



Cómo combatir con bacterias a las enfermedades infecciosas parasitarias

El caso de *Wolbachia pipientis*

Gabriel Alberto March-Rosselló,^a José María Eiros-Bouza^b

How to fight parasitic infectious diseases with bacteria. The case of *Wolbachia pipientis*

In Nature, no individual can live in isolation; hence, living organisms are forced to interact with each other. This necessity has led many organisms to establish heterogeneous relations to enhance their ability to adapt to the environment, thus acquiring evolutionary advantages. These relationships are sometimes so intense, that on the long term the organisms may lose their individual identity. An example of these associations is the endosymbiotic ones, where eukaryote organisms generally harbor different prokaryote organisms. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia pipientis* is a species described by Hertig and Wolbach in 1924. This microorganism can be isolated in a large variety of eukaryote organisms, with which it maintains different links. Until now, this species has only been described with 11 serogroups numbered from A to K within the *Wolbachia* genus. This work is intended to illustrate the relationship of *Wolbachia pipientis* with human pathogenic filaria and with arthropods, as well as to describe the implications of this bacterium in the treatment of filariasis. Finally, this work tries to describe recent studies that have targeted the use of artificially-created *Wolbachia pipientis* virulent strains that, once inoculated in infectious diseases-transmitting vectors, develop negative effects within them in order to, in this way, eradicate mosquito-transmitted infectious diseases for which no treatment is available at the moment or the prevention of its transmissibility has not been achieved.

Keywords	Palabras clave
Symbiosis	Simbiosis
Bacteria	Bacterias
Wolbachia	Wolbachia

La teoría endosimbiótica, descrita en 1967, explica la formación de la célula eucariota mediante la integración sucesiva de organismos procariotas y considera este proceso como el motor evolutivo de las diferentes especies. La identificación del ácido desoxirribonucleico circular que poseen las mitocondrias y los cloroplastos, que supondría el remanente de un cromosoma bacteriano, apoya esta teoría.¹

Con esta teoría se deduce que las bacterias pueden presentar un comportamiento muy diferente al del hombre: cuando su supervivencia está en peligro, en lugar de manifestar una conducta destructiva con el resto de los individuos, pueden asociarse con otros organismos para superar las dificultades, aunque a la larga pierdan su identidad individual. Este fenómeno fue descrito por el botánico alemán Anton de Bary en 1873, quien acuñó el término *simbiosis* para describir la vida en conjunción de dos organismos distintos, normalmente en íntima asociación, por lo general con efectos beneficiosos para al menos uno de ellos. Cuando esta relación desemboca en la creación de un nuevo tipo de individuo se alude a *simbiogénesis*, en la que los organismos resultantes poseen súbitas características novedosas.²

La *endosimbiosis* es un tipo de simbiosis que representa la interacción más íntima entre organismos, en la que un ser vivo (generalmente un microorganismo) vive dentro de su hospedador (normalmente un ser eucariota). Se puede clasificar en obligada, facultativa, parasitaria, mutualista o comensalista.³ De esta interacción resulta que tan solo el genoma humano contiene una enorme cantidad de material genético de retrovirus endógenos derivados de antiguas infecciones víricas que han permanecido en él y que, tras numerosas replications y translocaciones, intervienen en procesos como el desarrollo embrionario.⁴ Además, la mayoría de los ecosistemas terrestres depende de la simbiosis; 90 % de las plantas mantiene relaciones simbióticas con hongos en sus raíces.²

La bacteria endosimbiótica *Wolbachia pipientis* fue descrita en 1924 por Hertig y Wolbach, quienes la encontraron en diversos tejidos, sobre todo en los reproductivos del mosquito *Culex pipiens*, de ahí su denominación.⁵ Filogenéticamente se incluye en *Phylum proteobacteria*, orden *Rickettsiaceae*, familia *Anaplasmataceae* y género *Wolbachia*. Hasta el momento solo se ha descrito esta especie dentro del género. Existen 11 serogrupos enumerados de la A a la

^aFacultad de Medicina, Universidad de Valladolid, España

^bHospital Clínico Universitario de Valladolid, España

Comunicación con: Gabriel Alberto March-Rosselló

Teléfono: (34) 9834 23023

Correo electrónico: gmr810@hotmail.com

Recibido: 26/12/2013

Aceptado: 28/05/2014

En la naturaleza ningún individuo puede vivir de forma aislada, de tal forma que los organismos vivos se ven obligados a interactuar unos con otros. Esta necesidad ha llevado a que diferentes organismos establezcan relaciones heterogéneas para mejorar su capacidad de adaptación al medio, obteniendo así ventajas evolutivas. Estas relaciones a veces son tan intensas que a la larga los organismos pueden perder su identidad individual. Un ejemplo de estas asociaciones son las endosimbíóticas, en las cuales generalmente organismos eucariotas albergan a diferentes organismos procariotas. La bacteria endosimbíótica *Wolbachia pipientis* es una especie descrita en 1924 por Hertig y Wolbach. Este microorganismo se puede aislar en gran variedad de organismos eucariotas, con los que mantiene dife-

rentes vínculos. Hasta el momento solo se ha descrito esta especie con 11 serogrupos enumerados de la A a la K dentro del género *Wolbachia*. En este trabajo se pretende ilustrar la relación de *Wolbachia pipientis* con las filarias patógenas humanas y con los artrópodos, así como describir las implicaciones de esta bacteria en el tratamiento de las filarías. Finalmente, se pretende exponer los estudios recientes que han apuntado el uso de cepas virulentas de *Wolbachia pipientis* creadas artificialmente que una vez inoculadas en los vectores transmisores de enfermedades desarrollan efectos negativos en estos, para lograr la erradicación de enfermedades infecciosas transmitidas por mosquitos contra las cuales, de momento, no existe tratamiento o no se ha logrado impedir su transmisibilidad.

Resumen

K. Los serogrupos C y D están presentes en las filarías y el resto de los serogrupos se localiza en los artrópodos (insectos, arácnidos, garrapatas y crustáceos).⁶ Esta división es importante porque *Wolbachia pipientis* mantiene diferentes relaciones con las filarías y los artrópodos.

Wolbachia pipientis en los nematodos

Se ha encontrado *Wolbachia pipientis* en *Onchocerca volvulus*, agente causal de la ceguera de los ríos, en *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* (causantes de filarías linfáticas), *Dirofilaria immitis* y *Mansonella perstans*. Es decir, está presente en la mayoría de las filarías patógenas humanas, excepto en *Loa loa*.⁷ Estudios inmunohistoquímicos y con microscopio electrónico indican que se distribuye en las cuerdas laterales de machos y hembras,⁸ donde forma grupos de poblaciones homogéneas. Es decir, entre las *Wolbachia pipientis* presentes en las filarías no se dan fenómenos de recombinación genética, por lo que puede aislarse siempre la misma cepa.⁹ Hasta el momento no se han detectado diferentes cepas en una misma especie de filaria hospedadora.¹⁰ *Wolbachia pipientis* también puede encontrarse en el sistema reproductivo femenino, en los oocitos y dentro del contenido uterino de las filarías adultas, pero no en el masculino.

El tropismo tisular ocurre durante el desarrollo embrionario, etapa en la que *Wolbachia pipientis* se localiza en la parte posterior de los huevos de tal forma que se transmiten aproximadamente 70 bacterias a cada embrión de microfilaria.¹¹ Estas bacterias acompañan a las filarías en todos los estadios evolutivos que tienen lugar a lo largo de su ciclo biológico.⁸ Se ha observado que el número de bacterias es máximo durante el periodo embrionario y larvario y que hay un pico en la fase L4, momento en el que la microfilaria penetra en el hombre e invade.¹²

Wolbachia pipientis puede dividirse de forma muy parecida a las clamidias, mediante la formación de cuerpos elementales.¹³ *Wolbachia pipientis* no presenta fase extracelular y siempre estará localizada dentro de las vacuolas de las células eucariotas.⁸ De esta forma, la bacteria se transmite únicamente de forma vertical desde la filaria hembra a la descendencia mediante el citoplasma del huevo fecundado y no del espermatozoide.

Actualmente se conocen los metabolitos aportados entre los simbioses: el nematodo proporciona a la bacteria los aminoácidos que requiere para su crecimiento¹⁰ y, por su parte, *Wolbachia pipientis* proporciona las rutas metabólicas de biosíntesis del grupo hemo y de los nucleótidos esenciales para la embriogénesis (riboflavina y flavín adenín dinucleótido), que están ausentes en la filaria adulta,¹⁴ así como cierta protección frente al estrés oxidativo al cederle glutatión a esta. Además, el pico de *Wolbachia* en L4 se relaciona con la evasión del sistema inmunitario del hospedador, con lo que aumenta su supervivencia.¹⁵ Un hallazgo sorprendente en *Loa loa*, una filaria que no presenta esta bacteria endosimbíótica, es la presencia de los genes de *Wolbachia pipientis* por el mecanismo de transferencia lateral de genes.¹⁶

Wolbachia pipientis desempeña un papel importante en la patogénesis de las enfermedades infecciosas y en la inducción de reacciones inflamatorias adversas en el ser humano. La liberación de *Wolbachia pipientis* y de sus productos desde el nematodo, por la administración de fármacos filaricidas, estimula la respuesta inmune innata y adaptativa mediante el reconocimiento de lipoproteínas como receptores tipo Toll 2 y 6. Cabe destacar que esta bacteria, pese a ser gramnegativa, no posee el lipopolisacárido responsable del efecto inmunogénico. Esta respuesta ha sido atribuida a la proteína de superficie de *Wolbachia pipientis*.¹⁷

Taylor *et al.*¹⁸ y Saint-André *et al.*¹⁹ observaron que extractos solubles de filarías adultas de *Brugia malayi* o

Cuadro I Efectos observados como consecuencia de la eliminación de la bacteria endosimbiótica *Wolbachia pipientis*

Especie	Antibiótico	Efectos	Referencias
En las filarias			
<i>Brugia malayi</i>	Tetraciclina/rifamicina	Reducción de la motilidad, viabilidad y liberación de microfilarias	23 y 24
<i>Dirofilaria immitis</i>	Tetraciclinas	Embriotóxico, inhibe la muda L3/L4 y la transmisión transovárica	24 y 25
En humanos parasitados con filarias			
<i>Onchocerca volvulus</i>	Doxiciclina	Embriotóxico, amicrofilaridermia después del tratamiento con ivermectina	26, 27 y 28
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Doxiciclina	Macrofilaricida, amicrofilaria	29
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Doxiciclina	Disminución de la severidad de las reacciones adversas tras la administración de ivermectina y albendazol	30

de microfilarias inducen una potente respuesta inmune. Este efecto no se observa si previamente se eliminan las bacterias de las filarias mediante antibióticos o si se usan extractos solubles de filarias que no contienen la bacteria endosimbiótica, como *Loa loa*.¹⁸

Se ha observado que la mayor concentración bacteriana en sangre se correlaciona con el incremento de reacciones adversas y con niveles altos de factor de necrosis tumoral alfa, neutrófilos y péptidos antibacterianos.²⁰ Las células proinflamatorias desencadenan daño a los tejidos parasitados, entre ellos la córnea y los vasos linfáticos.²¹ La inflamación mediada por neutrófilos también es una característica de la parasitación ocular que sigue a la muerte de las microfilarias de *Onchocerca volvulus* en la córnea.²² Este efecto no se ha observado cuando se han realizado estudios en animales con filarias o microfilarias de *Onchocerca volvulus* exentas de *Wolbachia pipientis*.¹⁹

La eliminación de la *Wolbachia pipientis* repercute en las filarias que la contienen. Las tetraciclinas son efectivas contra las rickettsias y han mostrado efectos en la *Wolbachia pipientis*. En el cuadro I se describen los efectos en las filarias como consecuencia de la eliminación de esta. Algunas investigaciones señalan que la eliminación provoca apoptosis de las células reproductivas, inhibición de muda de L3/L4 y destrucción de los embriones y de las microfilarias.²³⁻²⁵ Además, indican que el parasitismo obligado implica la reducción del genoma del endosimbionte. En este sentido, se ha observado que las *Wolbachia pipientis* presentes en las filarias tienen un genoma más pequeño que las aisladas en los artrópodos, en los cuales las bacterias presentan relaciones facultativas no obligadas.¹⁰

La eliminación de la *Wolbachia pipientis* también repercute en los humanos parasitados con filarias. En el cuadro I se resumen los efectos identificados en diferentes estudios. Hoerauf et al.²⁶⁻²⁸ describieron que la administración de 200 mg/día de doxiciclina durante seis semanas reduce más de 95 % los niveles de *Wolbachia pipientis* en las filarias, con lo que se logra una amicrofilaria que perdura durante casi dos años después del tratamiento con ivermectina. Por su parte, Taylor et al.²⁹ obtuvieron un efecto macrofilaricida con amicrofilaria mediante la administración de 200 mg/día de doxiciclina durante ocho semanas. Finalmente, en sujetos con parasitaciones por *Wuchereria bancrofti*, Turner et al.³⁰ observaron que la administración de doxiciclina durante tres semanas disminuye la severidad de las reacciones adversas en la prueba de Mazzotti, que consiste en la administración de ivermectina para observar los efectos de la destrucción masiva de las microfilarias. En un grupo de pacientes en los que se administró doxiciclina y posteriormente ivermectina se registró menor incidencia de fiebre, exantema, prurito, adenopatías y artralgias, en comparación con otro grupo también parasitados por *Wuchereria bancrofti* en el que se administró ivermectina pero no doxiciclina.

Los efectos antifilaricidas de los antibióticos son el resultado de la actividad hacia *Wolbachia pipientis*, debido a que los antibióticos no tienen efecto en las filarias libres de ella³¹ y a que los efectos antibacterianos preceden a los antifilaricidas.²⁶ De ahí la posibilidad de utilizar antibióticos que perjudiquen a las filarias, no por su efecto sobre el parásito sino por su acción sobre la *Wolbachia*, lo que ha planteado nuevas posibilidades para tratar la oncocercosis y la filariasis linfática.

Wolbachia pipientis en los artrópodos

El 70 % de las especies de insectos en el mundo presentan *Wolbachia pipientis*,³² la cual también está presente en garrapatas, ácaros, arañas, escorpiones, crustáceos e, incluso, plantas, lo que la convierte en la bacteria endosimbiótica con mayor distribución en el planeta.³³

La distribución y relación de *Wolbachia pipientis* con los artrópodos es diferente que con las filarias, y en ellos no todos los sujetos de una especie presentan la bacteria. En los insectos, además de la transmisión vertical de la bacteria, puede existir recombinación genética entre *Wolbachia pipientis* e infecciones causadas por diferentes cepas en un mismo hospedador.³⁴

Dado que *Wolbachia pipientis* se localiza principalmente en los tejidos reproductivos de las hembras y se transmite a la descendencia a través de los óvulos fecundados con la bacteria,³⁵ en los artrópodos se comporta como un parásito que manipula la reproducción de su hospedador reduciendo la participación del

macho, ya que no participa en su transmisión, y aumentando la adaptación,¹⁰ fecundidad y vida media de los hospedadores hembra.³⁶ Aunado a su papel de parásito, *Wolbachia pipientis* desarrolla un papel de beneficio para los artrópodos al favorecer la resistencia de estos a los patógenos,³⁷ aumentar su vida media,³⁸ participar en el metabolismo del hierro³⁹ y en la regulación del estrés oxidativo y de la apoptosis.⁴⁰

El sexo de la descendencia de los animales está determinado por los cromosomas, sin embargo, hay excepciones: en reptiles, peces y crustáceos, el sexo es determinado por factores ambientales como la temperatura o la luz o, incluso, por bacterias endosimbióticas que distorsionan la proporción de los sexos.⁴¹ De hecho, *Wolbachia pipientis* es la bacteria endosimbionte más común implicada en el parasitismo reproductivo y la única capaz de provocar los cuatro tipos de manipulaciones comúnmente reconocidos en la reproducción de los artrópodos:⁴²

- La incompatibilidad citoplasmática entre espermátovulo, que conduce a la formación de cigotos estériles cuando la fecundación tiene lugar entre machos y hembras que no están infectadas.
- La muerte selectiva de la descendencia masculina, que inclina la relación de sexos hacia las hembras.
- La conversión de los machos en hembras funcionales, que define la relación de sexos hacia las hembras.
- La inducción del desarrollo asexual de las hembras, las cuales ya no requieren la participación de células sexuales masculinas para la reproducción.

Control de enfermedades transmitidas por vectores mediante bacterias endosimbióticas

Las enfermedades parasitarias están entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en los humanos. El fracaso de las medidas preventivas de salud pública en los países donde existen los vectores y la ausencia de vacunas incrementan la severidad de estas enfermedades.³³ La malaria causa de uno a 2.5 millones de muertes al año⁴³ y el dengue provoca de 50 a 100 millones de casos por año.⁴⁴

Al igual que en las filarias, las bacterias endosimbióticas representan un blanco con el fin de erradicar las enfermedades parasitarias transmitidas por vectores, mediante la introducción de aquellas que ejerzan un efecto virulento sobre el vector que las porta. Este escenario es posible debido a que algunos vectores transmisores de enfermedades no poseen bacterias endosimbióticas.³³

De esta forma, la técnica de los insectos incompatibles se basa en la introducción de bacterias endosimbióticas virulentas en los vectores con el fin de lograr

la pérdida de transmisión de la enfermedad.⁴⁵ Esta pérdida de transmisibilidad puede darse mediante mecanismos como los siguientes:

- La generación de vectores incapaces de reproducirse debido a la incompatibilidad citoplasmática causada por la bacteria.⁴⁶
- La disminución de la vida media del vector,⁴⁷ en la que se aprovecha que la mayoría de los parásitos requiere un periodo extrínseco de incubación de ocho a 21 días para alcanzar la forma infectante y que solo los vectores que viven más que el periodo extrínseco de incubación transmiten la enfermedad.³³
- La disminución de la fecundidad.⁴⁸

Algunas investigaciones han evidenciado que cepas de *Wolbachia pipientis* insertadas en los vectores son capaces de interactuar directamente con los patógenos. En el cuadro II se resumen los estudios en los cuales se ha observado que esta bacteria puede interferir con una gran variedad de patógenos humanos.^{37,49-54}

Cuadro II Interacción entre cepas de *Wolbachia pipientis* y diferentes patógenos humanos dentro de los vectores de transmisión

Cepa <i>Wolbachia</i>	Especie de mosquito	Patógeno inhibido	Referencias
wMelPop-CLA	<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Plasmodium berghei</i> <i>Plasmodium falciparum</i>	49 y 50
wMelPop-CLA	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Plasmodium gallinaceum</i> , virus del dengue, virus <i>Chikungunya</i> , <i>Brugia pahangi</i>	51 y 52
wAlbB	<i>Aedes aegypti</i>	Virus del dengue	
wMel	<i>Aedes aegypti</i>	Virus del dengue	53, 54 y 37
wPip	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Virus "West Nile"	

En estudios abiertos orientados a lograr el control de las enfermedades mediante *Wolbachia pipientis*, la estrategia ha sido que el endosimbionte infecte con éxito cepas salvajes de los mosquitos transmisores. La habilidad de la bacteria para extenderse rápidamente ha sido descrita en cepas salvajes de insectos *Drosophila sp.*, en las cuales *Wolbachia* se extiende a razón de 100 km por año con una proporción de transmisión vertical de 100 %.⁵⁵ Con este propósito, adultos macho y hembra de *Aedes aegypti* infectados con *Wolbachia pipientis* wMel fueron recientemente liberados durante 10 semanas en primavera en dos lugares al noreste de Australia. Al cabo de unos meses, se observó que la cepa había invadido satisfactoriamente dos poblaciones salvajes de *Aedes aegypti*. Si bien la población de los insectos infectados aumentó durante los meses siguientes, un ciclón provocó la migración de los mosquitos.⁵⁶

Como conclusión podemos apuntar que la bacteria endosimbiótica *Wolbachia pipientis* es un endosimbionte obligado en los nematodos, necesaria para llevar a cabo la embriogénesis y el desarrollo de las microfilarias y que solo se transmite de forma vertical. La comprensión de sus mecanismos fisiológicos orientan a que puede constituir un blanco en el tratamiento de las filiarisis humanas, excepto la causada por *Loa loa*. En los artrópodos, *Wolbachia pipientis* se comporta como un endosimbionte facultativo que puede alterar el sexo de la descendencia de su hospedador. Estudios recientes

han indicado que las cepas virulentas de *Wolbachia pipientis* creadas artificialmente podrían usarse para lograr la erradicación de enfermedades transmitidas por vectores para las que de momento no existe tratamiento o cuya transmisibilidad no se ha logrado impedir.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno en relación con este artículo.

Referencias

- Margulis L. Symbiosis and evolution. *Sci Am.* 1971;225(2):48-57.
- Kutschera U, Niklas KJ. Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci.* 2005;124(1):1-24.
- Wernegreen JJ. Endosymbiosis: Lessons in conflict resolution. *PLoS Biol.* 2004;2(3):E68.
- Fox R. Symbiogenesis. *J R Soc Med.* 2004;97(12):559.
- Hertig M, Wolbach SB. Studies on Rickettsia-like micro-organisms in insects. *J Med Res.* 1924;44(3):329-74.
- Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C. How many wolbachia supergroups exist? *Mol Biol Evol.* 2002;19(3):341-6.
- Buttner DW, Wanji S, Bazzocchi C, Bain O, Fischer P. Obligatory symbiotic Wolbachia endobacteria are absent from *Loa loa*. *Filaria J.* 2003;2(1):10.
- Kramer LH, Passeri B, Corona S, Simoncini L, Casiraghi M. Immunohistochemical/immunogold detection and distribution of the endosymbiont Wolbachia of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* using a polyclonal antiserum raised against WSP (Wolbachia surface protein). *Parasitol Res.* 2003;89(5):381-6.
- Casiraghi M, Werren JH, Bazzocchi C, Biserni A, Bandi C. dnaA gene sequences from Wolbachia pipientis support subdivision into supergroups and provide no evidence for recombination in the lineages infecting nematodes. *Parassitologia.* 2003;45(1):13-8.
- Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf A. Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Adv Parasitol.* 2005;60:245-84.
- Landmann F, Foster JM, Slatko B, Sullivan W. Asymmetric Wolbachia segregation during early *Brugia malayi* embryogenesis determines its distribution in adult host tissues. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(7):e758.
- McGarry HF, Egerton GL, Taylor MJ. Population dynamics of Wolbachia bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;135(1):57-67.
- Kozek WJ. What is new in the Wolbachia/Dirofilaria interaction? *Vet Parasitol.* 2005;133(2-3):127-32.
- Slatko BE, Taylor MJ, Foster JM. The Wolbachia endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis.* 2010;51(1):55-65.
- Taylor M, Mediannikov O, Raoult D, Greub G. Endosymbiotic bacteria associated with nematodes, ticks and amoebae. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;64(1):21-31.
- McNulty SN, Foster JM, Makendonka Mitreva M, Dunning Hotopp JC, Martin J, Fischer K, et al. Endosymbiont DNA in endobacteria-free filarial nematodes indicates ancient horizontal genetic transfer. *PLoS One.* 2010; 5(6):e11029.
- Turner JD, Langley RS, Johnston KL, Gentil K, Ford L, Wu B, et al. Wolbachia lipoprotein stimulates innate and adaptive immunity through Toll-like receptors 2 and 6 to induce disease manifestations of filiarisis. *J Biol Chem.* 2009;284(33):22364-78.
- Taylor MJ, Cross HF, Bilo K. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic Wolbachia bacteria. *J Exp Med.* 2000;191(8):1429-36.
- Saint André Av, Blackwell NM, Hall LR, Hoerauf A, Brattig NW, Volkmann L, et al. The role of endosymbiotic Wolbachia bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science.* 2002;295(5561):1892-5.
- Keiser PB, Reynolds SM, Awadzi K, Ottesen EA, Taylor MJ, Nutman TB. Bacterial endosymbionts of *Onchocerca volvulus* in the pathogenesis post-treatment reactions. *J Infect Dis.* 2002;185(6):805-11.
- Brattig NW, Buttner DW, Hoerauf A. Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on Wolbachia endobacteria. *Microbes Infect.* 2001;3(6):439-46.
- Kaifi JT, Diaconu E, Pearlman E. Distinct roles for PECAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 in recruitment of neutrophils and eosinophils to the cornea in ocular onchocerciasis (river blindness). *J Immunol.* 2001;166(11):6795-801.
- Rao RU, Moussa H, Weil GJ. *Brugia malayi*: Effects of antibacterial agents on larval viability and development in vitro. *Exp Parasitol.* 2002;101(1):77-81.
- Smith HL, Rajan TV. Tetracycline inhibits development of the infective-stage larvae of filarial nematodes in vitro. *Exp Parasitol.* 2000;95(4):265-70.
- Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts Wolbachia. *Int J Parasitol.* 1999; 29(2):357-64.
- Hoerauf A, Mand S, Volkmann L, Buttner M, Marfo-Debrekyei Y, Taylor M, et al. Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: Kinetics of Wolbachia endobacteria reduction and of inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Microbes Infect.* 2003;5(4):261-73.

27. Hoerauf A, Volkmann L, Hamelmann C, Adjei O, Autenrieth IB, Fleischer B, et al. Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *Lancet*. 2000;355(9211):1242-3.
28. Hoerauf A, Volkmann L, Nissen-Paehle K, Schmetz C, Autenrieth I, Buttner DW, et al. Targeting of Wolbachia endobacteria in *Litomosoides sigmodontis*: comparison of tetracyclines with chloramphenicol, macrolides and ciprofloxacin. *Trop Med Int Health*. 2000;5(4):275-9.
29. Taylor MJ, Makunde WH, McGarry HF, Turner JD, Mand S, Hoerauf A. Macrofilaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: A double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005;365(9477):2116-21.
30. Turner JD, Mand S, Debrah AY, Muehlfeld J, Pfarr K, McGarry HF, et al. A randomized, double-blind clinical trial of a 3-week course of doxycycline plus albendazole and ivermectin for the treatment of *Wuchereria bancrofti* infection. *Clin Infect Dis*. 2006;42(8):1081-9.
31. Hoerauf A, Nissen-Paehle K, Schmetz C, Henkle-Duhsen K, Blaxter ML, Buttner DW, et al. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *J Clin Invest*. 1999;103(1):11-8.
32. Jeyaprakash A, Hoy MA. Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76 % of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol*. 2000;9(4):393-405.
33. Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O' Neill SL. Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep*. 2011;12(6):508-18.
34. Jiggins FM, von Der Schulenburg JH, Hurst GD, Majerus ME. Recombination confounds interpretations of Wolbachia evolution. *Proc Biol Sci*. 2001;268(1474):1423-7.
35. Werren JH, Baldo L, Clark ME. Wolbachia: Master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(10):741-51.
36. Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W. Mutualistic Wolbachia infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics*. 2002;160(3):1087-94.
37. Glaser RL, Meola MA. The native Wolbachia endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS One*. 2010;5(8):e11977.
38. Aleksandrov ID, Aleksandrova MV, Goriacheva, II, Roshchina NV, Shaikevich EV, Zakharov IA. [Removing endosymbiotic Wolbachia specifically decreases lifespan of females and competitiveness in a laboratory strain of *Drosophila melanogaster*]. *Genetika*. 2007;43(10):1372-8.
39. Brownlie JC, Cass BN, Riegler M, Witsenburg JJ, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA, et al. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):e1000368.
40. Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, Vavre F. Wolbachia interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000630.
41. Engelstädter J, Hurst GD. What use are male hosts? The dynamics of maternally inherited bacteria showing sexual transmission or male killing. *Am Nat*. 2009;173(5):E159-70.
42. Cordaux R, Bouchon D, Grève P. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends Genet*. 2011;27(8):332-41.
43. Crutcher JM, Hoffman SL. Malaria. En: Baron S, editor. *Medical microbiology*. Fourth edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
44. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:71-92.
45. Saridaki A, Bourtzis K. Wolbachia: more than just a bug in insects genitals. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(1):67-72.
46. Xi Z, Khoo CC, Dobson SL. Interspecific transfer of Wolbachia into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. *Proc Biol Sci*. 2006;273(1592):1317-22.
47. McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF, et al. Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*. 2009;323(5910):141-4.
48. Calvitti M, Moretti R, Lampazzi E, Bellini R, Dobson SL. Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2010;47(2):179-87.
49. Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MS, Godfray HC, Sinden RE, et al. Wolbachia stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*. 2010;6(10):e1001143.
50. Hughes GL, Koga R, Xue P, Fukatsu T, Rasgon JL. Wolbachia infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*. 2011;7(5):e1002043.
51. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al. A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*. 2009;139(7):1268-78.
52. Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP. Immune activation by life-shortening Wolbachia and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science*. 2009;326(5949):134-6.
53. Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000833.
54. Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, et al. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*. 2011;476(7361):450-3.
55. Riegler M, Sidhu M, Miller WJ, O'Neill SL. Evidence for a global Wolbachia replacement in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*. 2005;15(15):1428-33.
56. Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, et al. Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 2011;476(7361):454-7.