



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del mecanismo de la simbiosis *Wolbachia*-hospedero

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Isareli Cruz Cruz

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Salvador Uribe Carvajal
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Abraham Landa Piedra
[Facultad de Medicina](#)

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México, octubre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Salvador Uribe Carvajal en el laboratorio 305 oriente del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutor que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por:

Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Abraham Landa Piedra	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Rosa Laura Camarena Mejía	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Durante los estudios de maestría, la sustentante Isareli Cruz Cruz percibió una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), CVU 783568. También contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para participar en la XX Reunión de Bioenergética y Biomembranas en septiembre del 2017.

El proyecto fue financiado por las subvenciones CONACyT 239487 y DGAPA-PAPIIT IN204015.

Se agradece el apoyo y asesoría del Dr. Salvador Uribe Carvajal y la Dra. Natalia Chiquete Félix para la realización de este trabajo.

A la Dra. Martha Calahorra Fuertes, a la M. en C. Norma Silvia Sánchez y al Dr. Antonio Peña Díaz del laboratorio 306 oriente del IFC por permitirme el uso de equipos de su laboratorio. Así como a la Unidad de Biología Molecular y a la Unidad de Microscopía del IFC.

A los miembros del jurado de examen: Dr. Antonio Peña Díaz (IFC, UNAM), Dra. Marietta Tuena Sangri (IFC, UNAM), Dr. José de Jesús García Trejo (FQ, UNAM), Dra. Susana Brom Klanner (CCG, UNAM) y Dra. Sobeida Sánchez Nieto (FQ, UNAM), por la revisión y comentarios para mejorar este trabajo.

Se agradece al Dr. Gabriel del Río Guerra y a la técnico académico María Teresa Lara Ortiz por la donación de las cepas Δ Rib4, Δ Rib1 y Δ MCH5 de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo.

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio 305 oriente: Emilio, Félix, Cristina, Lilia, Gerardo, Ulrik y Rocío por sus enseñanzas, paciencia y apoyo.

七転び八起き

Cae siete veces, levántate ocho

Gracias a mis padres, hermanas y amigos.

Gracias a todas esas personas que han estado a mi lado y apoyado en esta etapa.

Gracias a las personas que me han enseñado, apoyado e inspirado en mí camino.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Simbiosis.....	6
Mutualismo	7
Endosimbiosis.....	7
Simbiosis en invertebrados	8
<i>Wolbachia</i>	9
Integración funcional de <i>Wolbachia</i> con su hospedero.....	10
Metabolismo del hierro en <i>Wolbachia</i>	12
Vía de síntesis del hemo.....	13
Vitaminas en las relaciones simbióticas	14
Riboflavina en <i>Wolbachia</i>	16
Vía de síntesis de la riboflavina.....	16
La levadura como modelo eucarionte	18
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos particulares.....	20
METODOLOGÍA.....	21
Material biológico.....	21
Infección de levadura con <i>Wolbachia sp.</i>	22
Ensayo de hibridación fluorescente <i>in-situ</i> (FISH) contra el gen 16rRNA de <i>Wolbachia sp.</i>	23
Monitoreo de crecimiento en un lector de placas automatizado.....	23
Monitoreo de crecimiento usando un fotocolorímetro Klett-Summerson	24
Crecimiento por goteo	25
Medición de consumo de oxígeno en célula completa	25
Cuantificación de proteína	26

Espectros diferenciales de citocromos	26
Presencia de hemo por ensayo de fluorescencia	26
RESULTADOS.....	28
Infección de la cepa Δ Hem14 con <i>Wolbachia</i>	28
Medición de hemo en la cepa w Δ Hem14.....	29
Crecimiento de cepas mutantes de la vía de síntesis de riboflavina en diferentes medios.....	31
Infección de la cepa Δ Rib4 con <i>Wolbachia</i>	33
Crecimiento de la cepa w Δ Rib4 en medio respiratorio.....	34
Consumo de oxígeno de la cepa w Δ Rib4.....	38
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES	44
PERSPECTIVAS	45
REFERENCIAS	46

LISTA DE ABREVIATURAS

BY4742	<i>S. cerevisiae</i> . Cepa silvestre derivada de la cepa S288C
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
DOC	Desoxicolato de sodio
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FISH	Hibridación <i>in-situ</i> con sonda fluorescente
FMN	Mononucleótido de flavina
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
NaCN	Cianuro de sodio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
PBS	Amortiguador fosfato salino
SFB	Suero fetal bovino
TEA	Trietonolamina
YNB	Yeast nitrogen base / Medio base de nitrógeno de levadura
YPD	Medio de extracto de levadura/peptona/dextrosa
YPLac	Medio de extracto de levadura/peptona/lactato
Δ Hem14	<i>S. cerevisiae</i> . Cepa mutante en el séptimo paso de la vía de síntesis de hemo
Δ MCH5	<i>S. cerevisiae</i> . Cepa mutante en el transportador membranal de riboflavina
Δ Rib1	<i>S. cerevisiae</i> . Cepa mutante en el primer paso de la vía de síntesis de riboflavina
Δ Rib4	<i>S. cerevisiae</i> . Cepa mutante en el cuarto paso de la vía de síntesis de riboflavina

RESUMEN

Wolbachia es una bacteria intracelular obligada del orden de las rickettsiales, pertenecientes a la clase de las α -proteobacterias. Puede ser transmitida horizontalmente y verticalmente y, dependiendo del hospedero, se comporta como parásito o mutualista. La importancia de esta bacteria obedece al alto número de invertebrados infectados (principalmente insectos), las manipulaciones reproductivas que ejerce sobre sus hospederos, la relación mutualista que sostiene con varias filarias parásitas causantes de muchas enfermedades humanas y su potencial uso como control de transmisión de enfermedades transmitidas por artrópodos. Estudiar su fisiología es de particular interés para entender cómo se establece y mantiene la relación *Wolbachia*-hospedero. Al analizar el genoma de *Wolbachia* se ha observado que es reducido y contiene genes conservados de diferentes vías biosintéticas. Las vías de biosíntesis de hemo y de riboflavina se encuentran muy conservadas, por lo que se plantea que éstas u otras vías biosintéticas podrían ser claves para el establecimiento de *Wolbachia* en su hospedero. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de la vía de síntesis de hemo y de riboflavina en la simbiosis de *Wolbachia* con un hospedero artificial, *Saccharomyces cerevisiae*.

En este trabajo se infectaron con *Wolbachia* diferentes cepas de *S. cerevisiae* mutantes en la vía de síntesis de hemo y de riboflavina y se analizó si existía un aprovisionamiento de estos metabolitos por parte de la bacteria hacia la levadura. La cepa Δ Hem14, mutante en el séptimo paso de biosíntesis de hemo y con defectos mitocondriales debidos a la ausencia de hemo, no mostró buenas tasas de infección con *Wolbachia* y no se observó recuperación en su capacidad respiratoria ni presencia de hemo al estar infectada. Por otro lado, la cepa Δ Rib4, mutante en el cuarto paso de biosíntesis de riboflavina, al ser infectada con *Wolbachia* expresó capacidad respiratoria, cuyos efectos se observaron en el crecimiento en medios respiratorios y en el consumo de oxígeno. Se concluye que, al menos en nuestro modelo de infección, la vía de síntesis de riboflavina es importante para la relación *Wolbachia*-hospedero.

ABSTRACT

Wolbachia is an obligate intracellular bacterium from the Rickettsiales order of the α -proteobacteria class. It can be horizontally and vertically transmitted and depending on the host it behaves as a mutualist or as a parasite. Its importance is associated to the high ratio of infected invertebrates (mainly insects); the reproductive manipulation of their hosts; its mutualistic association with some filarial nematode parasites, which cause infections that threaten human health and; its potential use as a transmission control of arthropod-borne diseases. Investigation about its physiology is important to understand how the *Wolbachia*-host relationship is established and maintained. Analysis of the *Wolbachia* genome shows that it has a reduced genome that contains conserved genes of different biosynthetic pathways. The heme and riboflavin pathways are conserved, so it has been proposed that these pathways could be important for the establishment of *Wolbachia* in its host. The aim of this work was to analyze the role of the heme and riboflavin pathways in the *Wolbachia* association with an artificial host, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

We infected with *Wolbachia* strains of *S. cerevisiae*, which were mutants in the heme or riboflavin pathway, and analyzed if the bacteria could provide these molecules to the yeast. The Δ Hem14 strain, mutant in the seventh step of the heme biosynthetic pathway and with mitochondrial deficiency, did not show a high ratio of infection and neither a recovery in its respiratory capacity nor heme content increase was observed. On the other hand, the Δ Rib4 strain, mutant in the fourth step of riboflavin biosynthetic pathway, when infected with *Wolbachia* was able to recover its respiratory capacity, as observed by its growth in a respiratory carbon source and its oxygen consumption. It is concluded that in our infection model the riboflavin pathway is important in the establishment of the *Wolbachia*-host relationship.

INTRODUCCIÓN

Simbiosis

El término simbiosis fue propuesto en 1878 por Heinrich Anton de Bary para designar al fenómeno en el cual dos organismos distintos viven juntos, usualmente en asociación íntima y generalmente para el beneficio de al menos uno de ellos (Oulhen et al. 2016). Actualmente el uso del término abarca relaciones benéficas (mutualismo), neutrales (comensalismo) y dañinas (parasitismo). De hecho, estas categorías son un continuo, en el que puede haber un cambio de un tipo de relación a otra tanto en el tiempo evolutivo como en organismos individuales a través de diferentes circunstancias (Werren et al. 2008). Las relaciones simbióticas están muy extendidas y sostienen procesos muy importantes que afectan al ambiente y a la salud de la población (Relman 2008).

Las relaciones simbióticas se suelen dividir en tres categorías, sobre la base de si el simbiote tiene efectos dañinos, benéficos o ningún efecto en el hospedero. En el caso en el que tanto el hospedero como el simbiote se beneficien recíprocamente de la relación, ésta se define como mutualismo. Cuando el simbiote utiliza al hospedero sin beneficiarlo ni perjudicarlo se considera un comensal. Y, si el simbiote usa al hospedero como un recurso y resulta en un daño al hospedero entonces se considera un parásito. Aunque esta clasificación es útil, raramente refleja las verdaderas dinámicas de las relaciones simbióticas en la naturaleza (Leung & Poulin 2008). Cuando un parásito gana control sobre su transmisión en la relación simbiótica se espera que haya una transición del antagonismo al mutualismo. Muchos de los mutualistas heredables, en los cuales los simbiotes se transmiten entre generaciones de hospederos, se originan como antagonistas, siendo su dispersión restringida por el hospedero (Mondo et al. 2017).

Mutualismo

El mutualismo es una relación simbiótica donde tanto el hospedero como el simbiote se benefician recíprocamente de la relación (Leung & Poulin 2008). Cada miembro de una asociación mutualista se puede beneficiar de la asociación en diferentes formas. Los mutualismos se dividen en cuatro categorías básicas: energético, nutricional, protector y de transporte (Morin 2011).

El grado de integración a través de las funciones fisiológicas depende, en parte, del nivel de dependencia entre el hospedero y el simbiote (Wernegreen 2012). Se puede distinguir entre mutualismo obligado, en el cual ha habido una co-evolución hasta el punto en el cual ninguno de los miembros de la asociación puede persistir sin el otro, o siendo obligada sólo para una de las partes, y, mutualismo facultativo, en el cual la asociación con el otro mutualista no es esencial y sin embargo conduce a efectos positivos en el bienestar (“fitness”) (Morin 2011).

Endosimbiosis

La endosimbiosis es una relación simbiótica en la que un organismo vive dentro de otro. La fusión de dos linajes a través de la endosimbiosis ha contribuido a la evolución, como es el caso de la mitocondria y los cloroplastos que son el resultado de antiguas bacterias endosimbiontes. Los endosimbiontes y sus hospederos frecuentemente representan distintos dominios de la vida y como consecuencia pueden generar combinaciones de capacidades bioquímicas que permiten a ambas especies prosperar en ambientes que de otra manera serían inhabitables para ellos solos (Wernegreen 2012). Aunque la endosimbiosis incluye una amplia diversidad de tipos de interacciones, el término es comúnmente usado en referencia a las asociaciones intracelulares beneficiosas o mutualismo.

La integración hospedero-endosimbionte está influenciada por el grado en que la asociación ha evolucionado (Wernegreen 2012). Estudios moleculares de filogenética revelan que muchas endosimbiosis entre bacterias y hospederos invertebrados resultan de infecciones antiguas seguidas por una transmisión

estrictamente vertical dentro del linaje del hospedero. Los endosimbiontes exhiben generalmente propiedades como evolución acelerada de sus secuencias y reducción de genoma, así como rasgos adaptativos beneficiosos para el hospedero, como amplificación de los genes fundamentales para la provisión de nutrientes (Moran & Baumann 2000).

La estrecha integración funcional con un hospedero, refleja una larga y compartida historia evolutiva. El más extremo de los casos de conectividad evolutiva involucra endosimbiontes que son transmitidos verticalmente, desde el hospedero a la siguiente generación. En animales, esta transmisión ocurre a menudo vía materna, a través de los huevos (Wernegreen 2012).

Simbiosis en invertebrados

Entre los animales, los insectos son especialmente propensos a establecer relaciones con bacterias intracelulares, incluyendo endosimbiontes mutualistas. Estas simbiosis son típicamente de naturaleza nutricional, y las bacterias a menudo suministran nutrientes específicos ausentes en la dieta del insecto hospedero. Los endosimbiontes nutricionales de los insectos representan algunas de las endosimbiosis más antiguas y estables (Wernegreen 2012).

Existen numerosos ejemplos de asociaciones simbióticas entre insectos y bacterias. Muchos insectos que dependen de una dieta restringida contienen bacterias simbiotes que les proveen suplementos nutricionales como aminoácidos y vitaminas (Surindar & Ahmadjian, 2000). En algunos casos dos o más bacterias endosimbiontes habitan en la misma célula y proveen un conjunto complementario de nutrientes (Wernegreen 2012). Estas bacterias pueden ser extracelulares o intracelulares dentro de los tejidos del insecto y alrededor del 10% de las especies conocidas de insectos presentan un órgano llamado bacterioma, o células altamente especializadas que contienen a estos endosimbiontes (Surindar & Ahmadjian, 2000).

Wolbachia

Wolbachia es una bacteria intracelular obligada de la clase de las α -proteobacterias y del orden de las Rickettsiales, estando relacionada estrechamente con géneros como *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Anaplasma* (Williams et al. 2007). Esta bacteria se puede transmitir horizontal o verticalmente (Fenn & Blaxter 2006).

Es una bacteria endosimbionte de muchas especies de invertebrados, en los que se puede comportar como parásito (en artrópodos) o como mutualista (generalmente en nemátodos). Manipula reproductivamente a los artrópodos para promover su transmisión vertical a través de la línea germinal femenina conduciendo a fenotipos como incompatibilidad citoplasmática, inducción de partenogénesis, eliminación de machos y feminización (Werren et al. 2008). En los nemátodos es un mutualista obligado de filarias, como las causantes de la ceguera de río (*Onchocerca volvulus*) o de la filariasis linfática (*Brugia malayi*), enfermedad también conocida como elefantiasis (Ghedini et al. 2007). Cuando se elimina a *Wolbachia*, tratando a las filarias con tetraciclina, el nemátodo hospedero muere (Hoerauf et al. 1999).

Se estima que *Wolbachia* infecta a más del 60% de las cinco millones de especies de insectos que existen en la Tierra (Hilgenboecker et al. 2008; Stork 2018). Aunque en los insectos no suele ser esencial, siendo considerada un comensal o parásito, en algunos mosquitos y otros insectos la infección por *Wolbachia* suprime infecciones adicionales por virus patógenos, bacterias, protistas y/o nemátodos, atenuando la patología y dificultando la transmisión del patógeno, lo que indica un papel benéfico para el hospedero, al menos en algunos casos, y su potencial uso en el control de transmisión de enfermedades transmitidas por artrópodos (Hedges et al. 2008; Moreira et al. 2009; Sullivan & O'Neill 2017).

Los genomas de *Wolbachia* oscilan entre los 0.9 y los 1.5 Mpb, siendo más grandes los provenientes de artrópodos que los obtenidos de nemátodos. Los genomas de especies que infectan artrópodos tienen un gran número de elementos móviles y repetitivos, incluyendo genes que contienen dominios repetitivos de anquirina, secuencias de bacteriófagos y transposones (Lindsey et al. 2016; Wu et al. 2004; Iturbe-Ormaetxe et al. 2005). Estas especies también albergan un

bacteriófago, denominado WO, que no se encuentra en las especies provenientes de nemátodos (Gavotte et al. 2007). Las diferencias en el genoma y la presencia del fago WO en especies provenientes de artrópodos se han relacionado a su comportamiento como parásito (LePage et al. 2017; Fenn & Blaxter 2006).

Con base en análisis genómicos se ha clasificado a *Wolbachia* en varios supergrupos que recaen principalmente dentro de dos grupos mayores: uno compuesto mayoritariamente por parásitos reproductivos (A y B), dominado por hospederos insectos, y otro que comprende a mutualistas obligados, dominado por hospederos nemátodos (C, D y F); ambos grupos presentan diferencias en distancias evolutivas, frecuencia de cambio de hospedero y coinfecciones, e intercambio genético entre especies (Fenn & Blaxter 2006; Brown et al. 2016).

La mayoría de los endosimbiontes dependen en gran parte de sus hospederos para sobrevivir, haciéndolos incultivables en sistemas artificiales y no manipulables genéticamente (Masson et al. 2018). Así, siendo *Wolbachia* un endosimbionte obligado, en el laboratorio se cultiva principalmente en hospederos invertebrados o en líneas celulares de insecto como la línea celular Aa23 de *Aedes albopictus* (Fallon 2008), aunque también se ha cultivado en células de mamífero, como fibroblastos de pulmón embrionario humano (Fenollar et al. 2003; Noda et al. 2002). Por otro lado, aunque no se ha logrado cultivar en ausencia de un hospedero se ha demostrado su supervivencia hasta por una semana en medios libres de células (sin aumentar su biomasa), lo cual podría estar asociado a su capacidad de transferencia horizontal (Rasgon et al. 2006).

Integración funcional de *Wolbachia* con su hospedero

Los análisis comparativos del genoma de *Wolbachia* y de sus hospederos nemátodos han generado información acerca de las posibles vías metabólicas complementarias entre la bacteria y el hospedero (Gill et al. 2014).

En la relación *Wolbachia-Brugia malayi*, se observa que algunas vías de síntesis de moléculas esenciales están conservadas solamente en un genoma, sea el del hospedero o el del endosimbionte, indicando una división de labores. El genoma

de *wBm* (*Wolbachia* de *Brugia malayi*) ha perdido una cantidad considerable de genes en diferentes vías metabólicas respecto a otras α -proteobacterias: no presenta vías completas de síntesis de aminoácidos y de otras vitaminas y cofactores (como la Coenzima A, NAD, biotina, ácido lipoico, ubiquinona y folato); tampoco posee algunas enzimas de la glucólisis, transportadores de azúcares, ni un translocador de ATP-ADP. Sin embargo, presenta vías completas para la biosíntesis de purinas, pirimidinas, hemo, riboflavina, adenín dinucleótido de flavina, glutatión y ácidos grasos. También presenta todas las enzimas del ciclo de Krebs, una cadena respiratoria típica de α -proteobacteria y enzimas para el catabolismo de aminoácidos (Foster et al. 2005). Por otro lado, *Brugia malayi* presenta en su genoma 9 de los 10 genes requeridos para la síntesis de novo de las purinas, 1 de los 7 genes requeridos para la biosíntesis de hemo, mientras que las 5 enzimas requeridas para la biosíntesis *de novo* de riboflavina están ausentes, por lo que es probable que para sintetizar esas moléculas dependa de *wBm* (Ghedini et al. 2007). El genoma de *wBm* y su hospedero ofrecen pistas sobre las vías metabólicas que podrían estar participando en su relación mutualista: riboflavina, dinucleótidos de flavin adenina, hemo y nucleótidos son probablemente la principal contribución de *Wolbachia*, mientras que el hospedero nemátodo probablemente suministra aminoácidos y otros nutrientes requeridos para el crecimiento de la bacteria (Foster et al. 2005; Wu et al. 2004; Grote et al. 2017; Fenn & Blaxter 2006).

La filaria del perro *Dirofilaria immitis* también carece de genes específicos requeridos para la síntesis *de novo* de purinas, pirimidinas, grupo hemo y riboflavinas (Luck et al. 2014). No obstante, su endosimbionte *wDim* (*Wolbachia* de *Dirofilaria immitis*) presenta una vía intacta de síntesis de hemo y riboflavina que se expresan en una manera estadio-específica con el nemátodo hospedero (Luck et al. 2015). Mientras tanto en *wPpe* (*Wolbachia* de *Pratylenchus penetrans*), endosimbionte de una filaria parásita de plantas, la única vía conservada de aparente suplemento nutricional, comparada con otras especies de *Wolbachia*, es la de síntesis de hemo (Brown et al. 2016).

En el nemátodo *Litomosoides sigmodontis* se observó que al eliminar a su *Wolbachia* endosimbionte subunidades de los complejos de la cadena respiratoria codificadas en la mitocondria, conteniendo hemo o riboflavina, aumentaron su

expresión. Es probable que *Litomosoides sigmodontis*, debido a la falta de cofactores esenciales suministrados por su endosimbionte, no sea capaz de formar complejos respiratorios funcionales. Como consecuencia las células del nemátodo intentan corregir la carencia de cofactores incrementando la transcripción de las subunidades de la cadena respiratoria (Strübing et al. 2010).

Por otro lado, Darby y colaboradores proponen que la presencia de la vía de síntesis de nucleótidos, conservada en el genoma de *Wolbachia*, indica que el ATP es la principal molécula entregada al hospedero más que otros nucleósidos trifosfatos (Darby et al. 2012) y que el aumento en la expresión de las subunidades de la cadena respiratoria codificadas en la mitocondria al tratar a *L. sigmodontis* con tetraciclina (Strübing et al. 2010) refleja un intento por parte del hospedero para compensar la reducción del ATP disponible y probablemente *Wolbachia* juegue un papel similar al de la mitocondria (Darby et al. 2012).

Metabolismo del hierro en *Wolbachia*

La conservación de genes del metabolismo de hierro en las diferentes especies de *Wolbachia* (incluyendo endosimbiontes de artrópodos y nemátodos) sugiere la homeostasis del hierro como un factor potencial de su éxito (Gill et al. 2014). De hecho, una característica de todos los genomas de *Wolbachia* secuenciados a la fecha es la presencia de todos los genes de las enzimas necesarias para sintetizar el grupo hemo (Gill et al. 2014; Brown et al. 2016; Luck et al. 2014; Ramírez-Puebla et al. 2016; Foster et al. 2005).

El genoma de *Wolbachia* contiene todos los genes necesarios para sintetizar hemo *de novo*, a excepción del *hemG* o *hemY*, que codifica para la protoporfirinógeno IX oxidasa (PPO) (Foster et al. 2005). Sin embargo, presenta en su genoma un gen homólogo de la protoporfirinógeno oxidasa, *hemJ*, encontrado también en la α -proteobacteria *Rhodobacter sphaeroides* y en la mayoría de las proteobacterias (Gill et al. 2014), por lo que su vía de síntesis de hemo parece ser funcional.

Por su parte, *B. malayi* carece de todos los genes de la vía de biosíntesis del hemo con excepción del gen que codifica para la ferroquelatasa (FC) enzima que

cataliza el paso final de la vía (la inserción de hierro en la protoporfirina IX), lo que implica que el nemátodo es incapaz de sintetizar hemos *de novo* (Ghedin et al. 2007). La vía de síntesis de grupos hemo también está ausente en los genomas de nemátodos no parásitos, como *C. elegans*, que se sabe obtienen el grupo hemo del medio (Rao et al. 2005). Debido a la presencia de la vía de síntesis de hemo en *Wolbachia* y su ausencia en algunos de sus hospederos se plantea que esta vía podría ser importante para su relación.

Vía de síntesis del hemo

Los hemos son moléculas que están directamente involucradas en reacciones de óxidoreducción, oxigenación, hidroxilación y en aquellas relacionadas al transporte y almacenamiento de oxígeno. Sirven como grupo prostético de citocromos, catalasas y peroxidases, entre otras proteínas. El hemo es requerido en varios procesos celulares esenciales, entre ellos, la producción de energía en condiciones aerobias, dado que es un grupo prostético presente en forma de citocromos en la mayoría de las enzimas de la cadena transportadora de electrones (Dailey et al. 2017; Castro Guerrero & Moreno Sánchez 2004).

La vía de biosíntesis del hemo consta de siete pasos con intermediarios bien definidos, y con enzimas conservadas en procariontes y eucariontes (Panek & O'Brian 2002). En animales y en hongos se encuentra compartida entre la mitocondria y el citosol, en eucariontes fotosintéticos se lleva a cabo en el cloroplasto y en bacterias en el citosol (Castro Guerrero & Moreno Sánchez 2004). El primer paso de la vía, la síntesis del ácido 5-aminolevulínico (ALA), varía entre diferentes especies. En eucariontes fotosintéticos y procariontes, exceptuando las α -proteobacterias, ALA es sintetizado a través de la vía C5, usando el esqueleto de 5 carbonos del glutamato. Por otro lado, en eucariontes que no poseen plástidos fotosintéticos (animales, hongos y apicomplexos), así como en las α -proteobacterias, ALA se forma por la vía C4, que implica la condensación del succinil-CoA con glicina, reacción catalizada por la ALA sintetasa. Los siguientes pasos son comunes en todas las especies que presentan la vía (Oborník & Green 2005). En la figura 1 se presentan los genes y enzimas de la vía de síntesis de hemo en *S. cerevisiae* y *Wolbachia*, las

cuales comparten las mismas reacciones, incluyendo la condensación de succinil-CoA y glicina para formar ALA.

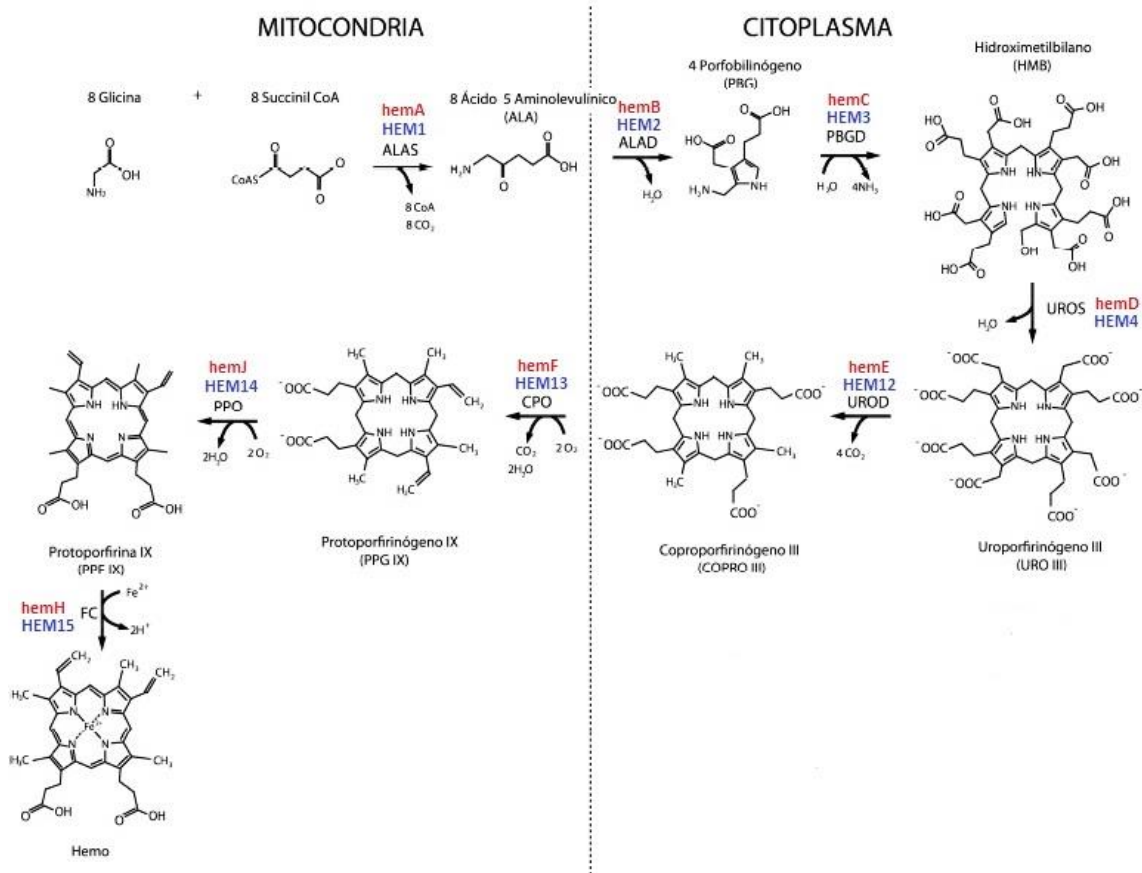


Figura 1. Vía de biosíntesis del grupo hemo. Nomenclatura para las enzimas (en negro y mayúsculas): ALAS (ALA sintetasa); ALAD (ALA deshidratasa); PBGD (porfobilinógeno deaminasa); UROS (uroporfirinógeno III sintetasa); UROD (uroporfirinógeno III descarboxilasa); CPO (coproporfirinógeno III oxidasa); PPO (protoporfirinógeno IX oxidasa); FC (ferroquelatasa). Se muestran en rojo los genes de *Wolbachia* y en azul los genes de *S. cerevisiae* para cada una de las enzimas. Modificada de Villavicencio-Queijeiro, 2012.

Vitaminas en las relaciones simbióticas

Las vitaminas son moléculas orgánicas que son necesarias en pequeñas cantidades en las dietas de algunos animales. Estas moléculas actúan de la misma forma en casi todas las formas de vida, pero en el curso de la evolución los animales superiores perdieron la capacidad para sintetizarlas. La vía de biosíntesis para las

vitaminas puede ser compleja, así que es biológicamente más eficiente ingerir vitaminas que sintetizarlas. A nivel molecular las vitaminas ayudan en diversas funciones a través de la donación o aceptación de intermediarios enzimáticos, así como sirviendo como coenzimas o grupos prostéticos (Berg et al. 2010).

La integración funcional de una relación simbiótica debe involucrar el intercambio de metabolitos, como vitaminas y aminoácidos, entre el hospedero y el endosimbionte y probablemente depende de sistemas secretores del hospedero o transportes especializados. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se sabe muy poco sobre los mecanismos subyacentes a la transferencia de metabolitos (Wernegreen 2012).

El requerimiento de vitaminas para los procesos metabólicos centrales crea un conjunto único de presiones para los artrópodos que subsisten en dietas con nutrientes limitados. Mientras que las bacterias endosimbióticas portadas por artrópodos han sido ampliamente implicadas en el aprovisionamiento de vitaminas, los mecanismos moleculares subyacentes no se conocen bien (Serbus et al. 2017).

Existen diversos ejemplos de provisión de vitaminas en insectos por parte de sus endosimbiontes. *Wigglesworthia* suministra a su hospedero, la mosca tse-tse, vitaminas del complejo B, las cuales no se encuentran presentes en la sangre del vertebrado del que la mosca se alimenta (Snyder et al. 2010). En áfidos también se ha observado provisión de riboflavina y aminoácidos por parte de la bacteria *Buchnera aphidicola*, una endosimbionte obligada transmitida maternalmente (Nakabachi & Ishikawa 1999; Douglas 1998). En el gorgojo del cereal, el endosimbionte SOPE (endosimbionte primario de *Sitophilus oryzae*, por sus siglas en inglés) suministra al hospedero las vitaminas biotina, ácido pantoténico y riboflavina (vitaminas involucradas en el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria), lo que está asociado a un incremento en la eficiencia mitocondrial del hospedero (Wicker 1983; Heddi et al. 1993). Los genomas de *Wigglesworthia* y *Buchnera* muestran evidencia del nivel de selección por parte del hospedero en funciones específicas, es decir, aunque han perdido una gran cantidad de genes retienen funciones de biosíntesis que son importantes para la supervivencia y reproducción del hospedero (Heddi et al. 2001; Wernegreen 2002)

Riboflavina en *Wolbachia*

La vía de síntesis de riboflavina es otra vía de biosíntesis conservada en el genoma de *Wolbachia*. *wBm* al igual que *wDi*, ambas endosimbiontes de filarias, presentan todas las enzimas necesarias para la síntesis de riboflavina (Figura 2), y podrían proveer riboflavina al hospedero (Foster et al. 2005; Luck et al. 2014); sin embargo, hacen falta estudios para determinar si existe dicha contribución ya que en otras especies de *Wolbachia*, como la encontrada en *Onchocerca volvulus*, esta vía no está completa (Darby et al. 2012).

En *Dirofilaria immitis*, que carece de los genes requeridos para la síntesis de novo de riboflavina, se observa aumento en la expresión de los genes de *wDi* involucrados en la síntesis de riboflavina en el estadio de microfilaria en el nemátodo hospedero (Luck et al. 2015). En *Brugia malayi* se observó la expresión de los genes de la vía de riboflavina por parte de *wBm*, lo que indica que la vía es funcional; además los efectos del tratamiento con doxiciclina (eliminando a *Wolbachia*) en las filarias se revirtieron parcialmente al suplementar el medio con vitamina B2 (10 µg/ml) (Li & Carlow 2012).

En algunos insectos se ha observado que la riboflavina juega un papel importante en la relación *Wolbachia*-hospedero, como es el caso de *Cimex lectularius*, donde la provisión de riboflavina por parte de *Wolbachia* contribuye al crecimiento y reproducción del insecto, y donde *Wolbachia* es necesaria para la supervivencia del hospedero (Moriyama et al. 2015). Contrariamente, se ha observado que al eliminar la fuente de riboflavina para el hospedero, en células C7-10 de mosquitos, *Wolbachia* no parece proveer riboflavina y además hay una disminución en la cantidad de bacterias (Fallon et al. 2014).

Vía de síntesis de la riboflavina

La riboflavina (vitamina B2) es sintetizada por todas las plantas y la mayoría de microorganismos. La riboflavina funciona como precursor de las coenzimas de flavina: flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenina dinucleótido (FAD). La vía de

biosíntesis de riboflavina es similar pero no idéntica en bacterias, hongos y plantas. Comienza con una molécula de GTP y 2 de ribulosa-5-fosfato y presenta intermediarios de pirimidina y pteridina. Los nucleótidos de flavina se sintetizan a través de 2 reacciones consecutivas a partir de riboflavina en procariontes y eucariontes (Figura 2) (Villavicencio-Queijeiro 2012; García-Angulo 2017).

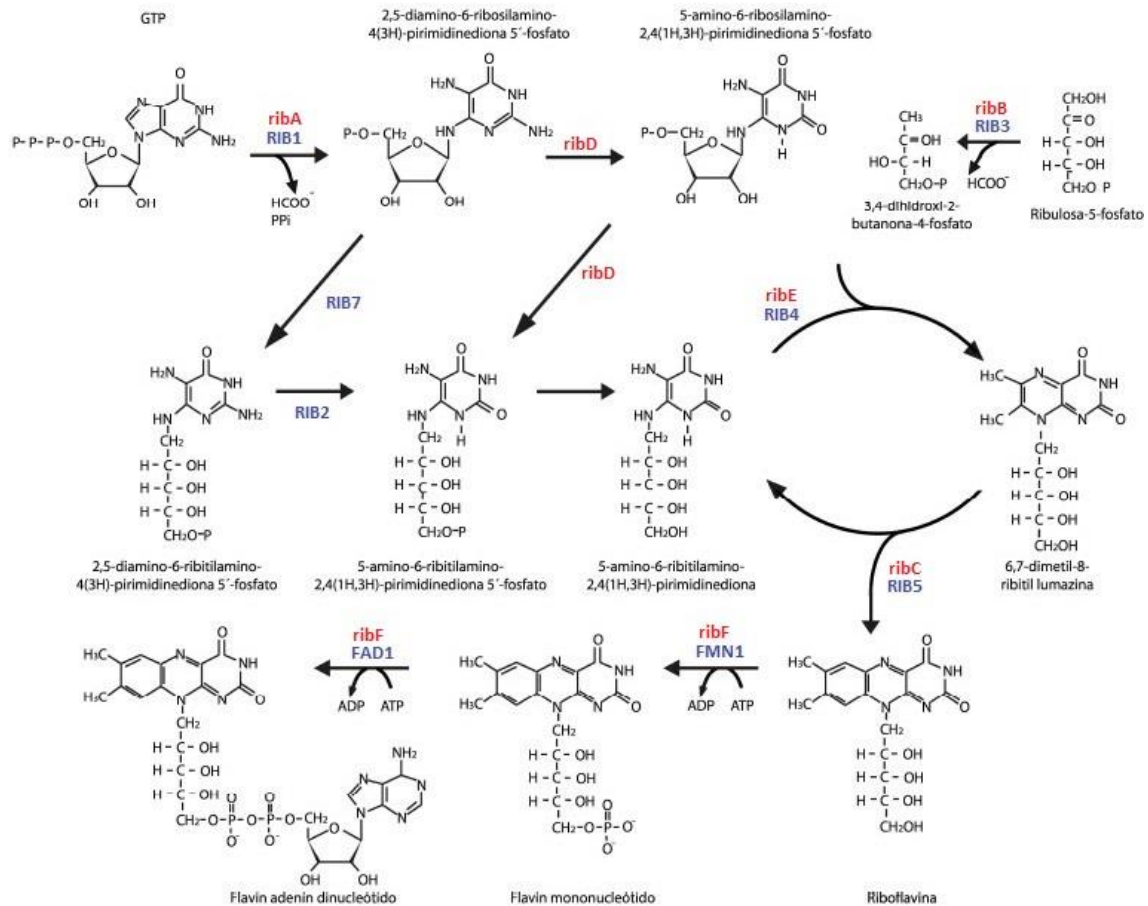


Figura 2. Vía de biosíntesis de riboflavina, FMN y FAD. En rojo se muestran los genes de *Wolbachia* y en azul los genes de *S. cerevisiae* para cada una de las enzimas de la vía. Las enzimas correspondientes para cada uno de los genes son: GTP ciclohrolasa II (RIB1/*ribA*); diaminoxifosoribosilaminopirimidina desaminasa (RIB7); DRAP desaminasa (RIB2); pirimidina desaminasa (*ribD*); pirimidina reductasa (*ribD*); 3,4-DHBP sintasa (RIB4/*ribE*); lumazina sintasa (RIB4/*ribE*); riboflavina sintasa (RIB5/*ribC*); riboflavina cinasa (FMN1/*ribF*) y; FAD sintetasa (FAD1/*ribF*). Modificada de Villavicencio-Queijeiro, 2012.

La levadura como modelo eucarionte

Algunas de las propiedades que hacen a las levaduras particularmente conveniente para estudios biológicos incluyen su crecimiento rápido, células dispersas, facilidad de replicación en placas y aislamiento de mutantes, un sistema genético bien definido y un sistema de transformación de ADN muy versátil. *Saccharomyces cerevisiae* es viable con numerosos marcadores y mutaciones. Además siendo no patógena, puede ser manejada sin riesgo. Las cepas de *S. cerevisiae* tienen tanto estado haploide como diploide. Así, las mutaciones recesivas pueden ser convenientemente aisladas y reveladas en cepas haploides y pueden llevarse a cabo procesos de complementación en cepas diploides (Sherman 2001).

Los organismos auxótrofos, un tipo común de mutantes que no pueden sintetizar un metabolito esencial que las células silvestres sí producen, son incapaces de crecer en ausencia de un nutriente específico (Berg et al. 2010). Muchas cepas de *S. cerevisiae* contienen marcadores caracterizados de auxotrofia y existen bibliotecas de levaduras mutantes carentes de cada gene, lo que permite diversos estudios bioquímicos y genéticos en esta levadura (Sherman 2001).

JUSTIFICACIÓN

Al ser un endosimbionte obligado, *Wolbachia* necesita ser cultivada dentro de un hospedero, como invertebrados o líneas celulares. Recientemente en nuestro laboratorio se infectó a la levadura *S. cerevisiae* con *Wolbachia*. Cultivarla como un endosimbionte de levadura nos da la posibilidad de trabajar con la biblioteca de mutantes disponible, dándonos una ventaja en el estudio fisiológico de la relación huésped-hospedero.

La capacidad de *Wolbachia* de proveer hemo o riboflavina a su hospedero podría ser una de sus principales contribuciones para el hospedero, como se ha observado en algunas de sus relaciones simbióticas con insectos y filarias (Li & Carlow 2012; Moriyama et al. 2015; Wu et al. 2009)

En este trabajo se determinó si la infección con *Wolbachia* de la cepas Δ Hem14 y Δ Rib4 de *S. cerevisiae* (con defectos en la vía de síntesis de hemo y de riboflavina, respectivamente) es capaz de producir un fenotipo mitocondrial silvestre.

HIPÓTESIS

Si *Wolbachia* es capaz de sintetizar hemo o riboflavina y suministrarlo a su hospedero, entonces la infección con *Wolbachia* de una cepa de levadura con defectos en una de esas vías generará un fenotipo silvestre.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la contribución de la vía de síntesis de hemo o riboflavina de *Wolbachia* al fenotipo de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con interrupciones en esas vías.

Objetivos particulares

- Infeccionar con *Wolbachia* cepas mutantes de la vía de síntesis de hemo y de riboflavina y a la cepa silvestre BY4742 de *S. cerevisiae*.
- Determinar si se genera grupo hemo en la cepa Δ Hem14 infectada.
- Observar si la cepa Δ Rib4 recupera la habilidad de crecer en medio respiratorio, suplementado o no con riboflavina.
- Medir el consumo de oxígeno en la cepa Δ Rib4 infectada.

METODOLOGÍA

Material biológico

Cepas de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo

Tabla 1. Características de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas

Cepa	Características
BY4742α	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0, derivada de la cepa S288C (Brachmann et al. 1998). Utilizada como cepa parental del proyecto internacional de disrupción de genes de <i>S. cerevisiae</i> .
ΔHEM14/YER014W	Esta cepa carece de la protoporfirinógeno IX oxidasa, enzima mitocondrial que cataliza el séptimo paso en la vía biosintética del hemo, convirtiendo protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX (Heinemann et al. 2008) y se ha reportado que no crece en medios respiratorios (Camadro & Labbe 1996).
ΔRIB4/YOL143C	Mutante en el gen de la lumazina sintasa, enzima que cataliza el cuarto paso de la vía de síntesis de riboflavina. Presenta defectos en crecimiento en medio respiratorio (Dimmer et al. 2002).
ΔRIB1/YBL033C	Mutante en la GTP hidrolasa II, enzima que cataliza el primer paso de la vía de síntesis de riboflavina; tiene crecimiento respiratorio disminuido debido a defectos en reacciones que requieren FAD y FMN (Steinmetz et al. 2002).
ΔMCH5/YOR306C	Mutante en el transportador de riboflavina de la membrana plasmática. Presenta un fenotipo de crecimiento similar a la cepa silvestre (Lafuente & Gancedo 1999).

Infección de levadura con *Wolbachia* sp.

Las bacterias usadas para la infección se obtuvieron de una cepa de *S. cerevisiae* previamente infectada con *Wolbachia* sp. proveniente de la línea celular Aa23 (*Aedes albopictus*) (Fallon 2008).

Para realizar la infección con *Wolbachia* a partir de levaduras infectadas se obtuvo un lisado celular que fue separado por centrifugación diferencial para obtener una fracción enriquecida en *Wolbachia*. Primero se centrifugaron 100 ml de un cultivo de levaduras infectadas (15 días, agitación constante a 30 °C) a 5000 rpm por 5 min para obtener un botón de levaduras. El botón de levaduras se rompió con perlas de vidrio durante 10 min en un vórtex. El lisado se centrifugó a 5000 xg durante 7 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó por 10 min a 16500 xg. El botón obtenido se resuspendió y se centrifugó a 5000 xg por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 18500 xg por 5 min; el botón obtenido se resuspendió en 1 ml de medio YPD Fe+ SFB 5% (citrato férrico 1mM, suero fetal bovino 5%). A continuación se filtró por membranas de 2.3 µm, 0.6 µm y 0.23 µm. El filtrado, la fracción enriquecida en *Wolbachia*, se colocó sobre un botón de levaduras creciendo exponencialmente (cultivo de 3 a 6 h a 30 °C con agitación constante) en un tubo Falcon. El tubo se centrifugó a 2500 xg por una h a temperatura ambiente. Después de centrifugar, se resuspendió el botón precipitado y se colocó en medio sólido suplementado con SFB 5% y 1mM de citrato férrico y se dejó crecer por 15 días a 30 °C o, a 27 °C con una atmósfera controlada de 5% de CO₂ (condiciones en las que normalmente se mantienen a las líneas celulares infectadas con *Wolbachia*) (Fallon 2008). Las levaduras infectadas se sembraron cada quince días en medio sólido nuevo con SFB al 5%.

Para la cepa wΔRib4 la designación “a” y “b” corresponden a condiciones diferentes de crecimiento después del tratamiento de infección. La cepa “wΔRib4 a” se dejó crecer por 15 días a 30 °C y posteriormente se mantuvo a temperatura ambiente en atmósfera no controlada; la cepa “wΔRib4 b” se mantuvo desde la infección en una incubadora con una atmósfera controlada de 5% de CO₂ a 27 °C.

Para comprobar la infección se tomaron muestras del cultivo 15 días posteriores al tratamiento de infección y se realizó un FISH (hibridación fluorescente *in-situ*) contra el gen 16rRNA de *Wolbachia*.

Ensayo de hibridación fluorescente *in-situ* (FISH) contra el gen 16rRNA de *Wolbachia* sp

Se implementó la fluorescencia *in situ* específica para el gen 16rRNA de *Wolbachia* sp., usando los oligonucleótidos específicos W1, 5'-AATCCGGCCGRCCGACCC-3' y W2, 5'-CTTCTGTGAGTACCGTCATTATC-3' marcados con la sonda Quasar 670 (Abs 647 nm, Em 670nm) (Heddi et al. 2001). El protocolo para fijación de las muestras e hibridación fue el siguiente: De los cultivos de levaduras infectadas y no infectadas se tomó una muestra de células, las cuales fueron enjuagadas en PBS por 5 min. Se centrifugaron a 5 rpm por 5 min y las células del botón obtenido se fijaron incubándolas en PBS-paraformaldehído 3% a 4 °C por 1 h y luego se enjuagaron 3 veces en PBS. Se colocó la muestra en un portaobjetos y después de secarse se procedió a deshidratarla incubándola secuencialmente en alcohol al 50, 80 y 96% por 3 minutos en cada concentración. Después se sumergieron en amortiguador de hibridación conteniendo 30 ng/μl de la sonda y se incubaron por 2 horas a 46 °C. Posteriormente se enjuagaron en PBS y se incubaron en amortiguador de enjuague por 15 min a 48 °C. Finalmente se enjuagaron en agua estéril y se dejaron secar (Genty et al. 2014). Las imágenes se obtuvieron en el microscopio confocal FV10000 y el Zeiss LSM 710, y fueron analizadas con el programa ImageJ.

Monitoreo de crecimiento en un lector de placas automatizado

Tabla 2. Medios de cultivo usados para monitorear crecimiento.

Medio	Composición
YPD Fe+	Extracto de levadura 1%, Peptona de gelatina 2%, Glucosa 2%, Citrato férrico 1 mM.

YPLac Fe+	Extracto de levadura 1%, Peptona de gelatina 1%, Lactato 2%, Citrato férrico 1 mM.
SDLac Fe+	YNB (Difco®) 1.7 g/L, Sulfato de amonio 5 g/L, uracilo 20 mg/L, arginina 20 mg/L, adenina 20 mg/L, metionina 20 mg/L, leucina 30 mg/L, lisina 30 mg/L, triptófano 20 mg/L, tirosina 20 mg/L, treonina 20 mg/L, fenilalanina 50 mg/L, lactato 2%.

*Donde se indica, la riboflavina fue suministrada a 20mg/L (Santos et al. 1995).

** SFB 5%. Cuando fue necesario se suplementaron los medios con suero fetal bovino al 5%.

La velocidad de crecimiento de las cepas infectadas y no infectadas se midió en un lector de placas automatizado (Bioscreen C®). A partir de los precultivos de cada cepa (una asada de levadura inoculada en 5ml de medio YPD Fe+ SFB 5%, agitación continua a 30 °C por 24 h), se tomó el volumen necesario para tener una densidad óptica inicial de 0.1 ($OD_{600} = 0.1$) en 300 μ l del medio en el que se quería determinar la velocidad de crecimiento (YPLac Fe+, YPLac Fe+ Riboflavina, YPLac Fe+ SFB 5%; o SDLac Fe+ SFB 5%). Los cultivos se realizaron en placas de 100 pozos, que se leyeron automáticamente con un filtro de 600 nm. Como blanco se utilizaron pozos con 300 μ l de medio YPLac Fe+. Las lecturas se hicieron cada hora, durante 72 h, a 30 °C, con agitación constante.

Monitoreo de crecimiento usando un fotolorímetro Klett-Summerson

Alternativamente se midió el crecimiento de la cepa Δ Rib4 infectada y no infectada usando un fotolorímetro Klett-Summerson. Se usaron precultivos de la misma manera que en el ensayo anterior para iniciar los cultivos con una densidad óptica (OD_{600}) inicial de 0.1 (aproximadamente 20 unidades Klett en medio YPLac) en 100 ml de medio (YPLac Fe+ SFB 5% o YPLac Fe+ Riboflavina SFB 5%). Los cultivos se mantuvieron en agitación lenta a 30 °C. Se tomaron lecturas cada 12 h durante 5 días.

Crecimiento por goteo

Se realizó crecimiento por goteo de las diferentes cepas mutantes en la vía de riboflavina en medios YPD Fe⁺ y YPLac Fe⁺ suplementados o no con riboflavina. Se usaron precultivos de 24 horas en medio YPD Fe⁺. Se hicieron diluciones seriales en agua (1, 1:10, 1:100 y 1:1000) y se sembraron por goteo en medios sólidos YPD Fe⁺ y YPLac Fe⁺ con y sin riboflavina (20 mg/L).

Medición de consumo de oxígeno en célula completa

Se utilizó un oxímetro Strathkelvin modelo 782 (Warner/Strathkelvin Instruments) con un electrodo tipo Clark inmerso en una cámara de 1 ml con agitación y temperatura constante de 30°C controlada por un baño HAAKE-FE-2 (Thermo Electron, Karlsruhe). Las reacciones se llevaron a cabo en medio de respiración MES 10 mM-TEA pH 6 (ajustado con TEA).

Para medir el consumo de oxígeno se obtuvo una basal con el medio de respiración en la cámara, a continuación se adicionaron 25mg de células (50 µl de células resuspendidas 1:1 en agua), después de unos segundos se adicionó el sustrato (glucosa 40 mM o lactato 10 mM) y finalmente se adicionó NaCN 300 µM. Se usaron soluciones de glucosa 1 M y de lactato 1 M pH 6.0 para alcanzar las concentraciones deseadas de sustrato.

Las células usadas para este experimento se obtuvieron tomando una asada de levaduras que se inoculó en 5ml de medio YPD Fe⁺ SFB 5%, que se mantuvo con agitación continua a 30 °C por 24 h. Este precultivo se pasó a matraces con 50 ml de medio YPLac Fe⁺ SFB 5% o YPLac Fe⁺ Riboflavina y se incubó en agitación continua a 30 °C por 24 h. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, el botón de levaduras obtenido se resuspendió en agua estéril para enjuagar a las células y se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 5 min. Se calculó el peso húmedo del pellet y se resuspendió en agua estéril en proporción 1:1.

Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Biuret en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a una longitud de onda de 540 nm (Gornall et al. 1949). A 2 ml de reactivo Biuret se le añadieron 125 µl de desoxicolato de sodio (DOC) al 1%, 350 µl de agua destilada y 25 µl de lisado celular o mitocondrias; se dejó incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un blanco sin mitocondrias para calibrar el equipo. Se empleó albúmina sérica bovina (BSA) para realizar la curva estándar.

Espectros diferenciales de citocromos

Se realizó un barrido en el espectrofotómetro Clarity (Olis, Inc.) (de 400 a 640 nm) para determinar la presencia de citocromos b, c y a en mitocondrias aisladas de la cepa BY4742 y la cepa Δ Hem14 infectada y no infectada con *Wolbachia* por medio de su espectro de absorción. Especificaciones del espectrofotómetro: número de incrementos: 150; tiempo de integración 0.750. Para obtener los espectros se colocaron 3 mg de mitocondrias en 300 µl de amortiguador de extracción (Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA) y se agitaron en un vórtex durante un 1 min; se colocó la mezcla en la celda y se obtuvo el espectro. El espectro oxidado se obtuvo después de agregar 10 µl de persulfato de amonio en una celda y agitar suavemente. El espectro reducido se obtuvo después de adicionar hidrosulfito de sodio (ditionita de sodio) con una espátula pequeña en una celda distinta. Al espectro reducido se le restó el espectro oxidado para obtener el espectro diferencial (Nicholls & Ferguson 2013).

Presencia de hemo por ensayo de fluorescencia

La presencia de hemo se determinó por fluorescencia del hemo al tratar lisados celulares con ácido oxálico. El hierro es removido por calentamiento en una solución muy concentrada de ácido oxálico y la protoporfirina resultante se mide por fluorescencia (Sinclair et al. 2001). De un cultivo de levaduras de 10 ml se

obtuvo un botón que fue sonicado al 85% de amplitud por 1 min (sonicador Sonics VibraCell) para obtener un lisado celular. Se tomaron 40 mg de proteína del lisado celular y se colocaron en un tubo de vidrio conteniendo 2.5 ml de ácido oxálico 2 M. Se calentaron los tubos a 100 °C por 30 min (autoclave). Después de calentarlos se centrifugaron a 2000 xg por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se colocaron 2 ml de sobrenadante en celdas de cuarzo de 3 ml y se midió la fluorescencia en un espectrofluorómetro SIM Aminco. Usando 400 nm de excitación, la protoporfirina tiene un máximo de emisión a 608 y 662 nm aproximadamente, pero estos parámetros pueden variar dependiendo del instrumento usado (Sinclair et al. 2001). En este instrumento se realizó un barrido de emisión de 590 a 700 nm usando 420 nm de excitación, la longitud en la que se obtenía una mayor excitación, y obteniendo picos máximos de emisión en 620 y 674 nm aproximadamente.

RESULTADOS

Infección de la cepa Δ Hem14 con *Wolbachia*

En la búsqueda de posibles factores o metabolitos que contribuyen a la estabilidad de la relación *Wolbachia*-hospedero, una de las rutas identificadas fue la de síntesis de hemo, presente en todas las especies de *Wolbachia* secuenciadas hasta ahora y, de manera interesante, ausente en algunos de sus hospederos (Foster et al. 2005; Ramírez-Puebla et al. 2016; Ghedin et al. 2007; Strübing et al. 2010). Tomando ventaja de la existencia de una biblioteca de mutantes nulas de diferentes genes en *S. cerevisiae* se prosiguió a infectar una cepa mutante en la vía de síntesis de hemo (Δ HEM14/YER014W) con *Wolbachia*.

Se realizó la infección tanto de la cepa silvestre BY4742 como de la mutante Δ Hem14, transfiriéndolas a medio YPD Fe⁺ sólido después del tratamiento de infección. Al comprobar la infección por FISH contra el gen 16 rRNA de *Wolbachia*, se observó que, aunque había infección, la cantidad de células infectadas era muy baja en la cepa mutante Δ Hem14 (datos no mostrados). Por esta razón se realizó nuevamente la infección usando diferentes medios post-infección (YPGal Fe⁺ y YPLac Fe⁺, todos suplementados con SFB 5%, sólidos y líquidos) para buscar un medio en el que la tasa de infección aumentara. Al comprobar la infección se observó que en la cepa Δ Hem14 cultivada en medio YPGal Fe⁺ la cantidad de células infectadas aumentó ligeramente, mientras que en medio YPLac Fe⁺ no fue capaz de crecer. Por otro lado en la cepa BY4742 se observó una mayor cantidad de células infectadas al cultivarlas en medio YPLac Fe⁺, mientras que en medio YPGal Fe⁺ la tasa de infección fue baja (Figura 3).

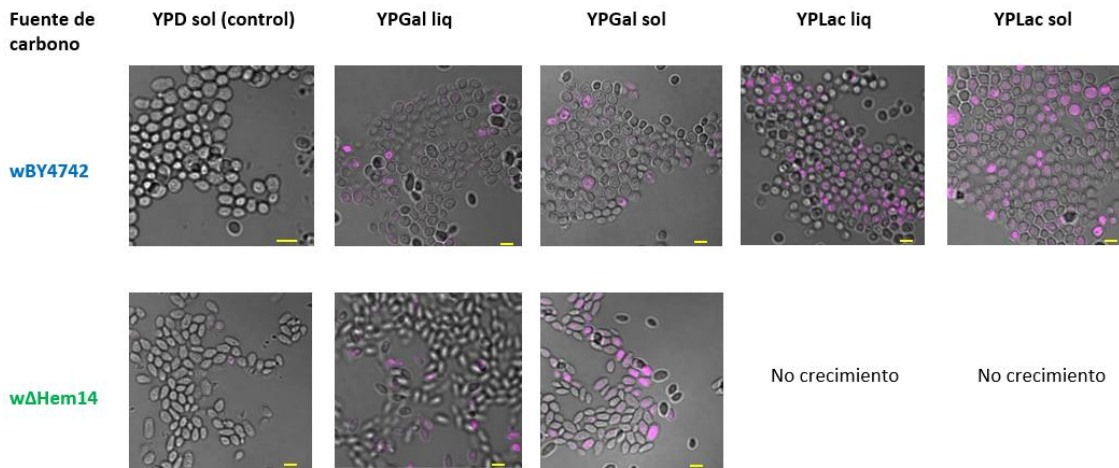


Figura 3. Imágenes representativas del ensayo de FISH contra el gen 16rRNA de *Wolbachia* en levaduras infectadas y no infectadas. Levaduras procedentes de diferentes cultivos (YGal y YPLac suplementados con citrato férrico 1 mM y SFB 5%, sólidos o líquidos), 15 días después del tratamiento de infección. Las imágenes son una superposición de la fluorescencia obtenida por la hibridación de la sonda, marcada con Quasar670 específica para el gen 16rRNA de *Wolbachia*, y el campo claro. La marca en rosa indica hibridación de la sonda, es decir, presencia de *Wolbachia*. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal FV1000 y procesadas mediante el programa ImageJ.

Medición de hemo en la cepa wΔHem14

La presencia de *Wolbachia* en la cepa mutante en la vía de síntesis de hemo podría contribuir a la recuperación de su función mitocondrial, a través de suministro de hemo por parte de la bacteria para la generación de citocromos necesarios para los complejos respiratorios, por lo que se prosiguió a medir el consumo de oxígeno en la cepa infectada. La cepa wΔHem14 (cepa ΔHem14 infectada con *Wolbachia*) se mantuvo a largo plazo en medio YPGal Fe+ sólido a temperatura ambiente, y a partir de éste se prepararon cultivos de wΔHem14 en medios YPGal Fe+ líquido por 7 días, para su posterior cosecha y medición de consumo de oxígeno. Se midió el de consumo de oxígeno en la fracción mitocondrial y en la célula completa y en ningún caso se observó consumo de oxígeno (datos no mostrados), indicando que la cepa ΔHem14 infectada con *Wolbachia* no recupera su capacidad respiratoria. Al realizar un barrido espectrofotométrico de la fracción mitocondrial para buscar la presencia de citocromos (contienen al grupo hemo como grupo prostético), se observó que no había diferencia en los picos de

absorbancia entre la cepa Δ Hem14 infectada y la no infectada, siendo ambos casi nulos con respecto a la cepa silvestre BY4742 (Figura 4). Por otro lado, la cepa BY4742 infectada presentó un espectro de absorción similar al de la cepa no infectada.

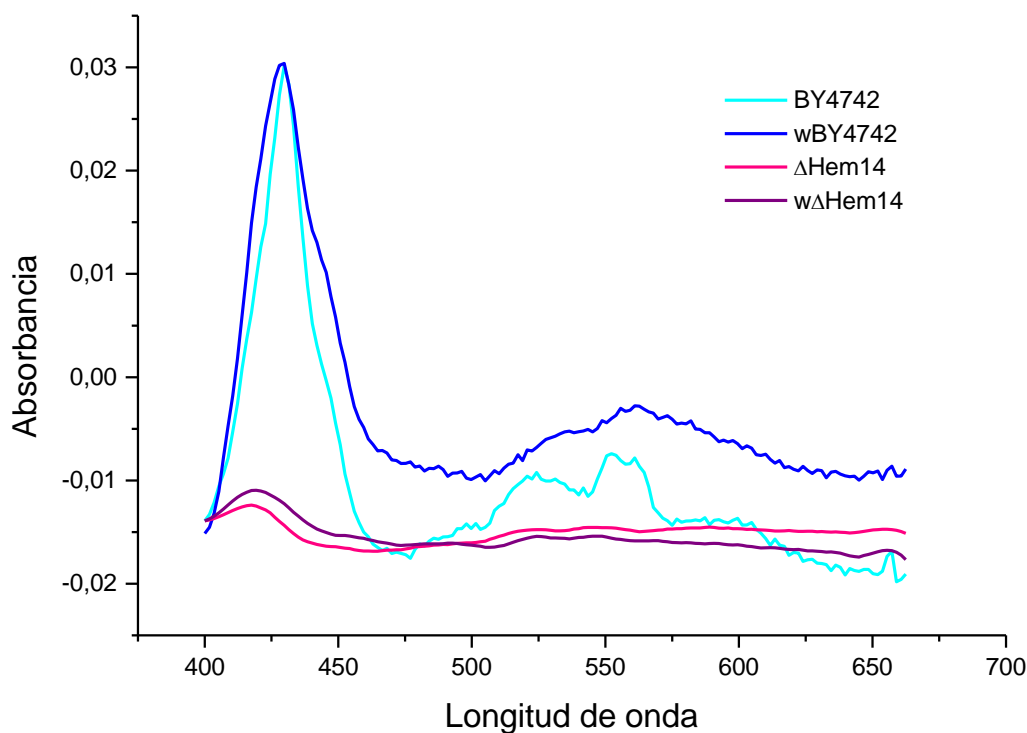


Figura 4. Espectros diferenciales de citocromos b, c y a de mitocondrias aisladas de la cepa BY4742 y Δ Hem14 infectadas y no infectadas. Concentración de proteína de 3mg/ml; se muestra el barrido de 400 a 650 nm.

Al no observar presencia de citocromos en la cepa $w\Delta$ Hem14, se planteó que probablemente había hemo en la célula pero que la levadura no era capaz de incorporarlo a los citocromos de la cadena respiratoria en la mitocondria, por lo que se midió la presencia de hemo en un lisado de célula completa de la cepa Δ Hem14 infectada y no infectada. Sin embargo, la cantidad de hemo (o protoporfirina) tanto en la cepa infectada como no infectada se mantuvieron iguales, como se observa en los trazos Δ Hem14 Fe(III) y $w\Delta$ Hem14 Fe(III) de la figura 5. Adicionalmente, dado que la cepa Δ Hem14 parece no incorporar Fe(III) (como el encontrado en el citrato férrico) pero sí un poco de Fe(II) (como en el sulfato ferroso) (Lesuisse et al. 2005), se planteó la posibilidad de que al no poder incorporar el hierro del citrato férrico la cepa $w\Delta$ Hem14 no podría producir hemo. Con base en este dato, se cultivó a

wΔHem014 en medio YPGal suplementado con sulfato ferroso en lugar de citrato férrico, se midió la incorporación de Fe(II) por ensayo con batofenantrolina y se cuantificó el hemo. Al suplementar con citrato férrico no hubo incorporación de hierro en las cepas ΔHem14 o wΔHem14, mientras que al suplementar con sulfato ferroso se observa una ligera incorporación de hierro en ambas cepas (Datos no mostrados). No obstante, la cantidad de hemo tanto en la cepa infectada como en la no infectada no aumentó al suplementar con Fe(II) (Figura 5).

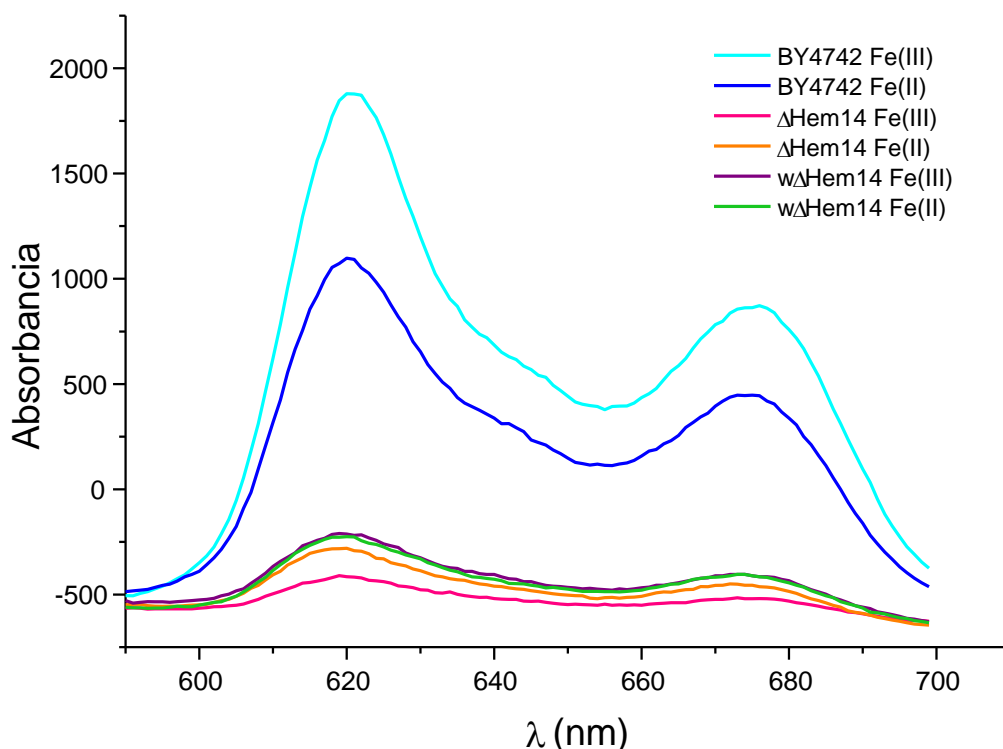


Figura 5. Espectro de fluorescencia de hemo en las cepas BY4742, ΔHem14 y wΔHem14 cultivadas en medio YPGal suplementado con 1mM de citrato férrico (Fe(III)) o sulfato ferroso (Fe(II)). Tratamiento de lisados celulares (40 mg de proteína) con ácido oxálico; barrido de emisión de 590 a 700 nm; excitación a 420 nm.

Crecimiento de cepas mutantes de la vía de síntesis de riboflavina en diferentes medios

Otra de las vías de síntesis identificadas que podría potencialmente contribuir al establecimiento de *Wolbachia* en el hospedero es la vía de síntesis de riboflavina, la cual se encuentra completa en la mayoría de las especies de *Wolbachia*

y que se ha descrito participa en algunas de sus relaciones simbióticas (Moriyama et al. 2015; Li & Carlow 2012; Foster et al. 2005). Una estrategia utilizada en los estudios en los que se identificó la participación de la riboflavina en la relación simbiótica fue el análisis del crecimiento del hospedero en medios suplementados con la vitamina o sin ella, en presencia y ausencia de su endosimbionte (Li & Carlow 2012; Moriyama et al. 2015; Fallon et al. 2014), por lo que se tomó este enfoque para evaluar la participación de la vía de riboflavina en nuestro modelo.

Al hacer una búsqueda de mutantes de *S. cerevisiae* relacionadas al metabolismo de riboflavina se identificaron 3 cepas viables con mutaciones en la vía: Δ RIB4/ YOL143C, mutante en el cuarto paso de la vía de síntesis de riboflavina; Δ RIB1/YBL033C, mutante en el primer paso de la vía de síntesis de riboflavina y; Δ MCH5/YOR306C, mutante del transportador membranal de riboflavina. Se realizó crecimiento por goteo de las diferentes cepas en medios YPD Fe⁺ y YPLac Fe⁺ suplementados o no con riboflavina para comprobar si alguna de ellas tenía un fenotipo distinto al crecer en medios ricos en riboflavina. Se observó que en medio YPD Fe⁺ todas las cepas crecen de manera similar, independientemente de la adición de riboflavina. Por otro lado, en medio YPLac Fe⁺, a diferencia de las cepas BY4742 y Δ MCH5, las cepas Δ Rib1 y Δ Rib4 no pueden crecer, pero interesantemente, al suplementar el medio con riboflavina, la cepa Δ Rib4 recupera su crecimiento (Figura 6), lo que sugiere que esta cepa es capaz de tomar riboflavina del medio y usarla para generar cofactores de la cadena respiratoria, recuperando así su crecimiento en medio respiratorio.

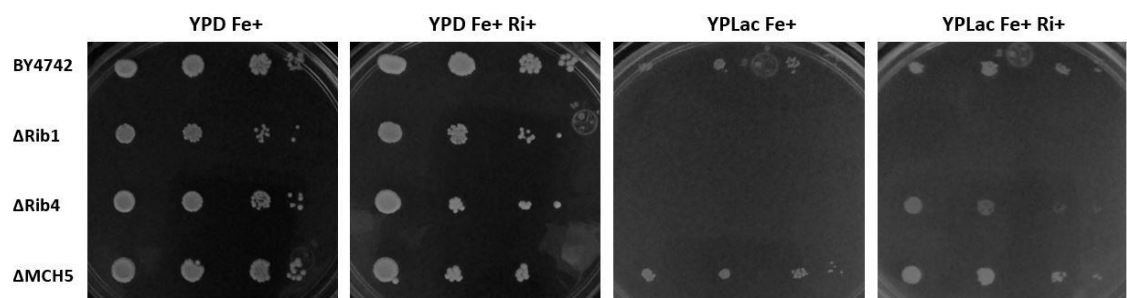


Figura 6. Crecimiento por goteo de las cepas BY4742, Δ Rib1, Δ Rib4 y Δ MCH5 en medio YPD Fe⁺ y YPLac Fe⁺ suplementados o no con riboflavina (20mg/l) (Ri+).

Al crecer a las levaduras en medio líquido YPLac Fe+ se observaron resultados similares en el crecimiento. Nuevamente se observó recuperación en el crecimiento de la cepa Δ Rib4 cuando el medio fue suplementado con riboflavina, mientras que las otras cepas mantuvieron un crecimiento similar (Figura 7).

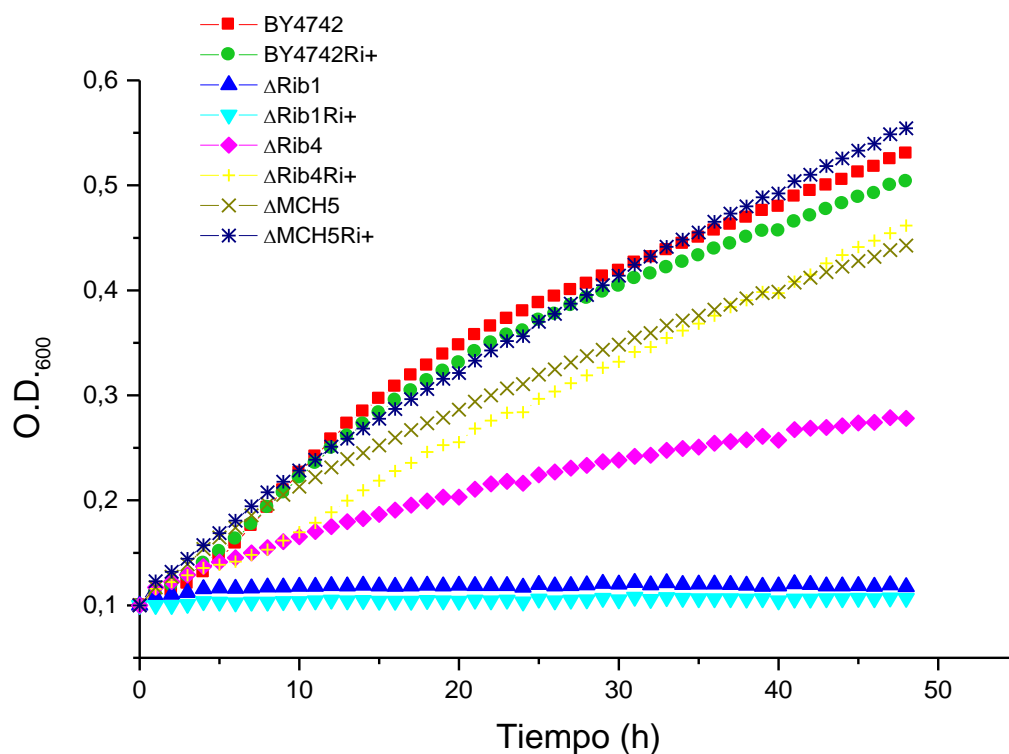


Figura 7. Curva de crecimiento de las cepas BY4742, Δ Rib1, Δ Rib4 y Δ MCH5 en medio líquido YPLac Fe+ suplementado o no con riboflavina (20 mg/l) (Ri+). Se midió el aumento en la densidad óptica durante 48 horas a una longitud de onda de 600 nm en un lector de placas automatizado. La densidad inicial (O.D.₆₀₀) de los cultivos fue de 0.1. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos.

Infeción de la cepa Δ Rib4 con *Wolbachia*

Con las características observadas en el crecimiento de la cepa Δ Rib4 se prosiguió a trabajar en su infección para ver si al hospedar a *Wolbachia*, la levadura es capaz de recuperar su crecimiento en medio YPLac Fe+ sin adicionar riboflavina. En la figura 8 se muestra el análisis del ensayo de FISH contra el gen 16rRNA de *Wolbachia*, con el que se comprobó la infección de la cepa Δ Rib4. Se mantuvo a la cepa después del tratamiento de infección en dos condiciones diferentes: la cepa “w Δ Rib4 a” se mantuvo a temperatura ambiente en una atmósfera no controlada y

la cepa “w Δ Rib4 b” se mantuvo a 27 °C con una atmósfera controlada de CO₂, condiciones en las que se mantienen a las líneas celulares de insecto infectadas con *Wolbachia* (Fallon 2008), para ver si esta condición mejoraba la infección.

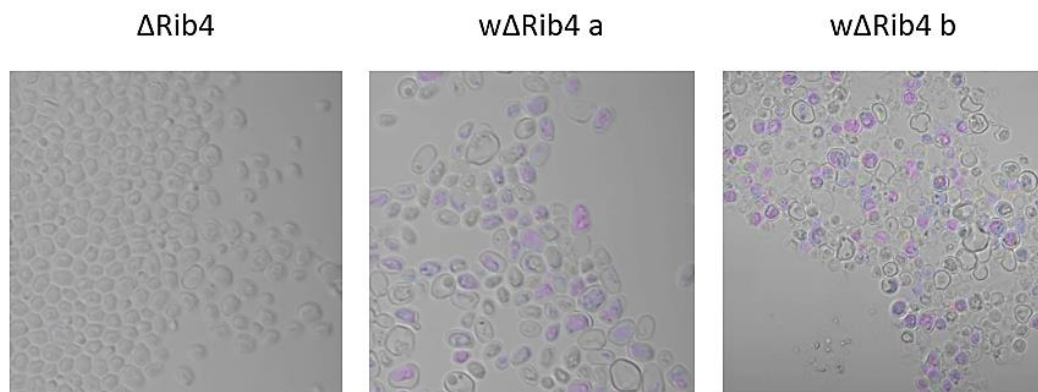


Figura 8. Imágenes representativas del ensayo de FISH contra el gen 16rRNA de *Wolbachia* en la cepa Δ Rib4 infectada y no infectada. Análisis de cultivos 15 días post-infección. Las imágenes son una superposición de la fluorescencia obtenida por la hibridación de la sonda, marcada con Quasar670 específica para el gen 16rRNA de *Wolbachia*, y el campo claro. La marca en rosa indica hibridación de la sonda, es decir, presencia de *Wolbachia*. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal Zeiss LSM 710 y procesadas mediante el programa ImageJ. w Δ Rib4 a y b corresponden a condiciones diferentes de cultivo post-infección.

Crecimiento de la cepa w Δ Rib4 en medio respiratorio

Después de comprobar la infección de la cepa Δ Rib4 con *Wolbachia*, se prosiguió a obtener las curvas de crecimiento en medio YPLac Fe+. En un lector automatizado de placas se observó que la cepa Δ Rib4 infectada con *Wolbachia* (w Δ Rib4) creció a una velocidad similar a la de la cepa silvestre BY4742 (Figura 9). Para comprobar que no estaban tomando riboflavina del medio para recuperar ese crecimiento (el medio YPLac Fe+ contiene aproximadamente 2 mg/L de riboflavina), se prosiguió a repetir la curva de crecimiento usando medio SDLac Fe+, en el que la concentración de riboflavina es mínima (0,2 mg/L). De manera similar a lo observado en el medio YPLac Fe+, la cepa w Δ Rib4 es capaz de crecer de manera similar a la cepa silvestre (Figura 10).

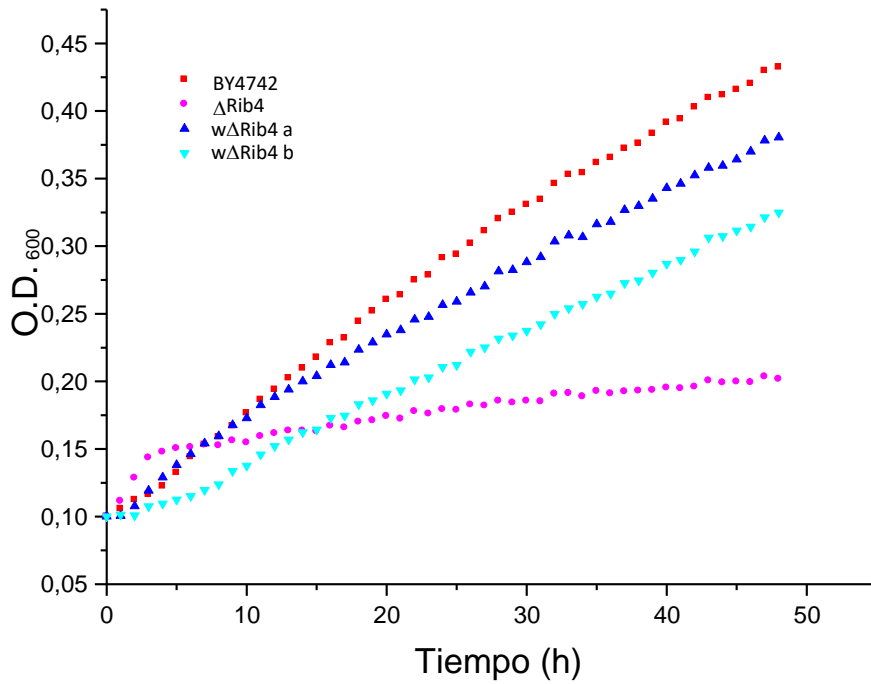


Figura 9. Crecimiento de las cepas BY4742, Δ Rib4 y w Δ Rib4 en medio YPLac. Se midió con un lector automatizado de placas el crecimiento de las levaduras cada hora durante 48 h en medio YPLac suplementado con 1mM citrato férrico y 5% SFB, a 30 °C. La densidad inicial (O.D.₆₀₀) de los cultivos fue de 0,1. w Δ Rib4 a y b corresponden a condiciones diferentes de cultivo post-infección. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos.

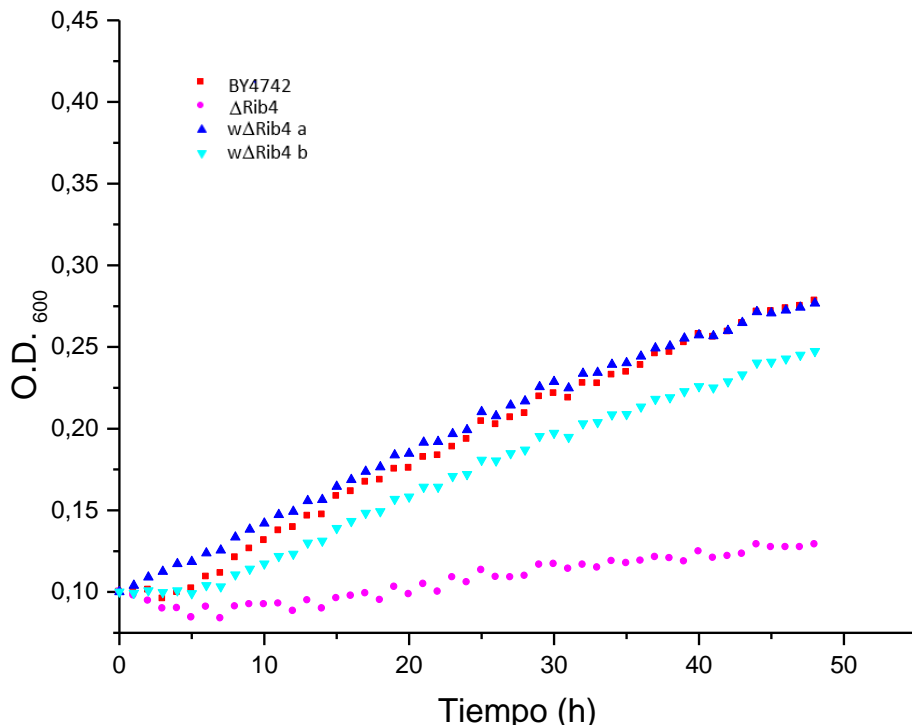


Figura 10. Crecimiento de las cepas BY4742, Δ Rib4 y w Δ Rib4 en medio SDLac. Se midió con un lector automatizado de placas el crecimiento de las levaduras cada hora durante 48 h en medio SDLac suplementado con 1mM citrato férrico y 5% SFB, a 30 °C. La densidad inicial (O.D.₆₀₀) de los

cultivos fue de 0,1. w Δ Rib4 a y b corresponden a condiciones diferentes de cultivo post-infección. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos.

Al monitorear el crecimiento en el lector automatizado de placas se observó una diferencia en el crecimiento de la cepa w Δ Rib4 con respecto a la cepa Δ Rib4. Para comprobar esta diferencia en la velocidad de crecimiento se prosiguió a realizar una curva de crecimiento en medio YPLac Fe+ usando un fotocolorímetro Klett-Summerson, en donde los cultivos fueron de 100 ml y tuvieron una mayor aireación. En esta curva de crecimiento también se observó un mayor crecimiento de la cepa w Δ Rib4 y además se observó que la cepa Δ Rib4 no fue capaz de crecer en el medio respiratorio (Figura 11). También se observó que la cepa Δ Rib4 suplementada con riboflavina es capaz de crecer de manera similar a la cepa silvestre y, que al estar infectada crece más rápido que la no infectada en medio sin riboflavina adicionada. Además, se observó que la cepa BY4742 infectada y no infectada crecen de manera similar.

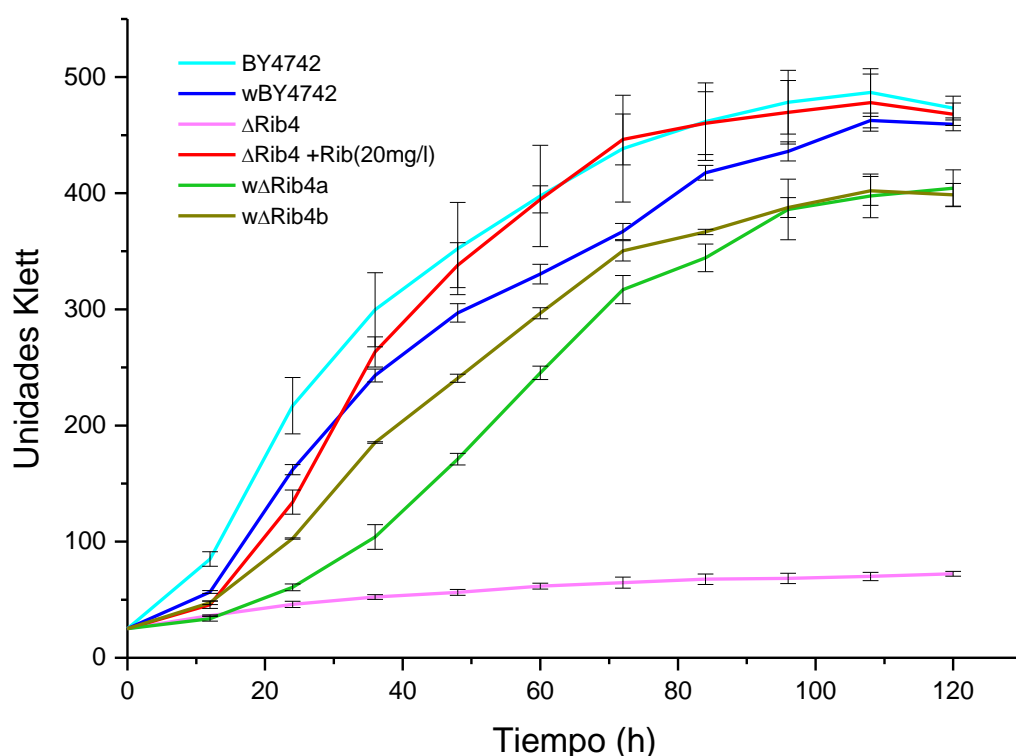


Figura 11. Crecimiento de las cepas BY4742, Δ Rib4 y w Δ Rib4 en medio YPLac Fe+ usando un fotocolorímetro Klett-Summerson. Cultivos de 100ml con una densidad óptica inicial (O.D.₆₀₀) de 0,1. Los cultivos se mantuvieron en agitación lenta a 30°C. Se tomaron lecturas cada 12 h durante 5 días. La cepa Δ Rib4 también fue cultivada en medio YPLac Fe+ Ri+ (riboflavina 20 mg/l) para ser usada como control adicional. w Δ Rib4 a y b corresponden a condiciones diferentes de cultivo post-infección. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm SD.

Al cultivar a la cepa Δ Rib4 en medio YPLac Fe+ con diferentes concentraciones de riboflavina (0, 4, 8, 12, 16 y 20 mg/l), se observó un aumento en la velocidad de crecimiento proporcional a la concentración de riboflavina (Figura 12), esto indica que la levadura toma la riboflavina disponible en el medio y la usa para optimizar su función mitocondrial, pudiendo así crecer a mayor velocidad en un medio respiratorio. El crecimiento de la cepa $w\Delta$ Rib4 en medio YPLac Fe+ (Figura 11) se asemeja al crecimiento de la cepa Δ Rib4 al ser suplementada con riboflavina (Figura 12), situándose en un punto intermedio; es decir, no alcanza la velocidad de la cepa al ser suplementada con 20 mg/l de riboflavina, pero rebasa por mucho a la velocidad de la que no tiene riboflavina adicional. El aumento en el crecimiento de la cepa infectada en medio respiratorio indica un aprovisionamiento de riboflavina por parte de *Wolbachia* a la levadura.

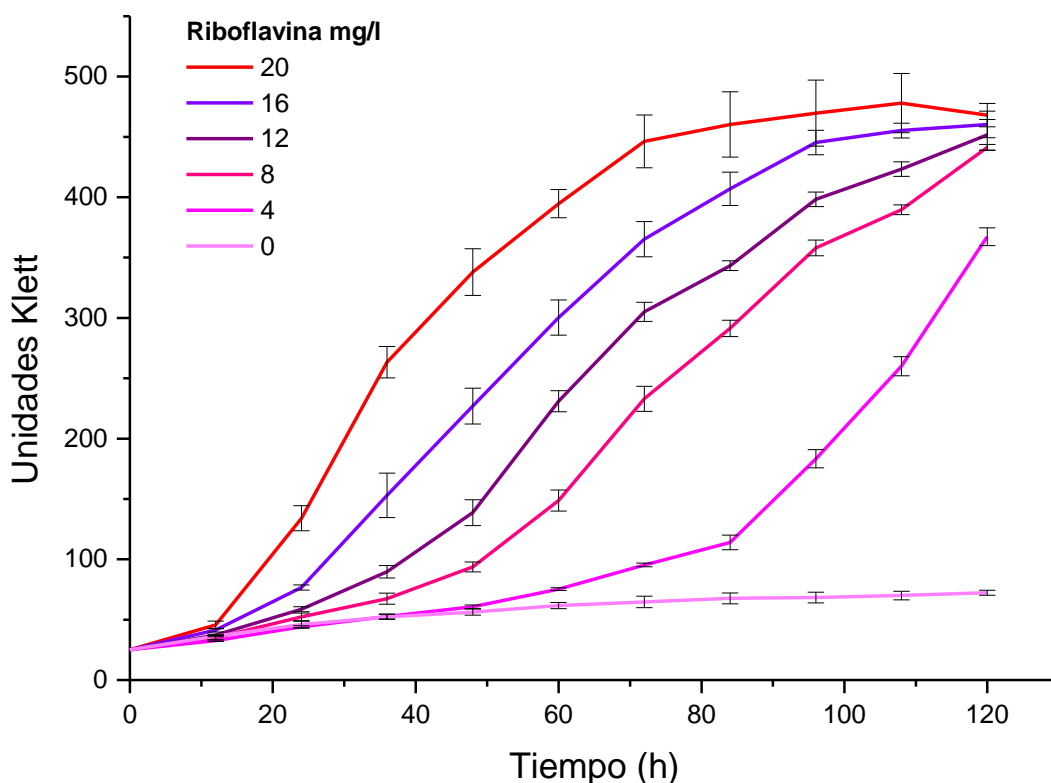


Figura 12. Monitoreo de crecimiento de la cepa Δ Rib4 en medio YPLac Fe+ con diferentes concentraciones de riboflavina (0, 4, 8, 12, 16 y 20 mg/l) usando un fotocolorímetro Klett-Summerson. Cultivos de 100ml con una densidad óptica inicial (O.D.₆₀₀) de 0,1. Los cultivos se mantuvieron en agitación lenta a 30°C. Se tomaron lecturas cada 12 h durante 5 días. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos \pm SD.

Consumo de oxígeno de la cepa w Δ Rib4

Al observar recuperación en el crecimiento en medio respiratorio de la cepa Δ Rib4 infectada con *Wolbachia*, se prosiguió a medir el consumo de oxígeno en la célula completa usando glucosa o lactato como sustrato. Se observó que la cepa Δ Rib4 tiene un consumo mínimo de oxígeno al ser cultivada en medio YPLac Fe+ pero incrementa su consumo cuando es cultivada en medio YPLac Fe+ suplementado con riboflavina (Tabla 3), lo que confirma su capacidad de incorporar riboflavina del medio y recuperar su capacidad mitocondrial. De manera similar, la cepa w Δ Rib4 presentó un mayor consumo de oxígeno que su contraparte no infectada aún creciendo en medio YPLac Fe+ sin adición de riboflavina, mostrando que *Wolbachia* podría estar suministrando algo de riboflavina a la levadura.

Tabla 3. Consumo de oxígeno por las diferentes cepas usando glucosa y lactato como sustrato.

Medio de cultivo	NanoAtomoO/min mg (células)			
	Cepa	Sustrato	Glucosa	Lactato
YPLac Fe+	BY4742		62,795 \pm 3,536	35,253 \pm 0,411
	Δ Rib4		2,502 \pm 0,314	3,160 \pm 0,414
	w Δ Rib4 a		7,073 \pm 1,099	8,234 \pm 2,529
	w Δ Rib4 b		10,352 \pm 0,541	11,392 \pm 0,568
YPLac Fe+ Riboflavina	BY4742		77,184 \pm 13,309	48,298 \pm 12,224
	Δ Rib4		24,634 \pm 3,090	18,138 \pm 2,946
	w Δ Rib4 a		27,872 \pm 0,804	29,882 \pm 4,042
	w Δ Rib4 b		42,912 \pm 2,2	36,700 \pm 1,733

Se midió el consumo de oxígeno de célula completa de las cepas BY4742, Rib4 y wRib4 usando 40 mM glucosa y 10 mM lactato como sustrato. Se usaron 25 mg (peso húmedo) de células, provenientes de cultivos en medio YPLac o YPLac suplementada con riboflavina 20 mg/l; SFB 5% y citrato férrico 1mM.

DISCUSIÓN

La relación que sostiene *Wolbachia* con su hospedero varía dependiendo del hospedero, mostrando comportamientos que van desde el mutualismo al parasitismo, siendo generalmente mutualista en nemátodos y parásito en artrópodos, aunque se ha reportado un comportamiento mutualista en algunas especies de artrópodos (Fenn & Blaxter 2006; Moriyama et al. 2015; Zug & Hammerstein 2015b). Al tener un comportamiento mutualista con algunos de sus hospederos se plantea que el hospedero provee de un nicho para el desarrollo de la bacteria, probablemente contribuyendo con ciertas moléculas necesarias para la bacteria y que a su vez *Wolbachia* provee ciertos nutrientes a su hospedero; sin embargo, hasta ahora se sabe poco acerca de los mecanismos o moléculas que podrían ayudar al establecimiento de esta relación.

Entre las moléculas propuestas que podrían proveer *Wolbachia* destacan el grupo hemo y la riboflavina (Foster et al. 2005; Li & Carlow 2012; Moriyama et al. 2015; Slatko et al. 2010; Wu et al. 2009), ambas moléculas cofactores de diversas proteínas. En este trabajo se propuso trabajar con un hospedero artificial, cepas mutantes de la levadura *S. cerevisiae* en la vía de síntesis de riboflavina y hemo, para *Wolbachia* (proveniente de *A. albopictus*), esto con el fin de establecer si *Wolbachia* es capaz de generar alguna de estas dos moléculas y proveerla al hospedero.

La cepa Δ Hem14, mutante del séptimo paso (reacción de protoporfirinógeno IX oxidasa) de la vía de síntesis de hemo (Glerum et al. 1996), no puede generar citocromos, y en consecuencia tampoco genera complejos de la cadena respiratoria, por lo que es incapaz de crecer en medios respiratorios (Camadro & Labbe, 1996). Debido a que se ha propuesto que *Wolbachia* podría estar participando en el metabolismo de hierro del hospedero (Gill et al. 2014), en específico contribuyendo con grupos hemo (Strübing et al. 2010; Wu et al. 2009), planteamos que al infectar la cepa Δ Hem14 con *Wolbachia*, la bacteria produciría hemos y los proporcionaría a la levadura, la cual recuperaría un fenotipo respiratorio similar a la cepa silvestre.

La cepa Δ Hem14 pudo ser infectada, aunque con una tasa de infección muy baja, al ser cultivada en medios fermentativos (YPD y YPGal), medios en los cuales es capaz de crecer incluso sin suplementarlos con hemo (hemina) (Lesuisse et al.

2005). No obstante, al ser infectada y cultivada en medio respiratorio (YPLac) no fue capaz de crecer, presentando un fenotipo idéntico al de la cepa no infectada, la cual no es capaz de crecer en medios respiratorios debido, en parte, a la ausencia de citocromos, necesarios en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Urban-Grimal & Labbe-Bois 1981). Estos resultados indicaron que aunque la bacteria parece ser capaz de infectar a la cepa mutante en la vía de síntesis de hemo, la levadura no obtiene la capacidad de crecer en medio respiratorio ni hacer que sus mitocondrias sean funcionales, lo que se comprobó al no detectar consumo de oxígeno en la cepa infectada.

Adicionalmente, al obtener el espectro de absorción de los citocromos en la fracción mitocondrial de $w\Delta\text{Hem14}$ no se observó un aumento en los máximos de absorción, que asemejarían a los de la cepa silvestre BY4742; el espectro que se obtuvo fue idéntico al de la cepa ΔHem14 (Figura 4) y similar a lo reportado anteriormente para esta cepa (Urban-Grimal & Labbe-Bois 1981), lo que indica que incluso si la levadura estaba infectada con *Wolbachia* no había una incorporación de hemo en los citocromos. Suponiendo que *Wolbachia* pudiera producir hemos pero que la levadura no los pudiera incorporar en los citocromos se midió el contenido total de hemo en las células. Observamos máximos de absorción de protoporfirina, el hemo del hierro es removido con el tratamiento con ácido oxálico (Sinclair, Gorman, & Jacobs, 2001), en la cepa mutante y la mutante infectada, que no obstante fueron mínimos en comparación a la cepa silvestre (Figura 5). Estos resultados fueron similares a los niveles de hemo reportados para esta cepa, cercanos al límite de detección del ensayo (Huang et al. 2011), aunque también podrían corresponder a una acumulación de protoporfirinas dentro de la célula (Urban-Grimal & Labbe-Bois 1981). Por otro lado, la ausencia de hemo en la célula también podía deberse a la incapacidad de la célula para incorporar hierro del medio, ya que se ha reportado disminución en la expresión de genes involucrados en el consumo de hierro en esta mutante (Crisp et al. 2003). Sin embargo, al cambiar la fuente de hierro de citrato férrico a sulfato ferroso, ya que el transporte de sales ferrosas parece no estar afectado en la cepa ΔHem14 (Lesuisse et al. 2005), tampoco se observó aumento en los picos de absorción de hemo en la mutante infectada, aunque sí aumentaron los niveles de hierro dentro de la célula.

Por otro lado, la evidencia reportada hasta ahora para determinar si hay un aprovisionamiento de hemo hacia las filarias no es suficiente para concluir que este aprovisionamiento sucede (Gill et al. 2014). Al inhibir la vía de síntesis de hemo de *Wolbachia* en *B. malayi* y *L. sigmodontis* se observaron efectos adversos en estas filarias, pero también en un nemátodo que no alberga a *Wolbachia* (*C. elegans*) indicando efectos tóxicos del inhibidor en las filarias (Wu et al. 2009; Lentz et al. 2013). Aunque se ha sugerido que el aprovisionamiento de hemo por parte de *Wolbachia* hacia sus filarias hospederas es vital, la ausencia de la vía de síntesis de hemo en todos los nemátodos (incluyendo las especies que no albergan a *Wolbachia*) sugiere que estos animales deben poder tomar hemo del medio (incluyendo a los que albergan a *Wolbachia*) (Gill et al. 2014; Desjardins et al. 2013), y de hecho se ha demostrado que *B. malayi* es capaz de transportar hemo exógeno (Luck et al. 2017). Sin embargo, se plantea que la capacidad de las filarias para internalizar hemo no excluiría una provisión por parte de *Wolbachia* sino que esta sería importante en momentos del ciclo de vida cuando la demanda de hemo es alta, por ejemplo la embriogénesis (Grote et al. 2017; Foster et al. 2005; Gill et al. 2014). Con estos antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo pudimos concluir que, en nuestro modelo de infección, *Wolbachia* no proporcionaba hemo a la levadura, lo cual se podría deber a la ausencia de síntesis de hemo en la bacteria, a defectos en el metabolismo de hierro de la levadura, o bien a que la cantidad de infección fue insuficiente para obtener una producción de hemo que pudiera ser utilizado por la levadura.

En la simbiosis *Wolbachia*-hospedero, además del grupo hemo, otra molécula que parece participar en la interacción de *Wolbachia* con su hospedero es la riboflavina o vitamina B₂ (Foster et al. 2005; Ghedin et al. 2007). El aprovisionamiento de metabolitos por parte de endosimbiontes hacia sus hospederos insectos ha sido observado en asociaciones obligadas (Zientz et al. 2004), como en el caso de *Buchnera aphidicola*, que suplementa con vitamina B a su hospedero (Nakabachi & Ishikawa 1999). Así mismo, se ha demostrado la provisión de riboflavina y otras vitaminas por parte de endosimbiontes facultativos hacia sus hospederos (Fridmann-Sirkis et al. 2014; Heddi et al. 2001). El aprovisionamiento de vitamina B por parte de una bacteria puede jugar un papel muy importante no sólo en insectos que lo requieren nutricionalmente al alimentarse únicamente de

sangre o savia, sino en diversos insectos asociados con simbioses facultativas que buscan mantener sus infecciones en poblaciones naturales de hospederos (Moriyama et al. 2015).

Los efectos de la riboflavina en modelos *Wolbachia*-hospedero han sido evaluados fácilmente usando medios suplementados o no con riboflavina y viendo los efectos de los mismos en hospederos que albergan a *Wolbachia*. En estos trabajos se ha observado que los efectos de la eliminación de *Wolbachia* en el hospedero pueden ser revertidos al suplementar el medio con vitaminas (Fallon et al. 2014; Li & Carlow 2012; Moriyama et al. 2015). Con estos antecedentes, la evaluación en el crecimiento de una levadura mutante en la vía de síntesis de riboflavina (Δ Rib4) infectada y no infectada con *Wolbachia* en medios suplementados o no con riboflavina contribuyó a determinar si existe un aprovisionamiento de riboflavina por parte de *Wolbachia* en nuestro modelo.

Se ha reportado que mutantes de levadura auxótrofos para riboflavina requieren una cantidad significativa de riboflavina (1 a 10 μ g/ml) para poder crecer, mientras que las prototróficas no la toman del medio en cantidades significativas (Perl et al. 1976; Abbas & Sibirny 2011). La cepa Δ Rib4, mutante del cuarto paso de la vía de síntesis de riboflavina, de *S. cerevisiae* recuperó su crecimiento en medio respiratorio al ser suplementado con diferentes cantidades de riboflavina (Figura 12), indicando que es capaz de consumir la riboflavina del medio y generar cofactores necesarios para la cadena de transporte de electrones de la mitocondria; en contraste la cepa Δ Rib1 no fue capaz de crecer en dicho medio suplementado o no con riboflavina (Figura 7). Teniendo un fenotipo diferencial de crecimiento de la cepa Δ Rib4 al adicionar riboflavina o no en medio respiratorio (YPLac), la infección de esta cepa con *Wolbachia* nos podría llevar a obtener resultados de crecimiento relativos a este fenotipo. Así, al infectar a la cepa Δ Rib4 con *Wolbachia* se observó crecimiento de la misma en medio respiratorio sin suplementar con riboflavina (Figura 11). Esto mostró que la presencia de *Wolbachia* en la levadura parecía tener un papel similar a la suplementación del medio con riboflavina, sin llegar a un crecimiento idéntico a la cepa silvestre, pero que superaba claramente el crecimiento de la cepa en ausencia de riboflavina. Además en un medio SDLac, donde la concentración de riboflavina es de alrededor de 0.2 mg/l (YNB, Sigma ®)

también se observó crecimiento de las levaduras infectadas (Fig. 10) indicando que posiblemente la riboflavina sintetizada por *Wolbachia* es la responsable de este crecimiento. Además, al medir consumo de oxígeno se observó que la cepa Δ Rib4 tiene un consumo mínimo de oxígeno al ser cultivada en medio YPLac Fe+ pero que incrementa su consumo cuando es cultivada en medio YPLac Fe+ Riboflavina, lo que confirma su capacidad de incorporar riboflavina del medio y recuperar su capacidad mitocondrial (Tabla 3). De manera similar, la cepa $w\Delta$ Rib4 presentó un mayor consumo de oxígeno que su contraparte no infectada aún creciendo en medio YPLac Fe+ sin adición de riboflavina, reafirmando que *Wolbachia* puede estar suministrando riboflavina a la levadura.

En la interacción de *Wolbachia* con filarias, el análisis del genoma de *Brugia malayi* indica que carece de la vía de síntesis de riboflavina (Ghedini et al. 2007) y se ha propuesto que un recurso probable de esta vitamina es su endosimbionte *wBm* (Foster et al. 2005). Acorde a esto, se ha reportado aprovisionamiento de riboflavina por parte de *wBm* hacia *B. malayi* (Li & Carlow 2012). Este fenómeno también se observó en el sistema *Wolbachia-Cimex lectularius* (Arthropoda), donde además la relación de *Wolbachia* con su hospedero parece ser mutualista (Moriyama et al. 2015). Este último ejemplo es de particular interés, ya que la presencia de *Wolbachia* en insectos ha sido principalmente asociada a una relación de parasitismo (Werren et al. 2008), aunque también se ha planteado que pueda tener un papel mutualista (Zug & Hammerstein 2015a). En nuestro modelo observamos que la presencia de *Wolbachia* en la levadura mutante en la vía de síntesis de riboflavina le confiere la capacidad de crecer en medio con niveles bajos de riboflavina, lo que podría señalar un aprovisionamiento de riboflavina por parte de la bacteria. Esta explicación es probable ya que la vía de síntesis de riboflavina se encuentra altamente conservada entre las cepas de *Wolbachia* asociadas a insectos (Moriyama et al. 2015) y la cepa utilizada en este proyecto proviene de un insecto.

CONCLUSIONES

La cepa mutante en la vía de síntesis de riboflavina fue capaz de recuperar un fenotipo respiratorio similar al de la cepa silvestre al estar infectada con *Wolbachia*, fenómeno que no se observó en la cepa mutante de la vía de síntesis de hemo.

Con estos resultados concluimos que en nuestro modelo de infección *Wolbachia* no provee de hemo a la levadura, pero sí de riboflavina.

PERSPECTIVAS

- Determinación del contenido de riboflavina intracelular en la cepa Δ Rib4 infectada con *Wolbachia*.
- Determinación de incorporación de riboflavina del medio en la cepa Δ Rib4 infectada y no infectada.
- Analizar el efecto de la riboflavina en el crecimiento de la cepa silvestre y sus efectos en la cadena respiratoria.
- Análisis de expresión de los genes de la vía de síntesis de riboflavina en *Wolbachia*.
- Determinar la actividad de riboflavina cinasa en la cepa Δ Rib4 infectada y no infectada.
- Determinar la concentración de ATP en las cepas BY4742 y Δ Rib4 infectadas y no infectadas

REFERENCIAS

- Abbas, C.A. & Sibirny, A.A., 2011. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), pp.321–360.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2010. Biochemistry. In *Biochemistry textbook*. p. 1026.
- Brachmann, C.B. et al., 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14(2), pp.115–132.
- Brown, A.M. V. et al., 2016. Genomic evidence for plant-parasitic nematodes as the earliest *Wolbachia* hosts. *Scientific Reports*, 6(October), p.34955.
- Camadro, J.M. & Labbe, P., 1996. Cloning and characterization of the yeast HEM14 gene coding for protoporphyrinogen oxidase, the molecular target of diphenyl ether-type herbicides. *Journal of Biological Chemistry*, 271(15), pp.9120–9128.
- Castro Guerrero, N.A. & Moreno Sánchez, R., 2004. Biosíntesis del Grupo Hemo. , 23(3), pp.99–106.
- Crisp, R.J. et al., 2003. Inhibition of Heme Biosynthesis Prevents Transcription of Iron Uptake Genes in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), pp.45499–45506.
- Dailey, H.A. et al., 2017. Prokaryotic Heme Biosynthesis: Multiple Pathways to a Common Essential Product. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(1), pp.e00048-16.
- Darby, A.C. et al., 2012. Analysis of gene expression from the *Wolbachia* genome of a filarial nematode supports both metabolic and defensive roles within the symbiosis. *Genome Research*, 22(12), pp.2467–2477.
- Desjardins, C.A. et al., 2013. Genomics of *Loa loa*, a *Wolbachia*-free filarial parasite of humans. *Nature Genetics*.
- Dimmer, K., Fritz, S. & Fuchs, F., 2002. Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of*.
- Douglas, A.E., 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbiosis: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43, pp.17–37.
- Fallon, A.M., 2008. Cytological properties of an *Aedes albopictus* mosquito cell line infected with *Wolbachia* strain wAlbB. , 48(Suppl 2), pp.1–6.
- Fallon, A.M. et al., 2014. Depletion of host cell riboflavin reduces *Wolbachia* levels in cultured mosquito cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 50(8), pp.707–713.
- Fenn, K. & Blaxter, M., 2006. *Wolbachia* genomes: Revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends in Parasitology*, 22(2), pp.60–65.
- Fenollar, F. et al., 2003. Culture and Phenotypic Characterization of a *Wolbachia pipientis*

- Isolate. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), pp.5434–5441.
- Foster, J. et al., 2005. The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology*, 3(4), pp.0599–0614.
- Fridmann-Sirkis, Y. et al., 2014. Delayed development induced by toxicity to the host can be inherited by a bacterial-dependent, transgenerational effect. *Frontiers in Genetics*, 5(FEB), pp.1–14.
- García-Angulo, V.A., 2017. Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(2), pp.196–209.
- Gavotte, L. et al., 2007. A survey of the bacteriophage WO in the endosymbiotic bacteria Wolbachia. *Molecular Biology and Evolution*, 24(2), pp.427–435.
- Genty, L. et al., 2014. Wolbachia Infect Ovaries in the Course of Their Maturation : Last Minute Passengers and Priority Travellers ? , 9(4).
- Ghedini, E. et al., 2007. Draft Genome of the Filarial Nematode Parasite *Brugia malayi*. *Science*, 317(5845), pp.1756–1760.
- Gill, A.C., Darby, A.C. & Makepeace, B.L., 2014. Iron Necessity: The Secret of Wolbachia's Success? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10).
- Glerum, D.M. et al., 1996. Cloning and identification of HEM14, the yeast gene for mitochondrial protoporphyrinogen oxidase. *Yeast*, 12(14), pp.1421–1425.
- Grote, A. et al., 2017. Defining *Brugia malayi* and Wolbachia symbiosis by stage-specific dual RNA-seq. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), pp.1–21.
- Heddi, A., Charles, H. & Khatchadourian, C., 2001. Intracellular bacterial symbiosis in the genus *Sitophilus*: The “biological individual” concept revisited. *Research in Microbiology*, 152(5), pp.431–437.
- Heddi, A., Lefebvre, F. & Nardon, P., 1993. Effect of Endocytobiotic Bacteria on Mitochondrial Enzymatic-Activities in the Weevil *Sitophilus-Oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23(3), pp.403–411.
- Hedges, L.M. et al., 2008. Wolbachia and virus protection in insects. *Science*, 322(5902), p.702.
- Heinemann, I.U., Jahn, M. & Jahn, D., 2008. The biochemistry of heme biosynthesis. , 474, pp.238–251.
- Hilgenboecker, K. et al., 2008. How many species are infected with Wolbachia? - A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*.
- Hoerauf, A. et al., 1999. Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *Journal of Clinical Investigation*, 103(1), pp.11–18.
- Huang, Z. et al., 2011. Sampangine inhibits heme biosynthesis in both yeast and human. *Eukaryotic Cell*, 10(11), pp.1536–1544.
- Iturbe-Ormaetxe, I. et al., 2005. Distribution, expression, and motif variability of ankyrin

- domain genes in *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology*, 187(15), pp.5136–5145.
- Lafuente, M.J. & Gancedo, C., 1999. Disruption and basic functional analysis of six novel ORFs of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(10B), pp.935–943.
- Lentz, C.S. et al., 2013. A selective inhibitor of heme biosynthesis in endosymbiotic bacteria elicits antifilarial activity in vitro. *Chemistry and Biology*, 20(2), pp.177–187.
- LePage, D.P. et al., 2017. Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Nature*, 543(7644), pp.243–247.
- Lesuisse, E. et al., 2005. Genome-Wide Screen for Genes With Effects on Distinct Iron Uptake Activities in *Saccharomyces cerevisiae*. , 122(January), pp.107–122.
- Leung, T.L.F. & Poulin, R., 2008. Parasitism, commensalism, and mutualism: Exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu*, 58(2), pp.107–115.
- Li, Z. & Carlow, C.K.S., 2012. Characterization of Transcription Factors That Regulate the Type IV Secretion System and Riboflavin Biosynthesis in *Wolbachia* of *Brugia malayi*. *PLoS ONE*, 7(12).
- Lindsey, A.R.I. et al., 2016. Comparative Genomics of a Parthenogenesis-Inducing *Wolbachia* Symbiont. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 6(7), pp.2113–2123.
- Luck, A.N. et al., 2014. Concurrent transcriptional profiling of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont throughout the nematode life cycle reveals coordinated gene expression. *BMC Genomics*, pp.1–18.
- Luck, A.N. et al., 2017. Heme acquisition in the parasitic filarial nematode *Brugia malayi*.
- Luck, A.N. et al., 2015. Tissue-specific transcriptomics and proteomics of a filarial nematode and its *Wolbachia* endosymbiont. *BMC genomics*, 16(1), p.920.
- Masson, F. et al., 2018. In Vitro Culture of the Insect Endosymbiont *Spiroplasma poulsonii* Highlights Bacterial Genes Involved in Host- Symbiont Interaction. *mBio*, 9(2), pp.1–11.
- Mondo, S.J. et al., 2017. Bacterial endosymbionts influence host sexuality and reveal reproductive genes of early divergent fungi. *Nature Communications*, 8(1).
- Moran, N.A. & Baumann, P., 2000. Bacterial endosymbionts in animals Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinion in Microbiology*, 3(1), pp.270–275.
- Moreira, L.A. et al., 2009. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), pp.1268–1278.
- Morin, P.J., 2011. *Community Ecology*,
- Moriyama, M. et al., 2015. Riboflavin Provisioning Underlies *Wolbachia* ' s Fitness Contribution to Its Insect Host. *mBio*, 6(6), pp.1–8.
- Nakabachi, A. & Ishikawa, H., 1999. Provision of riboflavin to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera*. *Journal of Insect Physiology*, 45(1), pp.1–6.

- Noda, H., Miyoshi, T. & Koizumi, Y., 2002. In vitro cultivation of Wolbachia in insect and mammalian cell lines. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 38(7), pp.423–427.
- Oborník, M. & Green, B.R., 2005. Mosaic origin of the heme biosynthesis pathway in photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 22(12), pp.2343–2353.
- Oulhen, N., Schulz, B.J. & Carrier, T.J., 2016. English translation of Heinrich Anton de Bary's 1878 speech, 'Die Erscheinung der Symbiose' ('De la symbiose'). *Symbiosis*, 69(3), pp.131–139.
- Panek, H. & O'Brian, M.R., 2002. A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology*, 148(8), pp.2273–2282.
- Perl, M., Kearney, E.B. & Singer, T., 1976. Transport of Riboflavin into Yeast Cells. *The EMBO Journal*, 251(11), pp.3221–3228.
- Ramírez-Puebla, S.T. et al., 2016. Genomes of Candidatus Wolbachia bourtzisii w DacA and Candidatus Wolbachia pipientis w DacB from the Cochineal Insect Dactylopius coccus (Hemiptera : Dactylopiidae). *Genes Genomes Genetics*, 6(October), pp.3343–3349.
- Rao, A.U. et al., 2005. Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, pp.4270–4275.
- Rasgon, J.L., Gamston, C.E. & Ren, X., 2006. Survival of Wolbachia pipientis in cell-free medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), pp.6934–6937.
- Relman, D.A., 2008. "Til death do us part": Coming to terms with symbiotic relationships. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), pp.721–724.
- Santos, M.A., Garcia-Ramirez, J.J. & Revuelta, J.L., 1995. Riboflavin biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. Cloning, characterization, and expression of the RIB5 gene encoding riboflavin synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(1), pp.437–444.
- Serbus, L.R. et al., 2017. Predictive Genomic Analyses Inform the Basis for Vitamin Metabolism and Provisioning in Bacteria-Arthropod Endosymbioses. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 7(6), pp.1887–1898.
- Sherman, F., 2001. 1 Yeast is a Model Eukaryote. *Yeast*, pp.1–2.
- Sinclair, P.R., Gorman, N. & Jacobs, J.M., 2001. Measurement of heme concentration. *Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines (editor-in-chief) ... [et al.]*, Chapter 8, p.Unit 8.3.
- Slatko, B.E., Taylor, M.J. & Foster, J.M., 2010. The Wolbachia endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis*, 51(1), pp.55–65.
- Snyder, A.K. et al., 2010. Nutrient provisioning facilitates homeostasis between tsetse fly (Diptera: Glossinidae) symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1692), pp.2389–2397.
- Steinmetz, L.M. et al., 2002. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet*, 31(4), pp.400–404.

- Stork, N.E., 2018. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annual Review of Entomology*, 63(1), pp.31–45.
- Strübing, U. et al., 2010. Mitochondrial genes for heme-dependent respiratory chain complexes are up-regulated after depletion of Wolbachia from filarial nematodes. *International Journal for Parasitology*, 40(10), pp.1193–1202.
- Sullivan, W. & O'Neill, S.L., 2017. Microbiology: Manipulation of the manipulators. *Nature*, 543(7644), pp.182–183.
- Urban-Grimal, D. & Labbe-Bois, R., 1981. Genetic and biochemical characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* blocked in six different steps of heme biosynthesis. *Molecular & general genetics : MGG*, 183(1), pp.85–92.
- Villavicencio-Queijeiro, A., 2012. La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), pp.116–132.
- Wernegreen, J.J., 2012. Endosymbiosis. *Current Biology*, 22(14), pp.555–561.
- Wernegreen, J.J., 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), pp.850–861.
- Werren, J.H., Baldo, L. & Clark, M.E., 2008. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Rev Microbiol*, 6(10), pp.741–751.
- Wicker, C., 1983. Differential vitamin and choline requirements of symbiotic and aposymbiotic *S. oryzae* (coleoptera: curculionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 76(1), pp.177–182.
- Williams, K.P., Sobral, B.W. & Dickerman, A.W., 2007. A robust species tree for the Alphaproteobacteria. *Journal of Bacteriology*.
- Wu, B. et al., 2009. The heme biosynthetic pathway of the obligate Wolbachia endosymbiont of *Brugia malayias* a potential anti-filarial drug target. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(7), pp.1–10.
- Wu, M. et al., 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite Wolbachia pipientis wMel: A streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology*, 2(3).
- Zientz, E., Dandekar, T. & Gross, R., 2004. Metabolic Interdependence of Obligate Intracellular Bacteria and Their Insect Hosts Metabolic Interdependence of Obligate Intracellular Bacteria and Their Insect Hosts †. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), pp.745–770.
- Zug, R. & Hammerstein, P., 2015a. Bad guys turned nice? A critical assessment of Wolbachia mutualisms in arthropod hosts. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 90(1), pp.89–111.
- Zug, R. & Hammerstein, P., 2015b. Wolbachia and the insect immune system: What reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of Wolbachia-host interactions. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), pp.1–16.