.A., Sikulu-Lord, M., Ferguson, H.M., Govella, N., Okumu, F.O., 2018. First report of natural *Wolbachia* infection in the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in Tanzania. *Parasites & Vectors*, 11(635). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3249-y>
- Baldo, L., Lo, N., Werren, J.H., 2005. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *Journal of Bacteriology*, 187(15), 5406–5418. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5406-5418.2005>
- Baldo, L., Bordenstein, S., Wernegreen, J.J., Werren, J.H., 2006a. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 437–449. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj049>
- Baldo, L., Hotopp, J.C.D., Jolley, K.A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R.R., Hayashi, C., Maiden, M.C.J., Tettelin, H., Werren, J.H., 2006b. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7098–7110. <https://doi.org/10.1128/AEM.00731-06>
- Baldo, L., Werren, J.H., 2007. Revisiting *Wolbachia* Supergroup Typing Based on WSP: Spurious Lineages and Discordance with MLST. *Current Microbiology*, 55(1), 81–87. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-0055-8>
- Bandi, C., Anderson, T.J.C., Genchi, C., Blaxter, M.L., 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1413), 2407–2413. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0591>
- Batallán, G.P., Konigheim, B.S., Quaglia, A.I., Rivarola, M.E., Beranek, M.D., Tauro, L.B., Flores, S.F., Laurito, M., Almirón, W.R., Contigiani, M.S., Visintin, A.M., 2021. Autochthonous circulation of Saint Louis encephalitis and West Nile viruses in the Province of La Rioja, Argentina. *Revista Argentina de*

- Microbiologia*, 53(2), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.09.001>
- Baton, L.A., Pacidônio, E.C., Gonçalves, D.D.S., Moreira, L.A., 2013. wFlu: Characterization and Evaluation of a Native *Wolbachia* from the Mosquito *Aedes fluviatilis* as a Potential Vector Control Agent. *PLoS One*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059619>
- Beckmann, J.F., Ronau, J.A., Hochstrasser, M., 2017. A *Wolbachia* Deubiquitylating Enzyme Induces Cytoplasmic Incompatibility. *Nature Microbiology*, 2(5), 1–7. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.7.A>
- Benedict, M.Q., Levine, R.S., Hawley, W.A., Lounibos, L.P., 2007. Spread of the Tiger: Global Risk of Invasion by the Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(1), 76–85.
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., Xi, Z., 2010. The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833>
- Bian, G., Joshi, D., Dong, Y., Lu, P., Zhou, G., Pan, X., Xu, Y., Dimopoulos, G., Xi, Z., 2013a. *Wolbachia* Invades *Anopheles stephensi* Populations and Induces Refractoriness to *Plasmodium* Infection. *Science*, 340(6133), 748–751. <https://doi.org/10.1126/science.1236192>
- Bian, G., Zhou, G., Lu, P., Xi, Z., 2013b. Replacing a Native *Wolbachia* with a Novel Strain Results in an Increase in Endosymbiont Load and Resistance to Dengue Virus in a Mosquito Vector. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002250>
- Bing, X.L., Xia, W.Q., Gui, J.D., Yan, G.H., Wang, X.W., Liu, S.S., 2014. Diversity and evolution of the *Wolbachia* endosymbionts of *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies. *Ecology and Evolution*, 4(13), 2714–2737. <https://doi.org/10.1002/ece3.1126>
- Biosystems, A., 2004. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. *Applied Biosystem*.
- Bisen, P.S., Raghuvanshi, R., 2013. Emerging epidemics: Management and control. John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, NJ.
- Bisset Lazcano, J.A., Mondelo, R.E., Rodríguez Coto, M.M., Leyva, R.Y., Hurtado Núñez, D., Fuentes, I., 2014. Evaluación de la resistencia a insecticidas en

- Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Argentina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3), 360–369.
- Blagrove, M.S.C., Arias-Goeta, C., Failloux, A.B., Sinkins, S.P., 2012. *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), 255–260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112021108>
- Boletín Integrado de Vigilancia N° 340 – SE51, 2016. Secretaria de promoción y programas sanitarios.
- Boletín Integrado de Vigilancia N°314 -SE24, 24, 2016. Secretaria de promoción y programas sanitarios.
- Boletín Integrado de Vigilancia N°500 - SE24, 24, 2020. Dirección Nacional de Epidemiología e Información Estratégica.
- Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., James, A.A., 2013. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: Current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 29(9), 460-468. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.07.003>
- Bordenstein, S.R., Wernegreen, J.J., 2004. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): Infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. *Molecular Biology and Evolution*, 21(10), 1981–1991. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh211>
- Bordenstein, S., Rosengaus, R.B., 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isoptera. *Current Microbiology*, 51(6), 393–398. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0084-0>
- Bordenstein, S.R., Marshall, M.L., Fry, A.J., Kim, U., Wernegreen, J.J., 2006. The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. *PLoS Pathogens*, 2(5), 384–393. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020043>
- Bordenstein, S.R., Paraskevopoulos, C., Dunning Hotopp, J.C., Sapountzis, P., Lo, N., Bandi, C., Tettelin, H., Werren, J.H., Bourtzis, K., 2009. Parasitism and Mutualism in *Wolbachia*: What the Phylogenomic Trees Can and Cannot Say. *Molecular Biology and Evolution*, 26(1), 231–241. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn243>
- Bordenstein, S.R., Bordenstein, S.R., 2011. Temperature Affects the Tripartite Interactions between Bacteriophage WO, *Wolbachia*, and Cytoplasmic

- Incompatibility. *PLoS One*, 6(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029106>
- Bouchon, D., Rigaud, T., Juchault, P., 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: Molecular identification and host feminization. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1401), 1081–1090. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0402>
- Bourtzis, K., Dobson, S.L., Xi, Z., Rasgon, J.L., Calvitti, M., Moreira, L.A., Bossin, H.C., Moretti, R., Baton, L.A., Hughes, G.L., Mavingui, P., Gilles, J.R.L., 2014. Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica*, 132(1), 150–163.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.004>
- Brühl, C.A., Després, L., Frör, O., Patil, C.D., Poulin, B., Tetreau, G., Allgeier, S., 2020. Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). *Science of the Total Environment*, 724, 137800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137800>
- Bull, J.J., Turelli, M., 2013. *Wolbachia* versus dengue: Evolutionary forecasts. *Evol. Med. Public Heal.* 2013(1), 197–207. <https://doi.org/10.1093/emph/eot018>
- Burkart, R., Bárbaro, N.O., Sánchez, R.O., Gómez, D.A., 1999. Eco-Regiones de la Argentina. ed. Administración de Parques Nacionales, Buenos Aires.
- Cabrera, A.L., Willink, A., 1980. Regiones Biografía de América Latina, E Chesneau. ed. Secretaría de la Organización de los Estados Americanos, Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico.
- Campos, R.E., 1993. Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en la localidad de Quilmes (Buenos Aires, Argentina). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 52(1-4), 1993.
- Caragata, E.P., Walker, T., 2012. Using bacteria to treat diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(6), 701–712.
<https://doi.org/10.1517/14712598.2012.677429>
- Caragata, E.P., Rancès, E., Hedges, L.M., Gofton, A.W., Johnson, K.N., O'Neill, S.L., McGraw, E.A., 2013. Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by *Wolbachia*. *PLoS Pathogens*, 9(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003459>

- Caragata, E.P., Dutra, H.L.C., Sucupira, P.H.F., Ferreira, A.G.A., Moreira, L. A., 2021. *Wolbachia* as translational science: controlling mosquito-borne pathogens. *Trends in Parasitology*, 37(12), 1050-1067. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.06.007>
- Cardo, M. V., Rubio, A., Vezzani, D., Carbajo, A.E., 2020. Assessment of *Culex pipiens* bioforms in the world's southernmost distribution limit. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190390>
- Carvajal, T.M., Hashimoto, K., Harnandika, R.K., Amalin, D.M., Watanabe, K., 2019. Detection of *Wolbachia* in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes in metropolitan Manila, Philippines. *Parasites & vectors*, 12(361). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3629-y>
- Casiraghi, M., Anderson, T.J.C., Bandi, C., Bazzocchi, C., Genchi, C., 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: Comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, 122(1), 93–103. <https://doi.org/10.1017/S0031182000007149>
- Casiraghi, M., Bordenstein, S.R., Baldo, L., Lo, N., Beninati, T., Wernegreen, J.J., Werren, J.H., Bandi, C., 2005. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, 151(12), 4015–4022. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28313-0>
- Chafee, M.E., Funk, D.J., Harrison, R.G., Bordenstein, S.R., 2009. Lateral Phage Transfer in Obligate Intracellular Bacteria (*Wolbachia*): Verification from Natural Populations. *Molecular Biology and Evolution*, 27(3), 501–505. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp275>
- Charlesworth, J., Weinert, L.A., Araujo, E. V., Welch, J.J., 2019. *Wolbachia*, *Cardinium* and climate: An analysis of global data. *Biology Letters*, 15(8). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0273>
- Consoli, R.A.G.B., Oliveira, R.L.D., 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Ed. Fiocruz. <https://doi.org/10.7476/9788575412909>
- Cordaux, R., Pichon, S., Hatira, H.B.A., Doublet, V., Grève, P., Marcadé, I., Braquart-Varnier, C., Souty-Grosset, C., Charfi-Cheikhrouha, F., Bouchon, D., 2012.

- Widespread *Wolbachia* infection in terrestrial isopods and other crustaceans. *Zookeys*, 176, 123–131. <https://doi.org/10.3897/zookeys.176.2284>
- Cornel, A.J., Mcabee, R.D., Rasgon, J., Stanich, M.A., Scott, W., Coetzee, M., 2003. Differences in Extent of Genetic Introgression Between Sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. *Journal of Medical Entomology*, 41(1), 36–51. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.1.36>
- Czarnetzki, A. B., Tebbe, C. C., 2004. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. *Environmental Microbiology*, 6(1), 35–44. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00537.x>
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2015. jModelTest 2: more models, new heuristics and high- performance computing. *Nat. Methods* 9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Darsie, R.F., 1985. Mosquitoes of Argentina. Part I, Keys for Identification of Adult Females and Fourth Stage Larvae in English and Spanish (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics*, 17(3), 153–253.
- Delatte, H., Paupy, C., Dehecq, J.S., Thiria, J., Failloux, A.B., Fontenille, D., 2008. *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. *Parasite*, 15(1), 3–13. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008151003>
- Derua, Y.A., Kahindi, S.C., Mosha, F.W., Kweka, E.J., Atieli, H.E., Wang, X., Zhou, G., Lee, M.C., Githeko, A.K., Yan, G., 2018. Microbial larvicides for mosquito control: Impact of long lasting formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* on non-target organisms in western Kenya highlands. *Ecology and Evolution*, 8(15), 7563–7573. <https://doi.org/10.1002/ece3.4250>
- Despres, L., Lagneau, C., Frutos, R., 2011. Using the Bio-Insecticide *Bacillus Thuringiensis Israelensis* in Mosquito Control. *Pesticides in the ModernWorld-Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment, Pesticides in the Modern World-Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. Ed. Margarita Stoytcheva. p. 614.
- Díaz-Nieto, L.M., 2014. Diversidad de mosquitos en Mar del Plata y caracterización

- de microorganismos patógenos y simbioses para el control de culícidos de importancia sanitaria. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Argentina.
- Díaz-Nieto, L.M., Gil, M.F., Lazarte, J.N., Perotti, M.A., Berón, C.M., 2021. *Culex quinquefasciatus* carrying *Wolbachia* is less susceptible to entomopathogenic bacteria. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80034-5>
- Dobson, S.L., Bourtzis, K., Braig, H.R., Jones, B.F., Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S.L., 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(98\)00119-2](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00119-2)
- Dobson, S.L., Rattanadechakul, W., Marsland, E.J., 2004. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity*, 93(2), 135–142. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800458>
- Duron, O., Lagnel, J., Raymond, M., Bourtzis, K., Fort, P., Weill, M., 2005. Transposable element polymorphism of *Wolbachia* in the mosquito *Culex pipiens*: Evidence of genetic diversity, superinfection and recombination. *Molecular Ecology*, 14(5), 1561–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02495.x>
- Duron, O., Bernard, C., Unal, S., Berthomieu, A., Berticat, C., Weill, M., 2006. Tracking factors modulating cytoplasmic incompatibilities in the mosquito *Culex pipiens*. *Molecular Ecology*, 15(10), 3061–3071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02996.x>
- Duron, O., Boureux, A., Echaubard, P., Berthomieu, A., Berticat, C., Fort, P., Weill, M., 2007. Variability and Expression of Ankyrin Domain Genes in *Wolbachia* Variants Infecting the Mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4442–4448. <https://doi.org/10.1128/JB.00142-07>
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., Hurst, G.D., 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biology*, 6(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-27>
- Dutton, T.J., Sinkins, S.P., 2004. Strain-specific quantification of *Wolbachia* density

- in *Aedes albopictus* and effects of larval rearing conditions. *Insect Molecular Biology*, 13(3), 317–322. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00490.x>
- Ebel, G.D., Carricaburu, J., Young, D., Bernard, K.A., Kramer, L.D., 2004. Genetic and phenotypic variation of West Nile virus in New York, 2000-2003. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(4), 493–500. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.493>
- Engelstädter, J., Hurst, G.D.D., 2009. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 127–149. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120206>
- Enigl, M., Zchori-Fein, E., Schausberger, P., 2005. Negative Evidence of *Wolbachia* in the predaceous mite *Phytoseiulus persimilis*. *Experimental and Applied Acarology*, 36(4), 249–262. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-6075-9>
- Farajollahi, A., Fonseca, D.M., Kramer, L.D., Marm Kilpatrick, A., 2011. “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(1), 1577–1585. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.013>
- Ferree, P.M., Sullivan, W., 2006. A genetic test of the role of the maternal pronucleus in *Wolbachia* -induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Society of America*, 173(2), 839–847. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.053272>
- Ferri, E., Bain, O., Barbuto, M., Martin, C., Lo, N., Uni, S., Landmann, F., Baccei, S.G., Guerrero, R., de Souza Lima, S., Bandi, C., Wanji, S., Diagne, M., Casiraghi, M., 2011. New insights into the evolution of *Wolbachia* infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. *PLoS One*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020843>
- Fitzpatrick, D.A., Creevey, C.J., McInerney, J.O., 2006. Genome Phylogenies Indicate a Meaningful α -Proteobacterial Phylogeny and Support a Grouping of the Mitochondria with the Rickettsiales. *Molecular Biology and Evolution*, 23(1), 74–85. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj009>
- Flores, F.S., Días, L.A., Batallán, G.P., Almirón, W.R., Contigiani, M.S., 2010. Vertical Transmission of St. Louis Encephalitis Virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera:

- Culicidae) in Córdoba, Argentina. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(10), 999-1002. <https://doi.org/10.1089=vbz.2009.0136>
- Forattini, O.P., 1986. Identificacao de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Revista de Saude Publica*, 20(3), 244–245. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101986000300009>
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., Bhattacharyya, A., Kapatral, V., Kumar, S., Posfai, J., Vincze, T., Ingram, J., Moran, L., Lapidus, A., Omelchenko, M., Kyrpides, N., Ghedin, E., Wang, S., Goltsman, E., Joukov, V., Ostrovskaya, O., Tsukerman, K., Mazur, M., Comb, D., Koonin, E., Slatko, B., 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology*, 3(4), 0599–0614. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030121>
- Frydman, H.M., Li, J.M., Robson, D.N., Wieschaus, E., 2006. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature*, 441(7092), 509–512. <https://doi.org/10.1038/nature04756>
- Gabrieli, P., Caccia, S., Varotto-Boccazzi, I., Arnoldi, I., Barbieri, G., Comandatore, F., Epis, S., 2021. Mosquito Trilogy: Microbiota, Immunity and Pathogens, and Their Implications for the Control of Disease Transmission. *Frontiers in Microbiology*, 12, 633. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630438>
- Gates, B., 2014. The eadliest Animal in the World. *Mosquito Week. The Gates Notes LLC*.
- Gerth, M., 2016. Classification of *Wolbachia* (Alphaproteobacteria, Rickettsiales): No evidence for a distinct supergroup in cave spiders. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 378–380.
- Glaser, R.L., Meola, M.A., 2010. The Native *Wolbachia* Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. *PLoS One*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011977>
- Glowska, E., Dragun-Damian, A., Dabert, M., Gerth, M., 2015. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 30, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.019>
- Goenaga, S., Chuchuy, A., Micieli, M. V., Natalini, B., Kuruc, J., Kowalewski, M., 2020.

- Expansion of the Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): New Records in Northern Argentina and Their Implications From an Epidemiological Perspective. *Journal of Medical Entomology*, 57(4), 1310-1313.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjaa009>
- Gomes, F.M., Barillas-Mury, C., 2018. Infection of anopheline mosquitoes with *Wolbachia*: Implications for malaria control. *PLoS Pathogens*, 14(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007333>
- Gratz, N.G., 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 18(3), 215–227. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x>
- Gubler, D.J., 2002. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Archives of Medical Research*, 33(4), 330–342.
[https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00378-8](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00378-8)
- Guillemaud, T., Pasteur, N., Rousset, F., 1997. Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Science*, 264(1379), 245–251. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0035>
- Haegeman, A., Vanholme, B., Jacob, J., Vandekerckhove, T.T.M., Claeys, M., Borgonie, G., Gheysen, G., 2009. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: Member of a new *Wolbachia* supergroup. *International Journal for Parasitology*, 39(9), 1045–1054.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.006>
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98. <https://doi.org/citeulike-article-id:691774>
- Hamer, G.L., Kitron, U.D., Brawn, J.D., Loss, S.R., Ruiz, M.O., Goldberg, T.L., Walker, E.D., 2008. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): A bridge vector of West Nile virus to humans. *Journal of Medical Entomology*, 45(1), 125–128.
[https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[125:CPDCAB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[125:CPDCAB]2.0.CO;2)
- Hashim, N.A., Ahmad, A.H., Rawi, C.S.M., Tahir, N.A., Basari, N., 2008. Life tables study of immature *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) during the wet and dry seasons in Penang, Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical*

- Medicine and Public Health*, 39(1), 39–47.
- Hawley, W.A., 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement*, 1, 1–39.
- Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., Johnson, K.N., 2008. *Wolbachia* and Virus Protection in Insects. *Science*, 322(5902), 702–702.
<https://doi.org/10.1126/science.1162418>
- Hertig, M., Wolbach, S.B., 1924. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *The Journal of medical research*, 44(3), 329–374.
- Hertig, M., 1936. The Rickettsia, *Wolbachia pipientis* (Gen. Et Sp. N.) and Associated Inclusions of the Mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, 28(4), 454–486.
<https://doi.org/10.1017/S0031182000022666>
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., Werren, J.H., 2008. How many species are infected with *Wolbachia*?-A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281(2), 215–220.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x>
- Hoffmann, A.A., Montgomery, B.L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P.H., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y.S., Dong, Y., Cook, H., Axford, J., Callahan, A.G., Kenny, N., Omodei, C., McGraw, E.A., Ryan, P.A., Ritchie, S.A., Turelli, S.A., Turelli, M., O'Neill, S.L., 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* population to suppress dengue transmission. *Nature*, 476(7361), 454–457.
- Hoffmann, A.A., Goundar, A.A., Long, S.A., Johnson, P.H., Ritchie, S.A., 2014a. Invasion of *Wolbachia* at the residential block level is associated with local abundance of *Stegomyia aegypti*, yellow fever mosquito, populations and property attributes. *Medical and Veterinary Entomology*, 28(S1), 90–97.
<https://doi.org/10.1111/mve.12077>
- Hoffmann, A.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Callahan, A.G., Phillips, B.L., Billington, K., Axford, J.K., Montgomery, B., Turley, A.P., O'Neill, S.L., 2014b. Stability of the wMel *Wolbachia* Infection following Invasion into *Aedes aegypti* Populations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003115>
- Hoffmann, A.A., Ross, P.A., Rašić, G., 2015. *Wolbachia* strains for disease control:

- Ecological and evolutionary considerations. *Evolutionary Applications*, 8(8), 751–768. <https://doi.org/10.1111/eva.12286>
- Hu, Y., Xi, Z., Liu, X., Wang, J., Guo, Y., Ren, D., Wu, H., Wang, X., Chen, B., Liu, Q., 2020. Identification and molecular characterization of *Wolbachia* strains in natural populations of *Aedes albopictus* in China. *Parasites & Vectors*, 13(1) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3899-4>
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hughes, G.L., Vega-Rodriguez, J., Xue, P., Rasgon, J.L., 2012. *Wolbachia* strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1491–1495. <https://doi.org/10.1128/AEM.06751-11>
- Hughes, G.L., Rivero, A., Rasgon, J.L., 2014. *Wolbachia* Can Enhance *Plasmodium* Infection in Mosquitoes: Implications for Malaria Control?. *PLoS Pathogens*, 10(9), 21–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004182>
- Huigens, M.E., Luck, R.F., Klaassen, R.H.G., Maas, M.F.P.M., Timmermans, M.J.T.N., Stouthamer, R., 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature*, 405(6783), 178–179. <https://doi.org/10.1038/35012066>
- Hurst, G.D.D., Jiggins, F.M., 2000. Male-killing bacteria in insects: Mechanisms, incidence, and implications. *Emerging Infectious Diseases*, 6(4), 329–336. <https://doi.org/10.3201/eid0604.000402>
- Ijichi, N., Kondo, N., Matsumoto, R., Shimada, M., Ishikawa, H., Fukatsu, T., 2002. Internal Spatiotemporal Population Dynamics of Infection with Three *Wolbachia* Strains in the Adzuki Bean Beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 4074–4080. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.4074>
- Ikeda, T., Ishikawa, H., Sasaki, T., 2003. Regulation of *Wolbachia* density in the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella*, and the Almond Moth, *Cadra cautella*. *Zoological science*, 20(2), 153–7. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.153>
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., O' Neill, S.L., 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Reports*, 12(6), 508–518.

- <https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>
- Iv, W.C.B., Rai, K.S., Turco, B.J., Arroyo, D.C., 1989. Laboratory Study of Competition Between United States Strains of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Entomological Society of America*, 26(4), 260–271.
- Jeffries, C.L., Walker, T., 2016. *Wolbachia* Biocontrol Strategies for Arboviral Diseases and the Potential Influence of Resident *Wolbachia* Strains in Mosquitoes. *Current Tropical Medicine Reports*, 3(3), 20–25.
<https://doi.org/10.1007/s40475-016-0066-2>
- Jeffries, C.L., Golovko, G., Kristan, M., Orsborne, J., Spence, K., Hurn, E., Bandibabone, J., Tantely, L.M., Raharimalala, F.N., Keita, K., Camara, D., Barry, Y., Watsenga, F., Manzambi, E.Z., Afrane, Y.A., Mohammed, A.R., Abeku, T.A., Hegde, S., Khanipov, K., Pimenova, M., Fofanov, Y., Boyer, S., Hughes, G.L., Walker, T., 2018. Novel *Wolbachia* strains in *Anopheles* malaria vectors from Sub-Saharan Africa. *Wellcome open Research*, 3.
<https://doi.org/10.1101/338434>
- Johnson, K.N., 2015a. The Impact of *Wolbachia* on Virus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, 7(11), 5705–5717. <https://doi.org/10.3390/v7112903>
- Johnson, K.N., 2015b. Bacteria and antiviral immunity in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* 8, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.008>
- Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M.C.J., 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open Research*, 3.
- Juliano, S.A., Lounibos, L.P., 2005. Ecology of invasive mosquitoes: Effects on resident species and on human health. *Ecology Letters*, 8(5), 558–574.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00755.x>
- Kamerow, D., 2014. The world's deadliest animal. *BMJ*, 348, 1–2.
<https://doi.org/10.1136/bmj.g3258>
- Kamtchum-Tatuene, J., Makepeace, B.L., Benjamin, L., Baylis, M., Solomon, T., 2016. The potential role of *Wolbachia* in controlling the transmission of emerging human arboviral infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(1), 108.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000342>
- Khrabrova, N. V., Sibataev, A.K., 2019. The distribution of *Wolbachia pipientis*

- strains in natural populations of *Culex pipiens* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Earth and Environmental Science*, 400(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/400/1/012012>
- Kittayapong, P., Baimai, V., O'Neill, S.L., 2002a. Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66,(1) 108–111.
- Kittayapong, P., Baisley, K.J., Sharpe, R.G., Baimai, V., O'Neill, S.L., 2002b. Maternal Transmission Efficiency of *Wolbachia* Superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(1), 103–107.
- Klasson, L., Walker, T., Sebaihia, M., Sanders, M.J., Quail, M.A., Lord, A., Sanders, S., Earl, J., O'Neill, S.L., Thomson, N., Sinkins, S.P., Parkhill, J., 2008. Genome Evolution of *Wolbachia* Strain wPip from the *Culex pipiens* Group. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1877–1887. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn133>
- Klasson, L., Kambris, Z., Cook, P.E., Walker, T., Sinkins, S.P., 2009. Horizontal gene transfer between *Wolbachia* and the mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-33>
- Kriesner, P., Hoffmann, A.A., Lee, S.F., Turelli, M., Weeks, A.R., 2013. Rapid Sequential Spread of Two *Wolbachia* Variants in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathogens*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003607>
- Kroeger, I., Liess, M., Dziöck, F., Duquesne, S., 2013. Sustainable control of mosquito larvae in the field by the combined actions of the biological insecticide Bti and natural competitors. *Journal of Vector Ecology*, 38(1), 82–89. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2013.12012.x>
- Kulkarni, A., Yu, W., J, J., Sanchez, C., Karna, A., Martinez, K.J., Hanley, K., Buenemann, M., Hansen, I., Xue, R., Etestad, P., Melman, S., Duguma, D., Debboun, M., Xu, J., 2019. *Wolbachia pipientis* occurs in *Aedes aegypti* populations in New Mexico and Florida, USA. *Ecology and Evolution*, 9(10).
- La Corte dos Santos, R., 2003. Updating of the distribution of *Aedes albopictus* in Brazil (1997-2002). *Revista de saúde pública*, 37(5), 671–673. <https://doi.org/S0034-89102003000500019> [pii]

- Lambrechts, L., Scott, T.W., Gubler, D.J., 2010. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000646>
- Landmann, F., 2019. The *Wolbachia* endosymbionts. *Bacteria and Intracellularly*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/9781683670261.ch10>
- Lau, M.J., Ross, P.A., Endersby-harshman, N.M., Hoffmann, A.A., 2020. Impacts of Low Temperatures on *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae)-Infected *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 57(5), 1567–1574.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjaa074>
- Lefoulon, E., Clark, T., Borveto, F., Perriat-Sanguinet, M., Moulia, C., Slatko, B.E., Gavotte, L., 2020. Pseudoscorpion *Wolbachia* symbionts: Diversity and evidence for a new supergroup S. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s12866-020-01863-y>
- Lizuain, A.A., Leporace, M., Santini, M.S., Utgés, M.E., Schweigmann, N., 2019. Update on the distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Misiones, Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 61, 1–6.
<https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961046>
- Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C., Bandi, C., 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist?. *Molecular Biology and Evolution*, 19(3), 341–346.
<https://doi.org/10.1080/13518040701205365>
- López-Madrugal, S., Duarte, E.H., 2019. Titer regulation in arthropod- *Wolbachia* symbioses. *FEMS Microbiology Letters*, 366(23), 1–19.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnz232>
- Lu, P., Bian, G., Pan, X., Xi, Z., 2012. *Wolbachia* Induces Density-Dependent Inhibition to Dengue Virus in Mosquito Cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001754>
- Ludueña Almeida, F.F., 1994. Ecología poblacional de *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* Macquart, 1838 (Diptera: Culicidae) en el arco sur de Mar Chiquita (Córdoba). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ludueña Almeida, F.F., Gorla, D.E., 1995. The biology of *Aedes (Ochlerotatus)*

- albifasciatus* Macquart, 1838 (Diptera: Culicidae) in central Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90(4), 463-468.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02761995000400006>
- Ma, W.J., Schwander, T., 2017. Patterns and mechanisms in instances of endosymbiont-induced parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(5), 868–888. <https://doi.org/10.1111/jeb.13069>
- Maddison, W., Maddison, D., 2007. Mesquite 2. *A Modular System for Evolutionary Analysis*. Available online at: <http://www.mesquiteproject.org>.
- Maimusa, H.A., Ahmad, A.H., Kassim, N.F.A., Rahim, J., 2016. Age-Stage, Two-Sex Life Table Characteristics of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Penang Island, Malaysia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 32(1), 1–11. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2987/moco-32-01-1-11.1>
- Manguin, S., Bangs, M.J., Pothikasikorn, J., Chareonviriyaphap, T., 2010. Review on global co-transmission of human *Plasmodium* species and *Wuchereria bancrofti* by *Anopheles* mosquitoes. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 159–177.
- McGraw, E.A., Merritt, D.J., Droller, J.N., O'Neill, S.L., 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1485), 2565–2570. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1839>
- McGraw, E.A., O'Neill, S.L., 2013. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 181–193.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2968>
- Mee, P.T., Weeks, A.R., Walker, P.J., Hoffmann, A.A., Duchemin, J.B., 2015. Detection of low-level *Cardinium* and *Wolbachia* infections in Culicoides. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6177–6188.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01239-15>
- Merçot, H., Poinot, D., 1998. *Wolbachia* transmission in a naturally bi-infected *Drosophila simulans* strain from New-Caledonia. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86(1), 97–103. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00269.x>
- Mieli, M. V., Maticchiero, A.C., Muttis, E., Fonseca, D.M., Aliota, M.T., Kramer, L.D., 2013. Vector Competence of Argentine Mosquitoes (Diptera: Culicidae)

- for West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus). *Journal of Medical Entomology*, 50(4), 853–862.
- Mieli, M. V., Glaser, R.L., 2014. Somatic *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Levels in *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) and Resistance to West Nile Virus Infection. *Journal of Medical Entomology*, 51(1), 189–199. <https://doi.org/10.1603/ME13152>
- Miller, W.J., Riegler, M., 2006. Evolutionary dynamics of wAu-like *Wolbachia* variants in neotropical *Drosophila* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 826–835. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.826-835.2006>
- Mitchell, C.J., Darsie, R.F., 1985. Mosquitoes of Argentina. Part II , Geographic Distribution and Bibliography (Diptera , Culicidae). *Mosquito Systematics*, 17(4), 279–360.
- Mitchell, C.J., Monath, T.P., Sabattini, M.S., Christensen, H.A., Darsie, R.F., Jakob, W.L., Daffner, J.F., 1987. Host-feeding patterns of Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected during and after an epizootic of western equine encephalitis. *Journal of medical entomology*, 24(2), 260–267. <https://doi.org/10.1093/jmedent/24.2.260>
- Mitchell, C.J., 1995. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean basin. *Journal of Vector Ecology*, 20(1), 44–58.
- Moore, C.G., Mitchell, C.J., 1997. *Aedes albopictus* in the United States: Ten-Year Presence and Public Health Implications. *Emerging Infectious Diseases*, 3(3), 329–334. <https://doi.org/10.3201/eid0303.970309>
- Morais, S.A., Almeida, F.D., Suesdek, L., Marrelli, M.T., 2012. Low Genetic Diversity in *Wolbachia*-infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54(6), 325–329. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652012000600007>
- Mordecai, E.A., Caldwell, J.M., Grossman, M.K., Lippi, C.A., Johnson, L.R., Neira, M., Rohr, J.R., Ryan, S.J., Savage, V., Shocket, M.S., Sippy, R., Stewart Ibarra, A.M., Thomas, M.B., Villena, O., 2019. Thermal biology of mosquito-borne disease. *Ecology Letters*, 22(10), 1690–1708. <https://doi.org/10.1111/ele.13335>

- Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L.E., Johnson, K.N., Kay, B.H., McGraw, E.A., van den Hurk, A.F., Ryan, P.A., O'Neill, S.L., 2009. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(139), 1268–1278.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
- Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T., Schaffner, F., Vazeille, M., Failloux, A.B., 2005. Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genetical research*, 86(1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0016672305007627>
- Mousson, L., Martin, E., Zouache, K., Madec, Y., Mavingui, P., Failloux, A.B., 2010. *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. *Molecular Ecology*, 19(9), 1953–1964. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04606.x>
- Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., Failloux, A.B., 2012. The Native *Wolbachia* Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001989>
- Mouton, L., Henri, H., Bouletreau, M., Vavre, F., 2003. Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Molecular Ecology*, 12(12), 3459–3465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02015.x>
- Mouton, L., Dedeine, F., Henri, H., Boulétreau, M., Profizi, N., Vavre, F., 2004. Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia-Asobara tabida* symbiosis. *Genetics Society of America*, 168(1), 181–189. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.026716>
- Mouton, L., Henri, H., Charif, D., Bouletreau, M., Vavre, F., 2007. Interaction between host genotype and environmental conditions affects bacterial density in *Wolbachia* symbiosis. *Biology Letters*, 3(2), 210–213.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0590>
- Multini, L.C., Wilke, A.B.B., Suesdek, L., Marrelli, M.T., 2016. Population genetic structure of *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*, 11(9), 4–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162328>
- Natiello, M., Ritacco, V., Morales, M.A., Deodato, B., Picollo, M., Dinerstein, E.,

- Enria, D., 2008. Indigenous Dengue Fever, Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), 1498–1499.
<https://doi.org/10.3201/eid1409.080143>
- Nazni, W.A., Hoffmann, A.A., Noor Afizah, A., Cheong, Y.L., Mancini, M. V., Kamarul, M.R.G., Arif, A.K.M., Thohir, H., Nur Syamimi, H.S., Nur, M.Z., Aqmar, Z., Ruqqayah, M.M.N., Syazwani, A.S.N., Faiz, A., Irfan, M.N.F.R., Nuradila, N., Nizam, M.M.N., Irwan, M.S.M., White, V.L., Ant, T.H., Herd, C., Hasnor, H.A., Bakar, R.A., Khadijah, K., Kamilan, D., Lee, S.C., Paid, M., Fadzilah, K., Gill, B.S., Sinkins, S.P., Lumpur, K., 2019. Establishment of *Wolbachia* strain wAlbB in Malaysian populations of *Aedes aegypti* for dengue control. *Current Biology*, 29(24), 4241-4248.
- Niang, E.H.A., Bassene, H., Makoundou, P., Fenollar, F., Weill, M., Mediannikov, O., 2018. First report of natural *Wolbachia* infection in wild *Anopheles funestus* population in Senegal. *Malaria Journal*, 17(1), 408.
<https://doi.org/10.1186/s12936-018-2559-z>
- Nicholas, K.B., 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnet News*, 4, 14.
- Nieva, L.B., Flores, L., Herrera, C.L., 2010. Composición de la dieta del pez introducido *Gambusia affinis* (Baird & Girard 1853) en cuerpos de agua permanentes vinculados al Rio Juramento, Dpto. Metan, Salta, Argentina. *Ciencia*, 5, 13–26.
- Noor Afizah, A., Roziah, A., Nazni, W.A., Lee, H.L., 2015. Detection of *Wolbachia* from field collected *Aedes albopictus* Skuse in Malaysia. *Indian Journal of Medical Research*, 142(2), 205–210. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.164259>
- Normark, B.B., 1996. Polyploidy of parthenogenetic *Aramigus tessellatus* (Say) (Coleoptera: Curculionidae). *The Coleopterists' Bulletin*, 73–79.
- Nugapola, N.W.N.P., De Silva, W.A.P.P., Karunaratne, S.H.P.P., 2017. Distribution and phylogeny of *Wolbachia* strains in wild mosquito populations in Sri Lanka. *Parasites & Vectors*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2174-9>
- O'Connor, L., Plichart, C., Sang, A.C., Brelsfoard, C.L., Bossin, H.C., Dobson, S.L., 2012. Open Release of Male Mosquitoes Infected with a *Wolbachia*

- Biopesticide: Field Performance and Infection Containment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001797>
- O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M.E., Karr, T.L., Robertson, H.M., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2699–2702.
- O'Neill, S.L., Ryan, P.A., Turley, A. P., Wilson, G., Retzki, K., Iturbe-Ormaetxe, I., Dong, Y., Kenny, N., Paton, C.J., Ritchie, S.A., Brown-Kenyon, J., Stanford, D., Wittmeier, N., Jewell, N.P., Tanamas, S.K., Anders, K.L., Simmons, C.P., 2019. Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from dengue and others *Aedes* transmitted arboviruses. *Gates Open Research*, 2.
- Osborne, S.E., Leong, Y.S., O'Neill, S.L., Johnson, K.N., 2009. Variation in Antiviral Protection Mediated by Different *Wolbachia* Strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathogens*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000656>
- Osborne, S.E., Iturbe-Ormaetxe, I., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., Johnson, K.N., 2012. Antiviral Protection and the Importance of *Wolbachia* Density and Tissue Tropism in *Drosophila simulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 6922–6929. <https://doi.org/10.1128/AEM.01727-12>
- Oyarzabal, M., Clavijo, J., Oakley, L., Biganzoli, F., Tognetti, P., Barberis, I., Maturo, H.M., Aragón, R., Campanello, P.I., Prado, D., Oesterheld, M., León, R.J.C., 2018. Unidades de vegetación de la Argentina. *Ecología Austral*, 28(1), 40–63. <https://doi.org/10.25260/ea.18.28.1.0.399>
- Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A.S., Xi, Z., 2012. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), E23–E31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108>
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., Fontenille, D., 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*, 11(14-15), 1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
- Paupy, C., Kassa Kassa, F., Caron, M., Nkoghé, D., Leroy, E.M., 2012. A Chikungunya Outbreak Associated with the Vector *Aedes albopictus* in Remote Villages of

- Gabon. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(2), 167–169.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0736>
- Pfaffl, M.W., 2004. Quantification strategies in real-time PCR. *A-Z of Quantitative PCR*. pp. 87–112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/s10551-011-0963-1>
- Pietri, J.E., DeBruhl, H., Sullivan, W., 2016. The rich somatic life of *Wolbachia*. *Microbiologyopen*, 5(6), 923–936. <https://doi.org/10.1002/mbo3.390>
- Poinsot, D., Charlat, S., Merçot, H., 2003. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: Confronting the models with the facts. *BioEssays*, 25(3), 259–265. <https://doi.org/10.1002/bies.10234>
- Rabinovich, J.E., Nieves, E.L., 2011. Vital Statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) Under Laboratory Conditions: III. *Rhodnius neglectus*. *Journal of Medical Entomology*, 48, 775–787.
- Raharimalala, F.N., Boukraa, S., Bawin, T., Boyer, S., Francis, F., 2016. Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes: first step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. *Parasitology Research*, 115(4), 1391–1399. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4873-5>
- Rai, K.S., 1991. *Aedes albopictus* in the Americas. *Annual Review of Entomology*, 36, 459–484. <https://doi.org/doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.002331>
- Rainey, S.M., Shah, P., Kohl, A., Dietrich, I., 2014. Understanding the *Wolbachia*-mediated inhibition of arboviruses in mosquitoes: Progress and challenges. *Journal of General Virology*, 95(3), 517–530.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.057422-0>
- Ramirez, J.L., Souza-neto, J., Cosme, R.T., Rovira, J., Ortiz, A., Juan, M., Dimopoulos, G., 2012. Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001561>
- Raquin, V., Moro, C.V., Saucereau, Y., Tran, F.H., Potier, P., Mavingui, P., 2015. Native *Wolbachia* from *Aedes albopictus* Blocks Chikungunya Virus Infection In Cellulo. *PLoS One*, 10(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125066>
- Rasgon, J.L., Scott, T.W., 2003. *Wolbachia* and Cytoplasmic Incompatibility in the

- California *Culex pipiens* Mosquito Species Complex: Parameter Estimates and Infection Dynamics in Natural Populations. *Genetics*, 165(4), 2029–2038.
- Rasgon, J.L., Scott, T.W., 2004. An initial survey for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infections in selected California mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41(2), 255–257.
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.2.255>
- RC, T., 2019. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austría.
- Reisen, W.K., Siddiqui, T.F., Aslam, Y., Malik, G.M., 1979. Geographic Variation Among the Life Table Characteristics of *Culex tritaeniorhynchus* from Asia. *Annals of the Entomological Society of America*, 72(5), 700–709.
<https://doi.org/10.1093/aesa/72.5.700>
- Reiter, P., Fontenille, D., Paupy, C., 2006. *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem?. *The Lancet infectious diseases*, 6(8), 463–464.
- Rey, J.R., Lounibos, P., 2015. Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión enfermedades. *Biomedica*, 35(2), 177–185.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2514>
- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A., Panning, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M.G., Majori, G.C., Cassone, A., 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*, 370(9602), 1840–1846.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6)
- Rezza, G., 2012. *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. *BMC Public Health*, 12(1), 72. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-72>
- Ritchie, S., 2014. Rear and release: A new paradigm for dengue control. *Austral Entomology*, 53(4), 363–367. <https://doi.org/10.1111/aen.12127>
- Ritchie, S.A., 2018. *Wolbachia* and the near cessation of dengue outbreaks in Northern Australia despite continued dengue importations via travellers. *Journal of Travel Medicine*, 25(1), 1–3. <https://doi.org/10.1093/jtm/tay084>
- Rodriguero, M.S., Confalonieri, V.A., Guedes, J.V.C., Lanteri, A.A., 2010. *Wolbachia* infection in the tribe Naupactini (Coleoptera, Curculionidae): association

- between thelytokous parthenogenesis and infection status. *Insect Molecular Biology*, 19(5), 631–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01018.x>
- Rodriguero, M.S., 2013. *Wolbachia*, una pandemia con posibilidades. *Revista de la Sociedad Entomologica de Argentina*, 72(3), 117–137.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Ros, V.I.D., Fleming, V.M., Feil, E.J., Breeuwer, J.A.J., 2009. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1128/AEM.01109-08>
- Ross, P.A., Wiwatanaratnabutr, I., Axford, J.K., White, V.L., Endersby-Harshman, N.M., Hoffmann, A.A., 2017. *Wolbachia* Infections in *Aedes aegypti* Differ Markedly in Their Response to Cyclical Heat Stress. *PLoS Pathogens*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006006>
- Ross, P.A., Ritchie, S.A., Axford, J.K., Hoffmann, A.A., 2019a. Loss of cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* under field conditions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007357>
- Ross, P.A., Turelli, M., Hoffmann, A.A., 2019b. Evolutionary Ecology of *Wolbachia* Releases for Disease Control. *Annual Review of Genetics*, 53, 93–116. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043609>
- Ross, P.A., Axford, J.K., Yang, Q., Staunton, K.M., Ritchie, S.A., Richardson, K.M., Hoffmann, A.A., 2020a. Heatwaves cause fluctuations in *wMel* *Wolbachia* densities and frequencies in *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007958>
- Ross, P.A., Callahan, A.G., Yang, Q., Jasper, M., Arif, M.A.K., Afizah, A.N., Nazni, W.A., Hoffmann, A.A., 2020b. An elusive endosymbiont: Does *Wolbachia* occur naturally in *Aedes aegypti*?. *Ecology and Evolution*, 10(3), 1581–1591.

<https://doi.org/10.1002/ece3.6012>

- Rossi, G.C., Pascual, N.T., Krsticevic, F.J., 1999. First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(3), 422.
- Rossi, G.C., Lestani, E.A., D’Oria, J.M., 2006. Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera: Culicidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 65(3-4), 51–56.
- Rossi, P., Ricci, I., Cappelli, A., Damiani, C., Ulissi, U., Mancini, M. V., Valzano, M., Capone, A., Epis, S., Crotti, E., Chouaia, B., Scuppa, P., Joshi, D., Xi, Z., Mandrioli, M., Sacchi, L., Neill, S.L.O., Favia, G., 2015. Mutual exclusion of *Asaia* and *Wolbachia* in the reproductive organs of mosquito vectors. *Parasites & vectors*, 8(278). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0888-0>
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P., Solignac, M., 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 250(1328), 91–98. <https://doi.org/10.1098/rspb.1992.0135>
- Rowley, S.M., Raven, R.J., McGraw, E.A., 2004. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Current Microbiology*, 49(3), 208–214. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4346-z>
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols*. Humana Press, Totowa, Nj
- Rozilawati, H., Mohd Masri, S., Tanaselvi, K., Mohd Zahari, T.H., Zairi, J., Nazni, W.A., Lee, H.L., 2017. Life table characteristics of Malaysian strain *Aedes albopictus* (Skuse). *Serangga*, 22, 85–121.
- RStudio, T., 2017. RStudio: Integrated Development Environment for R. *RStudio, Inc, Bost. MA*.
- Rubio, A., Cardo, M. V., Vezzani, D., Carbajo, A.E., 2020. *Aedes aegypti* spreading in South America: New coldest and southernmost records. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115(4), 2–5. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190496>
- Ruiling, Z., Tongkai, L., Dezhen, M., Zhong, Z., 2017. Genetic characters of the globally spread tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae):

- implications from mitochondrial gene COI. *Journal of Vector Ecology*, 43(1), 89–97. <https://doi.org/10.1111/jvec.12287>
- Rusconi, J.M., Di Battista, C., Balcazar, D., Rosales, M., Achinelly, M.F., 2020. *Amphimermis enzoni* n. sp. (Nematoda: Mermithidae) parasitizing damselflies and dragonflies in Argentina. *Journal of Nematology*, 52(1). <https://doi.org/10.21307/JOFNEM-2020-051>
- Sakamoto, H., Ishikawa, Y., Sasaki, T., Kikuyama, S., Tatsuki, S., Hoshizaki, S., 2005. Transinfection reveals the crucial importance of *Wolbachia* genotypes in determining the type of reproductive alteration in the host. *Genetical Research*, 85(3), 205–210. <https://doi.org/10.1017/S0016672305007573>
- Sanaei, E., Charlat, S., Engelstädter, J., 2020. *Wolbachia* host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences. *Biological Reviews*, 92(2), 433–453. <https://doi.org/10.1111/brv.12663>
- Sasaki, T., Ishikawa, H., 2000. Transinfection of *Wolbachia* in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection. *Heredity*, 85(2), 130–135. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.00734.x>
- Sasaki, T., Massaki, N., Kubo, T., 2005. *Wolbachia* variant that induces two distinct reproductive phenotypes in different hosts. *Heredity*, 95(5), 389–393. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800737>
- Schwartz, L.M., Halloran, M.E., Durbin, A.P., Longini, I.M., 2015. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine*, 33(29), 3293–3298. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.010>
- Schweigmann, N., Vezzani, D., Orellano, P., Kuruc, J., Boffi, R., 2004. *Aedes albopictus* in an area of Misiones, Argentina. *Revista de Saude Publica*, 38(1), 136–138. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102004000100020>
- Shaw, W.R., Marcenac, P., Childs, L.M., Buckee, C.O., Baldini, F., Sawadogo, S.P., Dabiré, R.K., Diabaté, A., Catteruccia, F., 2016. *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with *Plasmodium* development. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms11772>
- Sievers, F., Higgins, D.G., 2014. Clustal Omega, accurate alignment of very large number of sequences. *In Multiple sequence alignment methods*. Humana

- Press, Totowa, NJ.
- Singh, A., Pandey, G.K., 2015. Primer design using primer express® for SYBR green-based quantitative PCR. In *PCR primer design*. Humana Press, New York, NY.
- Sinkins, S.P., Braig, H.R., O'Neill, S.L., 1995a. *Wolbachia pipientis*: Bacterial Density and Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility between Infected Populations of *Aedes albopictus*. *Experimental Parasitology*, 81(3), 284-291.
<https://doi.org/10.1006/expr.1995.1119>
- Sinkins, S.P., Braig, H.R., O'Neill, S.L., 1995b. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 261(1362), 325–330.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0154>
- Sinkins, S.P., 2004. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(7), 723–729.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.025>
- Sinkins, S.P., 2013. *Wolbachia* and arbovirus inhibition in mosquitoes. *Future Microbiology*, 8(10), 1249–1256.
- Smith, J.L., Fonseca, D.M., 2004. Rapid Assays for Identification of Members of the *Culex (Culex) pipiens* Complex, Their Hybrids, and Other Sibling Species (Diptera: Culicidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(4), 339–345. <https://doi.org/10.1093/ajtmh/70.4.339> [pii]
- Sprenger, D., Wuithiranyagool, T., 1986. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2(2), 217–219.
- Spruyt, M., Buquicchio, F., 1994. Gene runner version 3.05. Website <http://www.generunner.net/> [accessed 10 April 2015].
- Stouthamer, R., Kazmer, D.J., 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, 73(3), 317–327. <https://doi.org/10.1038/hdy.1994.139>
- Stratagene, 2007. Introduction to Quantitative PCR - Methods and Applications Guide.
- Teixeira, L., Ferreira, A., Ashburner, M., 2008. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS*

- Biology*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002>
- Thanchomnang, T., Intapan, P.M., Tantrawatpan, C., Lulitanind, V., Chungpivat, S., Taweethavonsawat, P., Kaewkong, W., Sanpool, O., Janwan, P., Choochote, W., Maleewong, W., 2013. Rapid detection and identification of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. pahangi*, and *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and blood samples by high resolution melting real-time PCR. *The Korean Journal of Parasitology*, 51(6), 645.
- Thomas, S., Obermayr, U., Fischer, D., Kreyling, J., Beierkuhnlein, C., 2012. Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, 5(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-100>
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Thongsripong, P., Chandler, J.A., Green, A.B., Kittayapong, P., Wilcox, B.A., Kapan, D.D., Bennett, S.N., 2018. Mosquito vector-associated microbiota: Metabarcoding bacteria and eukaryotic symbionts across habitat types in Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. *Ecology and Evolution*, 8(2), 1352–1368. <https://doi.org/10.1002/ece3.3676>
- Tortosa, P., Charlat, S., Labbé, P., Dehecq, J.S., Barré, H., Weill, M., 2010. *Wolbachia* Age-Sex-Specific Density in *Aedes albopictus*: A Host Evolutionary Response to Cytoplasmic Incompatibility?. *PLoS One*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009700>
- Tranchida, M.C., Pelizza, S.A., Bisaro, V., Beltrán, C., García, J.J., Micieli, M. V., 2010. Use of the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* for long-term control of *Culex pipiens* L. in Argentina. *Biological Control*, 53(2), 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.006>
- Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., McGee, C.E., Higgs, S., 2007. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathogens*, 3(12), 1895–1906. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>

- Tsuda, Y., Takagi, M., Suzuki, A., Wada, Y., 1994. A Comparative Study on Life Table Characteristics of Two Strains of *Aedes albopictus* from Japan and Thailand. *Tropical Medicine*, 36(1), 15–20.
- Turelli, M., Hoffmann, A., 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature*, 353(6343), 440–442.
- Turelli, M., Hoffmann, A.A., 1995. Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila simulans*: Dynamics and Parameter Estimates from Natural Populations. *Genetics*, 140(4), 1319–1338.
- Turelli, M., 2010. Cytoplasmic incompatibility in populations with overlapping generations. *Evolution*, 64(1), 232–241. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00822.x>
- Ulrich, J.N., Beier, J.C., Devine, G.J., Hugo, L.E., 2016. Heat Sensitivity of wMel *Wolbachia* during *Aedes aegypti* Development. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004873>
- Untergasser, A., Niveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35 (suppl_2), W71-W74.
- van den Hurk, A.F., Hall-Mendelin, S., Pyke, A.T., Frentiu, F.D., McElroy, K., Day, A., Higgs, S., O'Neill, S.L., 2012. Impact of *Wolbachia* on Infection with Chikungunya and Yellow Fever Viruses in the Mosquito Vector *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001892>
- Vandekerckhove, T.T.M., Watteyne, S., Willems, A., Swings, J.G., Mertens, J., Gillis, M., 1999. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiology Letters*, 180(2), 279–286. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00499-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00499-1)
- Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B., Lourenço-de-Oliveira, R., 2014. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *Journal of Virology*, 88(11), 6294–306. <https://doi.org/10.1128/JVI.00370-14>
- Vezzani, D., Carbajo, A.E., 2008. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in

- Argentina: Current knowledge and future directions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 66–74. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000003>
- Vittori, E., Couvert-Mullot, H., Barigault, N., Giraud, C., 2016. Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular Ecology*, 25(22), 5806–5826. <https://doi.org/10.5061/dryad.qs43p.Coon>
- Walker, T., Song, S., Sinkins, S.P., 2009. *Wolbachia* in the *Culex pipiens* Group Mosquitoes: Introgression and Superinfection. *Journal of Heredity*, 100(2), 192–196. <https://doi.org/10.1093/jhered/esn079>
- Walker, T., Johnson, P.H., Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F.D., McMeniman, C.J., Leong, Y.S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A.L., Ritchie, S.A., O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476(7361), 450–455. <https://doi.org/10.1038/nature10355>
- Walker, T., Moreira, L.A., 2011. Can *Wolbachia* be used to control malaria?. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 212–217. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900026>
- Wang, G.H., Jia, L.Y., Xiao, J.H., Huang, D.W., 2016. Discovery of a new *Wolbachia* supergroup in cave spider species and the lateral transfer of phage WO among distant hosts. *Infection, Genetics and Evolution*, 41, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.015>
- Weinert, L.A., Araujo-Jnr, E. V., Ahmed, M.Z., Welch, J.J., 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1807), 20150249. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0249>
- Werren, J.H., Windsor, D., Guo, L.R., 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 262(1364), 197–204. <https://doi.org/doi.org/10.1098/rspb.1995.0196>
- Werren, J.H., Zhang, W., Guo, L.R., 1995b. Evolution and Phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive Parasites of Arthropods. *Proceedings of the Royal Society of*

- London. *Series B: Biological Sciences*, 261(1360), 55–71.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0117>
- Werren, J.H., 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 587–609. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.ento.42.1.587>
- Werren, J.H., Baldo, L., Clark, M.E., 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741–751.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- WHO, 2014. Yellow fever. No. WHO-EM/MAC/038/A. *World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean*.
- Wiwatanaratnabutr, I., Kittayapong, P., 2009. Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(3), 220–224.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.08.009>
- Wiwatanaratnabutr, I., 2013. Geographic distribution of wolbachial infections in mosquitoes from Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(3), 337–340.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.04.011>
- Wiwatanaratnabutr, S., Kittayapong, P., 2006. Effects of temephos and temperature on *Wolbachia* load and life history traits of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(3), 300–307.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00640.x>
- Woffelman, C., 1994. DNAMAN for Windows, version 2.6. *Lynon Biosoft, Institute of Molecular Plant Science, Leiden University, the Netherlands*.
- Wong, M.L., Liew, J.W.K., Wong, W.K., Pramasivan, S., Mohamed Hassan, N., Wan Sulaiman, W.Y., Jeyaprakasam, N.K., Leong, C.S., Low, V.L., Vythilingam, I., 2020. Natural *Wolbachia* infection in field-collected *Anopheles* and other mosquito species from Malaysia. *Parasites and Vectors*, 13(414).
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04277-x>
- Woolfit, M., Iturbe-Ormaetxe, I., McGraw, E.A., O'Neill, S.L., 2009. An Ancient Horizontal Gene Transfer Between Mosquito and the Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia pipientis*. *Molecular Biology and Evolution*, 26(2), 367–374.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn253>
- Wright, J.D., Barr, A.R., 1980. The Ultrastructure and Symbiotic Relationships of

- Wolbachia* of Mosquitoes of the *Aedes scutellaris* Group. *Journal of Ultrastructure Research*, 72(1), 52–64. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(80\)90135-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(80)90135-5)
- Xi, Z., Khoo, C.C.H., Dobson, S.L., 2005. *Wolbachia* Establishment and Invasion in an *Aedes aegypti* Laboratory Population. *Science*, 310(5746), 326–328. <https://doi.org/10.1126/science.11117607>
- Yang, D., He, Y., Ni, W., Lai, Q., Yang, Y., Xie, J., Zhu, T., Zhou, G., Zheng, X., 2020. Semi-field life-table studies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Guangzhou, China. *PLoS One*, 15(3), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229829>
- Ye, Y.H., Carrasco, A.M., Dong, Y., Sgrò, C.M., McGraw, E.A., 2016. The effect of temperature on *Wolbachia*-mediated dengue virus blocking in *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(4), 812–819. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0801>
- Yen, P.S., Failloux, A.B., 2020. A review: *Wolbachia*-based population replacement for mosquito control shares common points with genetically modified control approaches. *Pathogens*, 9(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050404>
- Zambrini, D.A.B., 2011. Lecciones desatendidas entorno a la epidemia de dengue en Argentina, 2009. *Revista de Saude Publica*, 45(2), 428–431. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102011000200023>
- Zanotti, G., De Majo, M.S., Alem, I., Schweigmann, N., Campos, R.E., Fischer, S., 2015. New records of *Aedes aegypti* at the southern limit of its distribution in Buenos Aires province, Argentina. *Journal of Vector Ecology*, 40(2), 408–411. <https://doi.org/10.1111/jvec.12181>
- Zhang, D., Zhan, X., Wu, X., Yang, X., Liang, G., Zheng, Z., Li, Z., Wu, Y., Zheng, X., 2014. A field survey for *Wolbachia* and phage WO infections of *Aedes albopictus* in Guangzhou City, China. *Parasitology Research*, 113(1), 399–404. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3668-9>
- Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S., 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1395), 509–515.

<https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>

Zouache, K., Voronin, D., Tran-Van, V., Mousson, L., Failloux, A.B., Mavingui, P., 2009. Persistent *Wolbachia* and Cultivable Bacteria Infection in the Reproductive and Somatic Tissues of the Mosquito Vector *Aedes albopictus*.

PLoS One, 4(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006388>

Zug, R., Hammerstein, P., 2012. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected.

PLoS One, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038544>

APÉNDICE: Soluciones utilizadas en el laboratorio de biología molecular

➤ Soluciones utilizadas en la electroforesis en geles de agarosa Buffer TBE 5X

Tris Base-----54 gr
Ácido Bórico-----27,5 gr
EDTA-Na 0,5M (pH8)-----20 ml
H₂O destilada-----hasta completar 1000 ml

➤ Solución de agarosa

Agarosa-----1gr
Buffer TBE 1X-----100 ml

➤ Tampón de homogeneización del protocolo fenol-cloroformo

Preparación para un volumen final de 10 ml:

SDS 10% -----1 ml
EDTA 0,5M----- 500µl
NaCl 5M -----150µl
Tris HCl (pH 8) 1M -----100µl
ARNasa (1,0 µg/µl) -----10µl
Proteinasa K (20 mg/ml) --250µl
Agua destilada -----8 ml