



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: *Wolbachia*, una bacteria útil para eliminar  
infecciones por virus y parásitos.**

Autor: María de la Mata Fernández

Fecha: Julio 2020

Tutor: Federico Navarro García

## ÍNDICE

1	RESUMEN.....	2
2	INTRODUCCIÓN .....	2
2.1	Ecología de <i>Wolbachia</i> .....	2
2.2	<i>Wolbachia</i> en artrópodos.....	3
2.2.1	Incompatibilidad citoplasmática.....	4
2.2.2	Androcidio o muerte de los machos.....	6
2.2.3	Partenogénesis.....	6
2.2.4	Feminización.....	6
2.2.5	Interacción de <i>Wolbachia</i> con otros patógenos.....	6
2.3	<i>Wolbachia</i> en nematodos.....	7
2.4	<i>Wolbachia</i> desde el punto de vista socioeconómico, sanitario y ambiental.....	8
3	OBJETIVOS.....	9
4	MATERIAL Y MÉTODOS .....	9
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
5.1	Control de vectores de enfermedades infecciosas .....	9
5.1.1	Estrategia del Reemplazo Poblacional .....	9
5.1.2	Técnica del Insecto Incompatible.....	11
5.2	Control de otros artrópodos .....	13
5.3	<i>Wolbachia</i> como diana farmacológica en las filarias .....	14
5.3.1	Antibioticoterapia anti- <i>Wolbachia</i> .....	14
5.3.2	Búsqueda de nuevas dianas y fármacos anti- <i>Wolbachia</i> .....	16
6	CONCLUSIONES .....	18
7	BIBLIOGRAFÍA.....	19

## 1 RESUMEN

*Wolbachia* es una bacteria intracelular obligada en células animales, principalmente de artrópodos y nematodos. Con estos seres vivos establece relaciones de parasitismo, en el caso de los artrópodos, y de mutualismo en el caso de los nematodos. Su capacidad para modificar la reproducción de los artrópodos la hace muy interesante como herramienta para el control de poblaciones de vectores, principalmente mosquitos, transmisores de enfermedades de gran incidencia mundial como el dengue, zika o chikungunya, entre otras. Para esto se ha propuesto la aplicación de técnicas como el reemplazamiento poblacional y la técnica del insecto incompatible. Por otro lado, en el caso de los nematodos, su importancia reside en las filarias, responsables de las filariasis. Estas enfermedades afectan a miles de personas en varias partes del mundo y los tratamientos disponibles hasta ahora son muy limitados. Aprovechando la relación de mutualismo que existe entre estos parásitos y *Wolbachia*, se han propuesto nuevos enfoques en el tratamiento de las filariasis como alternativa a los antiparasitarios convencionales. Estos tratamientos están dirigidos contra *Wolbachia*, entre ellos se encuentran tanto antibióticos ya conocidos como la doxiciclina, como otros fármacos, nuevos o no, que han mostrado actividad frente a *Wolbachia*. En conclusión, la investigación de esta bacteria es un tema de gran actualidad. Las peculiaridades de las relaciones de *Wolbachia* con los organismos a los que infecta han hecho que sea una herramienta de mucho interés y que podría suponer grandes avances en el control de muchas enfermedades infecciosas que afectan a millones de personas alrededor del mundo.

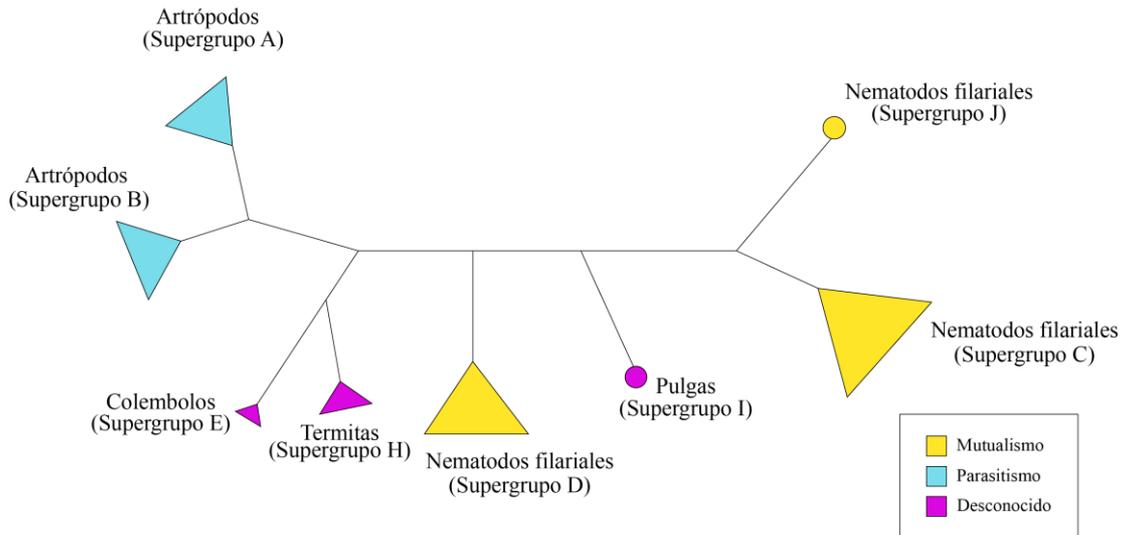
**Palabras clave:** *Wolbachia*, bacterias, endosimbionte, control biológico, artrópodos, mosquitos, vectores, dengue, chikungunya, malaria, zika, filarias, nematodos, filariasis, antibióticos, doxiciclina.

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Ecología de *Wolbachia*.

En 1924 fue descrita la bacteria *Wolbachia pipientis* por Hertig y Wolbach en tejidos del mosquito *Culex pipiens* y, hasta la actualidad, es la única especie que se ha descrito. Se trata de una bacteria Gram negativa, endosimbionte, intracelular obligada, que pertenece al *phylum* *Proteobacteria*, clase *Alfaproteobacteria*, orden *Rickettsiales*, familia *Anaplasmataceae* y género *Wolbachia*. Son parásitos intracelulares, estrictos o mutualistas, de células animales de, principalmente, artrópodos y nematodos (1,2).

El interés de esta bacteria reside en su gran capacidad de infección y en su presencia en gran cantidad de seres vivos a lo largo del mundo. Con el desarrollo de técnicas como la PCR y la secuenciación de DNA, en los años 90 se pudieron realizar varios estudios para determinar la presencia de *Wolbachia* en diferentes organismos. Uno de ellos se realizó en Panamá, Estados Unidos e Inglaterra por John Werren (Universidad de Rochester, NY) y su resultado fue que en un 20% de los insectos estaba presente *Wolbachia*. Otros estudios en zonas geográficas más pequeñas reflejaron que *Wolbachia* se encontraba en un 75% de los insectos y en siguientes trabajos se demostró que no solo estaba presente en estos, sino que también se podía detectar en arácnidos, hexápodos, crustáceos, anfípodos, ostrácodos, cirrípedos y nematodos. Entre estos últimos, se encuentran los nematodos filariales que tienen gran importancia por su capacidad de producir enfermedades en el hombre y otros animales (3,4). Todo ello da una idea de la importante presencia de esta bacteria en diferentes ecosistemas y seres vivos.



**Figura 1.** Árbol filogenético no enraizado de los principales supergrupos de *Wolbachia* y sus relaciones de mutualismo o parasitismo reproductivo (4,10).

Hay estudios que muestran gran diversidad dentro de este género existiendo diferentes supergrupos o grupos de cepas de *Wolbachia* y algunos de ellos solo infectan específicamente a determinados organismos, lo que pudiera estar relacionado con su diversidad (**Figura 1**) (4). En el caso de los nematodos filariales, se ha comprobado que las bacterias se encuentran en las cuerdas laterales de machos y hembras formando poblaciones homogéneas, en las que no se ha detectado que en estos nematodos se produzca recombinación genética entre ellas y en un mismo individuo siempre se aísla la misma cepa de *Wolbachia pipientis*. Por otro lado, en los artrópodos se puede producir recombinación genética entre especímenes de *Wolbachia* y encontrarse infecciones por diferentes cepas en un mismo hospedador (2).

En los artrópodos, *Wolbachia* tiene un papel de parasitismo reproductivo, siendo capaz de manipular la reproducción de estos para asegurar la propagación de la infección (4). La relación que tiene con las filarias es diferente, no se comporta como un parásito, sino que es una bacteria endosimbionte mutualista obligada. La presencia de *Wolbachia* es necesaria para la filaria y viceversa, lo que también es una estrategia de *Wolbachia* para asegurar su presencia en estos nematodos y su transmisión (5).

Esta capacidad de *Wolbachia* para controlar la reproducción de los artrópodos y la relación de mutualismo que tiene lugar en los nematodos, filarias en especial, unido a su presencia en un gran porcentaje de estos animales, hacen de esta bacteria una herramienta muy útil para el control de enfermedades infecciosas. Por tanto, podríamos aprovecharla para el control de las poblaciones de mosquitos y otros artrópodos, que son vectores de enfermedades, y como diana terapéutica para el tratamiento de las filarisis producidas por nematodos. El trabajo se centrará en estas aplicaciones.

## 2.2 *Wolbachia* en artrópodos.

Como ya se ha indicado previamente, *Wolbachia* infecta a una gran cantidad de animales, entre ellos, según recientes metaanálisis, a un 40% de las especies de artrópodos (4). Dentro de los artrópodos se encuentra la clase de los insectos en los que *Wolbachia* está presente en el 70% de sus especies (2). Entre los insectos, son de gran interés los dípteros (mosquitos y moscas), ya que son vectores de gran cantidad de enfermedades infecciosas. De hecho, fue en los tejidos

reproductivos de un mosquito (*Culex pipiens*) donde se encontró por primera vez a *Wolbachia* (4).

La transmisión de la infección es principalmente vertical, es decir, se transfiere de una madre infectada a los hijos. Esta transferencia por vía materna es esencial para entender la manipulación reproductiva que produce esta bacteria, siendo capaz de inducir en los artrópodos cuatro fenotipos reproductivos como son la incompatibilidad citoplasmática, la partenogénesis, la muerte selectiva de los machos y la feminización de los machos, que se explicarán a continuación. Estos mecanismos aseguran la transmisión de la infección y favorecen el incremento de las poblaciones femeninas que son las que van a transferir la bacteria a la progenie (2,4). Además de esta transmisión vertical, se ha barajado la posibilidad de que también haya una transmisión horizontal, que explicaría la presencia de esta bacteria en especies diferentes. Esta transmisión horizontal puede ser debida al parasitismo y a la ingesta de individuos infectados (4).

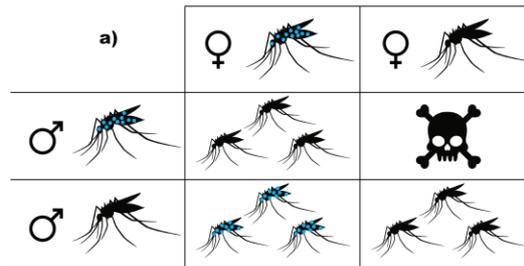
La alteración de la reproducción que induce *Wolbachia* en estos organismos, es la clave del interés que tiene como herramienta de control biológico.

### 2.2.1 Incompatibilidad citoplasmática.

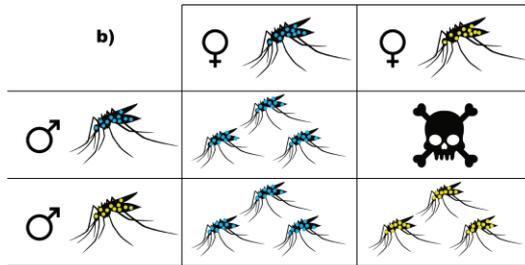
En los años 50, antes de todos estos descubrimientos sobre la abundancia de *Wolbachia* en diferentes organismos, se observó que determinados cruzamientos entre individuos de *Culex pipiens* no producían progenie o era escasa, fenómeno que se denominó incompatibilidad citoplasmática (4). Más adelante, en los años 70, en una especie de avispa se observó que si los machos infectados por *Wolbachia* se apareaban con hembras que no estaban infectadas, los individuos de la descendencia resultante que no estuviesen infectados no sobrevivían; pero si un macho, estando o no infectado, se apareaba con una hembra infectada con la bacteria, todos los individuos de la progenie resultaban viables e infectados (3).

La incompatibilidad citoplasmática, o IC, es un defecto que se produce tras la fertilización. Se sabe que tiene que ver con defectos en el DNA y en la mitosis, que producen un alto nivel de muerte embrionaria. Se trata, además, del principal mecanismo que induce *Wolbachia* para su difusión. Como se puede observar en la **Figura 2a**, este fallo reproductivo se produce cuando el esperma de machos infectados fertiliza los huevos de una hembra no infectada. Pero el cruce es compatible si se cruzan una hembra infectada y un macho sano o infectado con la misma cepa de *Wolbachia* que la hembra. Al ser una infección que se transmite por vía vertical y materna, si la hembra está infectada se asegura que los hijos hereden la infección, favoreciendo la supervivencia de los individuos infectados, en especial las hembras, y eliminando de la población a las hembras que no están infectadas, ya que no son compatibles con otros machos que sí lo están. En este caso hablamos de una incompatibilidad unidireccional, porque el apareamiento es incompatible en un sentido, es decir, en el apareamiento de una hembra sana y un macho infectado. Si el macho y la hembra están infectados con cepas diferentes de *Wolbachia* también puede tener lugar una incompatibilidad unidireccional, cuando solo uno de los cruces es incompatible (**Figura 2b**), o bidireccional, cuando ambos cruces recíprocos son incompatibles (**Figura 2c**). En recientes investigaciones, se ha intentado dilucidar cómo esta infección induce la incompatibilidad utilizando insectos modelo (4,6,7).

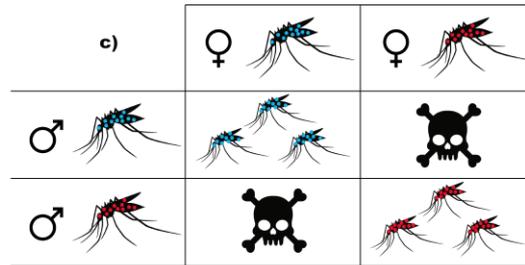
IC unidireccional entre machos infectados con *Wolbachia* y hembras no infectadas



IC unidireccional entre machos y hembras infectados con *Wolbachia*



IC bidireccional entre machos y hembras infectados con *Wolbachia*



**Figura 2.** Diferentes tipos de IC en mosquitos. Los puntos de colores indican la infección por *Wolbachia*, cada color hace referencia a una cepa diferente. **(a)** Este es el tipo de IC más simple. Tiene lugar al cruzarse machos infectados con *Wolbachia* y hembras no infectadas, lo que facilita la invasión por la bacteria de poblaciones no infectadas. **(b-c)** Estos otros tipos de IC ocurren entre machos y hembras que están infectados con *Wolbachia*, pero con diferentes cepas. Cuando el cruce entre un macho infectado (azul) y una hembra infectada con otra cepa (amarillo) es incompatible, y de forma reversa (hembra cepa azul y macho cepa amarilla) es compatible, se habla de IC unidireccional **(b)**. Si ambos cruces fuesen incompatibles, sería una IC bidireccional **(c)**. Basado en (7).

Se tiene certeza de que la penetrancia de la IC (el número de embriones afectados por la IC en un cruce) depende de las cepas de *Wolbachia* y del hospedador, por lo que diferentes cepas pueden producir diferentes niveles de IC en un mismo hospedador (8).

Los efectos que tiene la IC a nivel celular solo se han estudiado detalladamente en *Culex pipiens*, siendo la especie de la que más se conoce sobre este fenómeno. Mediante microscopía confocal de fluorescencia se llevó a cabo un seguimiento de la embriogénesis, estudiando diferentes cruces. Gracias a esto, se pudo observar los efectos que producía la IC a nivel celular, y que eran comunes a los que ocurrían en otras especies de insectos (*Drosophila simulans*, *Drosophila melanogaster* y *Nasomia vitripennis*). Dichos efectos consistían en defectos en la condensación del DNA paterno y en la segregación de los cromosomas durante la primera división embrionaria (7,8).

En cuanto a los mecanismos moleculares que están involucrados en la incompatibilidad citoplasmática, se pueden explicar mediante un sistema toxina-antídoto (8). En observaciones citológicas de *C. pipiens* se sugirió que una toxina depositada durante la maduración del esperma podría ser la responsable de evitar el desarrollo de los embriones, dando lugar a los defectos que se producen en la IC, a no ser que fuesen “rescatados” por un antídoto. A partir de varios estudios, se descubrieron los genes *cidA* y *cidB* y su implicación en la inducción y rescate de la IC. Estos genes se pueden expresar de forma transgénica en machos no infectados de *Drosophila*, que cuando se cruzan con hembras no infectadas se induce la IC de la misma manera que ocurre de forma natural entre machos infectados con *Wolbachia* y hembras sanas (7). Por un lado, el gen *cidB* codifica una enzima desubiquitinasa (DUB), que elimina la ubiquitina de las proteínas. La ubiquitina es un pequeño polipéptido que modifica postraduccionalmente diversas proteínas y tiene muchas funciones, entre otras la de marcarlas

para ser destruidas por el proteasoma (9). La proteína cidB se produce por *Wolbachia* durante la espermatogénesis e induce los defectos en la cromatina paterna que se producen en la IC, pero no se conocen sus posibles dianas moleculares (8,9). En cuanto a la función de *cidA*, no está tan clara, pero probablemente codifique el antídoto, siendo el factor de rescate que revierte los defectos de la cromatina paterna y permite que se produzca la embriogénesis de forma normal. Se puede comprobar que en la cepa Lavar de *Wolbachia* la proporción de expresión de *cidA* es superior que en otras cepas, lo que podría estar relacionado con la menor inducción de IC que tiene lugar en esta cepa (7,8). Existe una evidencia que respalda esta función de *cidA*, ya que en levaduras se ha observado que previene de la toxicidad de cidB (9) y si se expresa en hembras transgénicas no infectadas de *Drosophila* y estas se cruzan con machos infectados, no se produce la IC debido a que *cidA* se expresa en la oogénesis e impide el efecto tóxico de *cidB* (8).

### **2.2.2 Androcidio o muerte de los machos.**

En algunas especies de artrópodos se da esta alteración en la que los machos mueren antes de que se produzca la eclosión de los huevos, en una etapa temprana del desarrollo embrionario. Este mecanismo produce un aumento de la disponibilidad de alimento para las hembras supervivientes, favoreciéndose las poblaciones de hembras y la transmisión de la bacteria, ya que son las hembras las únicas capaces de transmitirla. Debido a esto, se piensa que *Wolbachia* tiene que tener la capacidad de diferenciar el sexo ya que mata a los embriones macho de forma selectiva, desconociéndose los mecanismos por los que esto ocurre (4,10).

### **2.2.3 Partenogénesis.**

La partenogénesis es una estrategia menos común que principalmente tiene lugar en especies de artrópodos en los que los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados, como es el caso de algunas especies de avispas (1,10). Aunque no es tan habitual, es de los mecanismos más eficaces de *Wolbachia*. Se trata de un tipo de reproducción en el que no se producen machos a partir de los huevos no fecundados, sino que las hembras infectadas sólo producen hijas a partir de huevos no fecundados. Esto da como resultado una progenie formada solamente por hembras que están infectadas y estas a su vez producirán sucesivas generaciones de hembras infectadas. Esta estrategia asegura la transmisión de la infección a toda la población (4,10).

### **2.2.4 Feminización.**

El fenómeno de feminización se basa en que un macho genético se convierte en una hembra, completamente funcional. Esto permite que un gran porcentaje de la descendencia sean hembras, facilitando la transmisión de la infección. Esta feminización ha sido descrita principalmente en isópodos y algunos insectos. Se ha propuesto que *Wolbachia* inhibe los genes que determinan la masculinidad y la diferenciación de la glándula androgénica, y de esta forma los machos pasan a ser hembras (4,10).

### **2.2.5 Interacción de *Wolbachia* con otros patógenos.**

Existe evidencia de que algunas cepas de *Wolbachia* pueden interactuar con patógenos como los virus del dengue, chikungunya, zika, West Nile; y parásitos como el protozoo *Plasmodium spp.*, entre otros (2).

Algunos estudios indican la capacidad de *Wolbachia* de disminuir la transmisión de este tipo de virus a través de los mosquitos. Se ha demostrado que la cepa wMel es capaz de bloquear la transmisión de virus como el del dengue, zika y chikungunya. (11).

Aunque todavía no se conoce la razón por la que esto ocurre, se han sugerido varios mecanismos para explicar el posible proceso de inhibición de la replicación viral como la competencia por ácidos grasos como el colesterol entre el hospedador y el virus, la modificación del miRNA (12), pequeñas moléculas de ARN que regulan la expresión génica post-traducciona (13), o la inducción del sistema inmune del hospedador, se han sugerido como factores que podrían disminuir la replicación del virus. En un estudio reciente, se ha propuesto que el bloqueo de la replicación de virus como el del dengue y el West Nile, se debe a la degradación de su RNA en presencia de *Wolbachia*. Se observó que esta inhibición no tiene que ver con la alteración de la unión ni la internalización del virus, pero se descubrió que se acumulan fragmentos de la región 3' del RNA viral que inhiben la actividad de la enzima celular XRN1, encargada de su degradación. En presencia de *Wolbachia*, pero por mecanismos todavía por dilucidar, se reduce la inhibición de la enzima, aumentando la degradación del RNA viral y, por tanto, se bloquea su replicación, aunque este quizá no sea el único mecanismo responsable de ello (12).

En el caso de *Plasmodium*, se ha sugerido que en mosquitos del género *Anopheles* algunas cepas de *Wolbachia* como *wAlbB*, serían capaces de inhibir este parásito por medio de la producción de un ambiente de estrés oxidativo (14).

Tanto en el caso de los virus, como de *Plasmodium*, se debe tener en cuenta la posibilidad de aparición de resistencias de estos patógenos a la inhibición producida por *Wolbachia* (4,14).

### 2.3 *Wolbachia* en nematodos

Dentro del grupo de los nematodos, *Wolbachia* tiene mayor importancia en las filarias. La mayoría de estos nematodos son hospedadores de esta bacteria. En los años 70, se observó la presencia de unas estructuras de tipo bacteriano similares a rickettsias o clamidias en varios nematodos filariales mediante microscopía electrónica. Años después, en 1994, se puso en marcha el *Filarial Genome Project*, financiado por la OMS, que permitió, entre otros proyectos, redescubrir a *Wolbachia*. El estudio mediante genómica y secuenciación de cDNA de *Brugia malayi*, detectó secuencias que parecían bacterianas, y que en un principio se consideraron contaminantes. Poco después, se comprobó que estaban relacionadas con las *Rickettsiales*, y más concretamente, que pertenecían a *Wolbachia*, que había sido indentificado como el endosimbionte de *Dirofilaria immitis* (15). Actualmente, esta bacteria se ha identificado en la gran mayoría de especies de nematodos filariales como *Brugia spp*, *Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus*, *Dirofilaria immitis* y *Mansonella perstans* (2,15).

La relación entre *Wolbachia* y las filarias es de mutualismo y, como en los artrópodos, se transmite por vía materna. Se tiene evidencia de que las filarias aportan a la bacteria aminoácidos necesarios para su crecimiento y, de la misma forma, *Wolbachia* presenta rutas metabólicas necesarias para la síntesis de nutrientes esenciales para el hospedador, como el grupo hemo, la riboflavina y el flavín adenín dinucleótido (FAD) (2,5). De hecho, cuando se eliminan estas bacterias de las filarias mediante tratamientos antibióticos, se puede observar que esto provoca retraso en el crecimiento, esterilidad y muerte de los gusanos adultos (5,16). Gracias a la secuenciación del genoma y transcriptoma de diversas filarias del género *Onchocerca*, se ha sugerido que esta bacteria también podría tener una función defensiva y antibacteriana y, además, es posible que lleve a cabo funciones similares a las de las mitocondrias, proporcionando energía y metabolitos (6).

Otro aspecto importante de la presencia de *Wolbachia* en los nematodos filariales es su estrecha relación con la patogénesis de las enfermedades que producen estos nematodos parásitos en el hombre y otros mamíferos, como la filariasis linfática y la oncocercosis, transmitidas por vectores como moscas y mosquitos (*Simulium*, *Chrysops*, *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, ...) (2,17).

La proporción de *Wolbachia* en las filarias varía durante sus diferentes estadios. En la forma larvaria L4, fase en la que la filaria penetra en el hombre e invade, tiene lugar la mayor concentración de *Wolbachia*, lo que se relaciona en las filariasis con la evasión del sistema inmunitario. Cuando se liberan las bacterias y sus productos, ya sea al matar los nematodos mediante tratamientos filaricidas o por procesos de secreción y excreción, se estimula la respuesta inmune innata y adaptativa. Esto se debe a la interacción de la bacteria con macrófagos, células dendríticas y neutrófilos a través del reconocimiento de los receptores Toll 2 y 6, respuesta que se ha atribuido a la proteína de superficie de *Wolbachia*. El aumento de la concentración de la bacteria en sangre se traduce en un aumento de reacciones adversas, TNF $\alpha$ , neutrófilos, citoquinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos, siendo esta respuesta la responsable del daño que se produce en los tejidos parasitados. Para evidenciar esto, se realizó un experimento *in vitro* exponiendo a células inmunitarias a extractos solubles de filarias que contienen *Wolbachia* de forma natural y a extractos de especies de filarias que no contienen *Wolbachia* (*Loa loa*) o de filarias que han sido tratadas con antibióticos para eliminar las bacterias. En el primero de los casos se producía un potente aumento de la respuesta proinflamatoria. Además, en modelos murinos de queratitis por oncocercosis, se demostró que la presencia de la bacteria era necesaria para el desarrollo de la inflamación mediada por neutrófilos y de la opacidad de la córnea (2,5,16).

#### **2.4 *Wolbachia* desde el punto de vista socioeconómico, sanitario y ambiental.**

Las enfermedades infecciosas transmitidas por vectores entre las que se encuentran, entre otras, las producidas por los virus como el dengue, zika, chikungunya, West Nile o la fiebre amarilla, parásitos como *Plasmodium*, las filarias, e incluso algunas bacterias, presentan gran incidencia a nivel mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo, y, por tanto, suponen un gran problema de salud pública en todo el mundo.

Las enfermedades producidas por filarias como la filariasis linfática y la oncocercosis afectan a cientos de millones de personas de más de 80 países. Aunque la mortalidad de estas enfermedades no es muy alta, son una causa de gran morbilidad y de discapacidad, ya que pueden producir ceguera o deformidades que dificultan la capacidad laboral de los afectados, lo que tiene una gran repercusión económica. Además, la OMS las clasifica como enfermedades desatendidas o NTDs (*neglected tropical diseases*). Esta situación se debe, principalmente, a que la inversión e interés por parte de las empresas farmacéuticas y los países desarrollados para la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos es escaso (17). En el caso del dengue, zika, chikungunya, malaria o la fiebre amarilla, entre otras, son enfermedades que también afectan mayoritariamente a países en vías de desarrollo, muchas de ellas con gran tasa de mortalidad y un gran porcentaje de la población expuesta (2).

Además, hay que tener en cuenta el posible impacto debido al cambio climático y la globalización, que ha hecho posible que vectores que no estaban presentes en determinadas zonas ahora lo estén, como es el caso del mosquito tigre (*Aedes albopictus*) en Europa, que es vector de virus como el del zika y el dengue (18). Todo esto implica una gran problemática y, por tanto, la necesidad de poder prevenir la transmisión de las enfermedades que portan controlando los vectores y disponiendo de tratamientos. Debido a que estas enfermedades afectan mayoritariamente a países donde los sistemas sanitarios son precarios y los tratamientos y vacunas son escasos, el estudio del papel de *Wolbachia* tanto en los vectores de transmisión como en los parásitos filariales, es clave en el desarrollo y la aplicación de nuevos métodos para el control y tratamiento de estas patologías.

### 3 OBJETIVOS

Los principales objetivos que se pretenden lograr en este trabajo son:

- Estudiar las relaciones entre *Wolbachia* y los seres vivos de interés (artrópodos y nematodos filariales).
- Explicar los diferentes métodos de control de vectores de transmisión de enfermedades basados en el uso de *Wolbachia*.
- Conocer las terapias anti-*Wolbachia* para el tratamiento de las filariasis, la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas relacionadas con esta bacteria y el desarrollo de nuevos fármacos.

### 4 MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica a partir de la búsqueda de diferentes artículos científicos a través de bases de datos como PubMed y Google Académico, además de la consulta de libros sobre microbiología.

### 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Control de vectores de enfermedades infecciosas

Durante los últimos años se han intentado controlar las poblaciones de mosquitos transmisores de enfermedades de diferentes maneras. El método más habitual para el control de estos insectos es el uso de insecticidas, además de otras medidas como la eliminación de los criaderos y las medidas de protección personal (repelentes, mosquiteras, uso de ropa adecuada, etc.). Pero la aparición de resistencias por parte de los mosquitos a los insecticidas y la toxicidad que estos pueden producir en otros organismos, unido a el aumento de la invasividad de algunas de estas especies de mosquitos, hacen que estas medidas sean insuficientes para controlar sus poblaciones e impedir la transmisión de enfermedades, por lo que son necesarios nuevos métodos para el control de estas plagas (11,19).

Aquí es donde *Wolbachia* juega un papel fundamental. Sus características especiales como la capacidad para manipular la reproducción de sus hospedadores, aumentar la resistencia de algunos de estos a determinados virus y parásitos productores de enfermedades y su presencia en un gran porcentaje de las especies de insectos, hacen de esta bacteria una herramienta muy interesante para el control de las poblaciones de mosquitos y para la prevención de las enfermedades que transmiten (6).

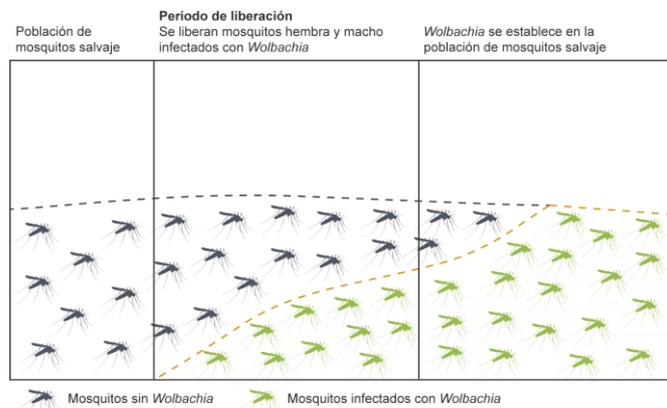
Se han estudiado y puesto en práctica varias técnicas basadas en el uso de *Wolbachia* como agente de control biológico, entre las que destacan la estrategia del Reemplazo Poblacional y la Técnica del Insecto Incompatible.

##### 5.1.1 Estrategia del Reemplazo Poblacional

La estrategia del Reemplazo Poblacional se ha centrado sobre todo en el control de poblaciones de mosquitos que son vectores del virus del dengue. El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de este virus, pero no porta *Wolbachia* de forma natural. A partir de diferentes investigaciones, se consiguió infectar esta especie con cepas de *Wolbachia* extraídas de otros insectos, como la cepa *wMel* de *D. melanogaster*. Con esta cepa se consiguió una infección estable del mosquito que redujo su esperanza de vida y, también, demostró importantes propiedades anti-dengue, siendo capaz de bloquear al virus y de inducir la incompatibilidad

citoplásmica, lo que facilita una rápida propagación de la infección. El objetivo de esta técnica, por tanto, es sustituir las poblaciones de mosquitos nativos por mosquitos con una determinada cepa de la bacteria que les confiere unas características interesantes para la prevención de las enfermedades que transmiten (**Figura 3**) (4,20).

En el año 2011 se realizó la primera prueba en Australia. Se liberaron mosquitos *A. aegypti* infectados con la cepa *wMel* de *Wolbachia* en ecosistemas naturales, con el objetivo de que la infección se propagase a toda la población. Se realizaron varias liberaciones de mosquitos, 10 en total, durante 9-10 semanas en 2 zonas (Yorkeys Knob y Gordonvale) cercanas a la ciudad de Cairns, en el noroeste australiano. Durante el tiempo que duró el estudio, se monitorizó la presencia de *Wolbachia* en los mosquitos, para lo



**Figura 3.** Representación de la estrategia de Reemplazo Poblacional. Basado en (21).

que se colocaron trampas de donde se obtenían las larvas que se analizaban mediante PCR para comprobar la presencia de *Wolbachia*. Semanas después de que las liberaciones cesaran, se observó que la presencia de *Wolbachia* en los mosquitos llegó a niveles cercanos al 90% en ambas localizaciones, lo que demostró que era posible modificar las poblaciones naturales de mosquitos y así reducir su capacidad de actuar como vectores de enfermedades (20). Dos años más tarde, en 2013, se recogieron datos en las mismas zonas y se observó que la infección de *Wolbachia* se mantenía en los mosquitos y se transmitía perfectamente a la descendencia. Los resultados que se obtuvieron, sugieren que una vez que la invasión con los nuevos mosquitos se realiza con éxito, esta infección se mantiene en el tiempo y, por lo tanto, este podría ser un método efectivo para controlar las poblaciones de estos vectores (22). Basándose en estos resultados, se están llevando a cabo proyectos a nivel mundial como el *World Mosquito Program* (antes llamado *Eliminate Dengue Program*), el cual aplica esta técnica en diferentes lugares del mundo donde el dengue es una enfermedad endémica, como Australia, Brasil, Colombia, México, Indonesia, India, Vietnam, etc. En algunos de estos países se realizaron liberaciones de prueba, gracias a las que se observó que esta cepa de mosquito con *Wolbachia* podía ser implementada en diferentes ambientes, obteniéndose datos que indicaban que la transmisión local de dengue disminuyó significativamente, no detectándose casos de la enfermedad hasta la fecha. Dado el éxito de esta iniciativa, se sugirió que *Wolbachia* podría ser capaz de bloquear también el virus del zika, ya que este virus está bastante relacionado con el del dengue y comparten vectores de transmisión, lo que se demostró en estudios de laboratorio. A partir de estos resultados, se han puesto en marcha proyectos piloto en Brasil, Colombia y Vietnam, que en los próximos años podrán dar más información sobre el impacto que tiene este proyecto en la transmisión de arbovirus (23).

Esta técnica también se ha propuesto para controlar poblaciones de mosquitos transmisores de la malaria pertenecientes al género *Anopheles*. Este género de mosquitos tampoco está infectado por *Wolbachia* en la naturaleza. Aunque se ha conseguido la transinfección de algunas especies en el laboratorio, se han encontrado problemas para conseguir infecciones con cepas que se puedan transmitir verticalmente y sean estables (4). En el mosquito *Anopheles stephensi*, se consiguió una infección estable con la cepa *wAlbB* de *Wolbachia*. Esta cepa es capaz de inducir la IC y demostró una alta tasa de transmisión vertical, además de conferir resistencia a *Plasmodium falciparum*. Esto hace que el uso de esta especie de mosquito pueda ser interesante

para llevar a cabo proyectos de reemplazo poblacional, similares a los del dengue. Pero el control de los vectores de la malaria es mucho más complejo, ya que se transmite por varias especies, y por ahora, esta técnica de reemplazo poblacional solo sería aplicable en zonas endémicas donde solo actúe *Anopheles stephensi* (4,14).

### 5.1.2 Técnica del Insecto Incompatible

La Técnica del Insecto Incompatible (TII) también se basa en el uso de *Wolbachia* para controlar plagas de mosquitos. Este método consiste en la liberación al medio ambiente de mosquitos macho infectados con una determinada cepa de la bacteria. Estos mosquitos al aparearse con las hembras salvajes inducen la incompatibilidad citoplasmática impidiendo que haya descendencia y disminuyendo la población de mosquitos (4) (**Figura 3**). Es muy similar a la Técnica del Insecto Estéril (TIE), que se basa en la cría de machos del insecto que se quiere controlar y la aplicación sobre estos de radiación con la finalidad de esterilizarlos. Estos machos estériles se liberan al medio y competirán con los machos salvajes para aparearse con las hembras pero no tendrán descendencia, por lo que el número de individuos de la población disminuirá (24).

Para la aplicación de esta técnica, hay que tener en cuenta que se han de cumplir una serie de condiciones. La cepa que se libere debe tener una alta tasa de IC para que no haya descendencia entre los machos liberados y las hembras silvestres, la competitividad de estos machos liberados tiene que ser igual o superior a la de los machos silvestres, y se debe tener certeza de que la aplicación de la técnica no conlleva daños en el ecosistema en el que se aplica. Hay que destacar la importancia de liberar solo machos, ya que si se liberasen también hembras se podría producir un reemplazo de la población y, además, estas son las responsables de picar a los humanos y transmitir las enfermedades; por tanto, los métodos de determinación del sexo de los insectos tienen que ser lo suficientemente eficaces (4).

En 2018, se aplicó esta técnica en la ciudad de Miami, donde los casos de zika habían aumentado en los últimos años y las medidas para el control de los vectores eran insuficientes. En esta zona, el principal vector de este virus es el mosquito *Aedes aegypti* que, como ya se ha mencionado en la técnica anterior, en la naturaleza no está infectado por *Wolbachia*. Mediante la infección artificial, se desarrolló una línea de mosquitos de esta especie (WB1), infectados con la cepa de *Wolbachia wAlbB*, proveniente de *Aedes albopictus*. Esta línea WB1 mostró altos niveles de herencia materna, los apareamientos entre los machos de WB1 y hembras salvajes de *A. aegypti* tenían un alto nivel de IC y la competitividad de estos machos no se vio reducida. Todo esto hizo que esta línea fuese adecuada para usarla con el objetivo de la supresión de *A. aegypti* mediante la TII. Para realizar el experimento se seleccionaron dos zonas de la ciudad con características similares, una sería la zona tratada y otra la no tratada, además la zona tratada a su vez se dividía en un área central y un área circundante. Se monitorizaron ambas zonas mediante la instalación de trampas. Las medidas que se realizaron incluían el número de huevos, el número de machos y hembras adultos, la proporción de eclosión de los huevos y el estado de la infección por *Wolbachia* en los mosquitos. Como resultado de este estudio de campo se observó que, a pesar de las limitaciones, se obtuvo una disminución considerable de la población de mosquitos, con un máximo de 78% de reducción al comparar el número de hembras de *A. aegypti* entre la zona central (tratada) y la zona no tratada, lo que se relaciona con una disminución del porcentaje de eclosión de huevos. También se detectó cierta influencia de la inmigración de mosquitos que sobre todo afectó al área circundante, en la que la reducción de la población de hembras fue menor que en el área central. Esta

disminución del número de hembras tuvo lugar durante todo el periodo en el que se liberaron los machos WB1, pero tras finalizar la liberación, el porcentaje de eclosión de huevos en la zona central volvió al mismo nivel que el de la zona no tratada (19).

En zonas como las islas, donde, debido a su aislamiento, el control de los mosquitos es más fácil ya que el efecto de la inmigración de estos es menor, también se han realizado estudios basados en la aplicación de esta técnica. En Tahití, un laboratorio ha conseguido erradicar casi por completo estos insectos en una pequeña isla. En este caso, el mosquito que se quería controlar es *Aedes polynesiensis*, que sí está infectado por *Wolbachia* de forma natural, por lo que es posible usar machos infectados por otra cepa de *Wolbachia* que sea capaz de inducir la IC. Debido al éxito que se ha observado en estos ensayos, se planea aplicarlo a más zonas del Pacífico (25).

En China, se ha llevado a cabo otro estudio basado en la combinación de la TII y la TIE. La TIE se ha usado con éxito para la eliminación de algunas plagas de insectos con importancia agrícola y veterinaria, pero no se ha llegado a aplicar en mosquitos debido a que la radiación que se emplea con el fin de esterilizar a los machos también disminuye su competitividad y capacidad de supervivencia. Lo que se propuso con la combinación de estas dos técnicas es aprovechar, por un lado, la infección con una cepa de *Wolbachia* capaz de inducir la IC, y por otro, usar la radiación a dosis bajas para esterilizar las posibles hembras que pueden “contaminar” la línea de mosquitos machos creada en laboratorio, con el objetivo de evitar el reemplazamiento poblacional. Para esto, se infectaron mosquitos *Aedes albopictus* (infectados con *wAlbA* y *wAlbB* de forma natural) con una cepa de *Wolbachia* proveniente de *Culex pipiens*, *wPip*, dando lugar a la línea HC. Esta línea demostró cumplir con los requisitos para poder ser usada en esta técnica. Los mosquitos macho se liberaron en dos islas fluviales de la ciudad de Guangzhou, la ciudad china con más proporción de transmisión de dengue. Estas liberaciones de mosquitos se llevaron a cabo durante dos años, llegando a eliminar casi por completo las poblaciones de estos. Además, se observó que la cepa *wPip*, junto con las cepas nativas de *Aedes albopictus*, reducen la transmisión de arbovirus, por lo tanto, si se produce accidentalmente un reemplazo de la población, podría llegar a ser beneficioso (26).

Recientemente, se ha desarrollado un nuevo método para la producción y distribución de machos de *Aedes aegypti* infectados con *Wolbachia*. Este método incluye la cría, separación por sexo y liberación, de una forma automatizada y que permite la aplicación de técnica a gran escala. A partir de esto, se aplicó la TII en tres zonas del condado de Fresno, California, durante 26 semanas. Este estudio ha mostrado buenos resultados en la supresión de las poblaciones de mosquitos, lo que demuestra que la eficiente producción de mosquitos machos infectados con *Wolbachia* permite un buen control de las poblaciones salvajes a mayor escala que trabajos previos. En las zonas de tratamiento se llegó a un máximo del 95% de supresión de las hembras, a su vez el número de larvas, huevos y el porcentaje de eclosión de huevos, disminuyeron considerablemente. Todos estos datos demuestran una fuerte supresión de las poblaciones de *Aedes aegypti* en dichas zonas. Se debe tener en cuenta, como ha sucedido en otros estudios, la

## Técnica del Insecto Incompatible



**Figura 3.** Esquema de la aplicación de la TII. Modificado de (25).

necesidad de volver a aplicar la TII cada temporada para poder mantener esta supresión. En otros estudios, problemas como la alta proporción de mosquitos hembra en las poblaciones liberadas, el bajo rendimiento en la producción de los mosquitos y la menor competitividad de estos, han limitado el éxito de las medidas aplicadas. En este caso, la clasificación sexual más precisa y la esterilización de las pupas femeninas con dosis bajas de radiación han permitido evitar estos problemas. La monitorización de las zonas tratadas durante los próximos años será clave para obtener información sobre la rapidez con la que resurgen las poblaciones de mosquitos y permitirá probar si liberaciones más pequeñas pueden sostener la supresión en estas zonas (27).

## 5.2 Control de otros artrópodos

El interés de *Wolbachia* en relación con los artrópodos se ha centrado principalmente en los mosquitos. Pero existen otros enfoques que sugieren que esta bacteria podría servir para controlar poblaciones de otros artrópodos. A su vez, se han descubierto algunas bacterias que podrían tener una utilidad similar a la de *Wolbachia*.

Se ha observado que en las chinches (*Cimex lectularius*) se encuentra presente el supergrupo F de *Wolbachia*. Se demostró que este endosimbionte tenía una relación mutualista nutricional con *Cimex lectularius*, lo que difiere del resto de los artrópodos en los que se había observado un parasitismo reproductivo. Se observó que la eliminación de *Wolbachia* producía retraso en el crecimiento y esterilidad en las chinches (15). Los efectos de la eliminación de *Wolbachia* podían ser contrarrestados con la suplementación de vitamina B (16), por lo tanto, se deduce que *Wolbachia* suministra esta vitamina a *Cimex lectularius* (4). Debido a esto, *Wolbachia* también se ha propuesto como un posible método de control de las chinches (6). Aunque estos insectos no son vectores de enfermedades, se han encontrado patógenos humanos en la superficie de su cuerpo y en sus heces, y pueden producir problemas como reacciones en la piel y anafilaxis, por lo que suponen un problema de salud pública. Pero todavía se necesitan más estudios sobre esta relación para poder aplicar técnicas de biocontrol basadas en *Wolbachia* (4).

Otro caso es el de las moscas tsetse (*Glossina spp*), los vectores de los protozoos (*Tripanosoma brucei*) que producen la tripanosomiasis humana africana. *Wolbachia* también se encuentra en estas moscas y se ha demostrado que puede inducir una fuerte IC en especies como *Glossina morsitans*. Este descubrimiento ha permitido proponer el uso de *Wolbachia* para el control de las poblaciones de estas moscas. Además, las moscas tsetse tienen otra bacteria simbiote (*Sodalis glossinidus*) que al ser cultivable hace posible la aplicación de la paratransgénesis, es decir, la modificación de esta bacteria con el fin de que produzcan sustancias que confieran resistencia a los tripanosomas o que sean nocivas para estos. Estas bacterias modificadas se podrían introducir en las poblaciones de *Glossina spp* gracias a la IC inducida por *Wolbachia*, con el objetivo de acabar con la transmisión de la tripanosomiasis (4).

En recientes estudios, se ha descubierto otro microorganismo que podría tener utilidad en los mosquitos del género *Anopheles*. Como ya hemos mencionado, estos mosquitos son los vectores de *Plasmodium spp*, el protozoo responsable de la malaria. En estas investigaciones se ha observado la presencia de un microsporidio (un tipo de hongo intracelular presente en animales) no patogénico (*Microsporidia MB*) en poblaciones silvestres de *Anopheles arabiensis* en Kenia. Estos microsporidios se pueden transmitir por vía materna y tienen un estilo de vida similar al de *Wolbachia*. En este caso, la infección con *Microsporidia MB* se ha relacionado con una menor transmisión de *Plasmodium*. Se ha observado que las hembras transmiten la infección con gran eficiencia y esta no interfiere en la aptitud de los mosquitos. Los mecanismos por los cuales se produce este efecto protector frente a *Plasmodium* todavía no están claros,

aunque podrían estar relacionados con el aumento de la expresión de genes vinculados a la digestión y la inmunidad. Todas estas características hacen que este microsporidio sea de interés para su uso como una herramienta de bloqueo de la transmisión de la malaria, siendo un posible candidato para estrategias de reemplazamiento poblacional (28).

### 5.3 *Wolbachia* como diana farmacológica en las filariasis

La estrecha relación de *Wolbachia* con la patogénesis de las filariasis, junto con la relación mutualista de *Wolbachia* y las filarias, sugiere que la eliminación de esta bacteria podría ser útil para conseguir eliminar estos parásitos.

Desde la OMS, se han realizado proyectos como el “Programa para la eliminación de las filariasis linfáticas”, cuyo objetivo era erradicar esta enfermedad para el año 2020, lo cual, todavía no se ha conseguido. En 53 países donde esta enfermedad es endémica se han llevado a cabo administraciones de fármacos en masa (MDA) con el fin de parar la transmisión. Estos programas de MDA han demostrado tener un mejor balance coste/efectividad que la detección y tratamiento de los individuos infectados. La interrupción de la transmisión que se quiere lograr con estos tratamientos solo se puede conseguir si se trata a toda la población en riesgo en un periodo suficientemente largo que asegure que las microfilarémias sean lo suficientemente bajas como para bloquear la transmisión (17).

En estos programas, el tratamiento convencional de la filariasis se basa en el uso de albendazol combinado con ivermectina o dietilcarbamazina para la filariasis linfática, y de ivermectina para la oncocercosis. Estos fármacos son microfilaricidas, es decir, afectan a las microfilarias pero no a los gusanos adultos (29). Las filarias adultas pueden permanecer en los humanos más de 10 años, pudiéndose aparear en el hospedador dando lugar a microfilarias, lo que permite la continuación de la transmisión. Por tanto, la falta de eficacia de estos tratamientos sobre los gusanos adultos, la necesidad de administración de varias dosis de estos fármacos durante largos periodos de tiempo (aproximadamente 17 años en la oncocercosis y 5 años en la LF), el riesgo de aparición de resistencias a la ivermectina, unido al hecho de que en los últimos 20 años no se han desarrollado nuevos fármacos con buenos perfiles de seguridad y eficacia para tratar estas enfermedades, hacen necesaria la búsqueda de nuevos fármacos con la capacidad de matar o esterilizar permanentemente a las filarias adultas (15,29).

En los últimos años, la investigación de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las filariasis se ha centrado en *Wolbachia* como un objetivo filaricida (16).

#### 5.3.1 Antibioticoterapia anti-*Wolbachia*

Eliminar *Wolbachia* de las filarias repercute en estas y en los humanos parasitados (2), como ya se ha explicado. En estudios preclínicos, el enfoque basado en el uso de antibióticos ha demostrado que causa toxicidad embrionaria, retraso en el desarrollo y la muerte de las filarias adultas, además de que tiene un importante potencial macrofilaricida y ayuda a la disminución de la carga microfilaria (29).

Las tetraciclinas muestran efectividad frente a las *Rickettsiales*, por tanto, también son efectivas contra *Wolbachia* (2). Esta es la principal clase de antibióticos que se usa frente a esta bacteria, y dentro de estas, principalmente la doxiciclina (16). La forma en que estos antibióticos afectan a *Wolbachia* no se conoció hasta que un estudio transcriptómico y proteómico demostró que había respuestas en todo el genoma de *Wolbachia* a la doxiciclina, causando el deterioro del metabolismo de la bacteria (29). En la **Figura 5** se detalla su diana y su mecanismo de acción. El primer ensayo clínico con doxiciclina en humanos se realizó en Ghana, con el objetivo de usar este antibiótico para tratar la oncocercosis. En este estudio se administraron 100 mg/día de

doxiciclina durante 6 semanas, observándose una eliminación del 90% de *Wolbachia*. Tras 4-6 meses, la embriogénesis se interrumpió y los pacientes a los que se les administró una dosis adicional de ivermectina (IVM) mostraron una amicrofilaremia sostenida, en comparación a los que no se les administró (5). Este ensayo probó que se produce la esterilización de las filarias a largo plazo, durante más de 1 año y medio tras el tratamiento (29). En este país se realizó otro estudio aleatorizado, de doble ciego y controlado con placebo. En este estudio se administró una dosis de 200 mg/día de doxiciclina durante 4 o 6 semanas, o una dosis de 100 mg/día durante 5 semanas. El tratamiento de 6 semanas mostró un efecto macrofilaricida de más del 60%, mientras que los tratamientos de 4 y 5 semanas mostraron un efecto del 50%. Además, se observó que las filarias hembras que estaban vivas y se extrajeron de los oncocercomas eran estériles. Se demostró que este efecto macrofilaricida y esterilizador se debía a la doxiciclina en un estudio paralelo en Camerún, en el que se administró doxiciclina en monoterapia sin dosis de IVM posteriores (5).

La doxiciclina también ha demostrado su utilidad frente a la filariasis linfática. En un ensayo clínico aleatorizado, se administró este antibiótico durante 3 semanas obteniendo una reducción significativa de la carga microfilarial e induciendo una amicrofilaremia más efectiva, si se compara con el albendazol o la ivermectina, por hasta dos años. Además, la gravedad de los linfedemas disminuyó con este tratamiento, por lo que se puede deducir la utilidad de la doxiciclina para mejorar los síntomas clínicos. Otros estudios han comparado la doxiciclina con la amoxicilina en pacientes con y sin infección activa de LF, obteniéndose una menor progresión de la enfermedad con la doxiciclina. Hay que tener en cuenta que el tratamiento de la LF es mucho más corto que para la oncocercosis, posiblemente debido a que en la primera las filarias se encuentran en los ganglios linfáticos y en la segunda en la piel, donde la biodisponibilidad de los antibióticos es menor. La mejora observada en la LF, incluso para pacientes sin infección activa, y el hecho de que la eficacia de otros microfilaricidas como el albendazol y la IVM no está determinada para LF, hace que el tratamiento con doxiciclina deba ser considerado para este tipo de filariasis (29).

Fármaco	Diana	Mecanismo de acción	Contraindicaciones	Estado actual
Doxiciclina	Subunidad ribosomal 30S	Bloqueo de la síntesis de proteínas por el bloqueo de la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma	Embarazo y niños menores de 9 años	Estudios clínicos en humanos
Rifampicina	RNA polimerasa	Inhibición de la RNA polimerasa	Desconocidas	Estudios clínicos en humanos
Moxifloxacino	DNA girasa	Inhibición de la DNA girasa y de la replicación celular	Embarazo y niños	Estudios clínicos en humanos
Coralopironina A	RNA polimerasa	Bloqueo de la síntesis de RNA	Desconocida	Estudios preclínicos
Rapamicina	bTOR	Inhibición de bTOR, el cual controla la autofagia	Embarazo	Estudios preclínicos
Globomicina	LspA	Acumulación de pro-lipoproteínas en la membrana citoplasmática	Desconocida	Estudios preclínicos
Berberina	FstZ	Bloqueo de la citocinesis bacteriana	Desconocida	Estudios preclínicos
Succinil acetona	ALAD	Bloqueo de la ruta de síntesis del grupo hemo	Desconocida	Estudios preclínicos

**Figura 4.** Resumen de los compuestos en estudio para la terapia anti-*Wolbachia*. Basado en (29).

bTor: diana de la rapamicina en *Brugia malayi*; LspA: peptidasa señal de lipoproteína; FstZ: *filamenting temperature-sensitive protein Z*. ALAD: ácido aminolevulinico deshidratasa.

Estos tratamientos han sido bien aceptados en las comunidades afectadas y los costes han sido relativamente económicos. Tampoco se han observado resistencias a la doxiciclina en la filariasis, siendo mucho menor el riesgo de resistencias en este antibiótico en comparación con otros como las penicilinas y fluoroquinolonas. A pesar de esto, hay varios inconvenientes que dificultan su implementación en los programas de MDA (29). La principal contraindicación de este antibiótico está en su uso en mujeres embarazadas o en periodo de lactancia y en niños

menores de 9 años (16). La doxiciclina, en el feto y los niños, tiene el potencial de unirse al calcio en los huesos y dientes en desarrollo, lo que puede dar lugar a depósitos en los huesos y manchas e hipoplasia dental (29).

Debido a los inconvenientes y contraindicaciones en la implementación del tratamiento con doxiciclina, se ha estudiado la efectividad de otros antibióticos frente a las filarías. En estudios *in vitro* con azitromicina, se observó que se inhibía parcialmente la muda de la filaria *Brugia malayi*. En posteriores ensayos en humanos, no se observó efectividad por parte de este antibiótico. Por otro lado, la rifampicina, un antibiótico de amplio espectro que es seguro para niños y embarazadas, ha demostrado resultados positivos en estudios en humanos. Además, en combinación con albendazol ha mostrado un efecto sinérgico que permite el acortamiento del tratamiento. Aunque el uso de este antibiótico puede estar limitado por la posibilidad de aparición de resistencias cruzadas con *Mycobacterium spp* (29). Aun así, es un tratamiento que podría ser interesante en los casos en los que no se puede usar doxiciclina (16), pero se necesitan más estudios que prueben su seguridad, eficacia e idoneidad para usarlo en programas de MDA (29).

Otros nuevos compuestos, como la minociclina y la coralopironina A, han mostrado resultados prometedores. La minociclina es una tetraciclina semisintética de amplio espectro, en ensayos *in vitro* se ha observado que es mucho más potente que la doxiciclina y rifampicina, y en ensayos en modelos murinos y en humanos ha mostrado una mayor depleción de *Wolbachia* y mayor porcentaje de esterilización que la doxiciclina. Aun así, es un antibiótico que también está contraindicado en embarazadas y niños, y del que aún se necesitan más estudios para validar su eficacia. Por otro lado, la coralopironina A es un compuesto obtenido de la myxobacteria *Coralococcus coralloides*. Se ha demostrado la eficacia de este compuesto *in vivo* e *in vitro*, pero son necesarios más estudios para determinar la eficacia en el tratamiento de pacientes con filarías (29). Estos y otros antimicrobianos (**Figura 5**), están en estudio actualmente.

### 5.3.2 Búsqueda de nuevas dianas y fármacos anti-*Wolbachia*

Los análisis comparativos genómicos, transcriptómicos y proteómicos, han permitido conocer mejor las bases moleculares y metabólicas del mutualismo entre *Wolbachia* y las filarías, lo que ha hecho posible el descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas (16), como algunos de los antibióticos mencionados en el apartado anterior. El único genoma completo de *Wolbachia* proveniente de una filaria del que disponemos es el de *Wolbachia* endosimbionte de *Brugia malayi*. Aunque también se han publicado en las bases de datos algunos fragmentos del genoma de filarías que contienen *Wolbachia* y de otras que no contienen a la bacteria (*Loa loa*). Esta información nos permite realizar estudios comparativos entre diferentes especies de filarías, y entre estas y las bacterias endosimbiontes (15).

Se observó que en el genoma de *Wolbachia* endosimbionte de *B. malayi* había mucha menos densidad de genes funcionales que en otras bacterias y una pérdida considerable de rutas metabólicas. En comparación, por ejemplo, *B. malayi* carece de los genes necesarios para la síntesis de FAD y riboflavina, mientras que *Wolbachia* sí es capaz de llevar a cabo esa ruta. Esto ocurre con otras rutas metabólicas, estando incompletas en uno de los organismos, ya sea en la bacteria o en la filaria, lo que podría explicar la relación mutualista (15).

La necesidad de encontrar nuevos compuestos que sean activos contra *Wolbachia* para tratar las filarías y que se puedan aplicar en programas de MDA, ha llevado al desarrollo de proyectos como el *A-WOL Consortium* (5). En este proyecto se han realizado rastreos, mediante ensayos basados en células, ensayos *in vitro* con nematodos e *in vivo* con modelos filariales, de compuestos químicos, pequeñas moléculas, combinaciones de fármacos aprobados por la FDA,

librerías de antimicrobianos y de compuestos de origen natural y sintético, etc. El principal objetivo es establecer tratamientos para la filariasis que estén dirigidos contra *Wolbachia*, con la finalidad de que se puedan aplicar en programas de MDA, además de optimizar la terapia individual y la administración basada en la comunidad para un uso más restrictivo (15). Gracias a esto se han identificado varios compuestos que podrían ser prometedores.

Una de las rutas de biosíntesis que parecen ser interesantes en esta simbiosis entre *Wolbachia* y las filarias, es la de la síntesis del grupo hemo. El grupo hemo es un cofactor esencial para una gran variedad de proteínas como los citocromos, las hemoglobinas, las peroxidasas y las catalasas. Todas estas proteínas intervienen en diferentes procesos biológicos que son fundamentales, como el metabolismo oxidativo y el transporte electrónico. En el genoma de *Wolbachia* están presentes los genes para la biosíntesis del grupo hemo, excepto el gen que codifica la protoporfirinógeno IX oxidasa, como ocurre en otras bacterias Gram negativas. Por otro lado, las filarias, como *Brugia malayi*, no disponen de esta ruta por lo que el grupo hemo lo tienen que obtener de *Wolbachia* o del medio. Se ha observado que, si se elimina *Wolbachia*, se ven afectados varios procesos del nematodo, lo que podría deberse a la ausencia de grupo hemo. Esto sugirió el uso de inhibidores de la síntesis del grupo hemo como la succinil acetona (**Figura 5**) y la N-metil-mesoporfirina, cuyas dianas farmacológicas son dos enzimas que intervienen en la síntesis del grupo hemo, el ácido aminolevulinico deshidratasa (ALAD) y la ferroquetalasa (FC), respectivamente. Como resultado del tratamiento con estos fármacos se observó la reducción de la movilidad de las filarias adultas y las microfilarias. Se ha observado que estas enzimas tienen diferencias significativas con sus análogos humanos, y además, sus características bioquímicas y su sensibilidad por los inhibidores hacen de esta ruta una interesante diana farmacológica (15,30).

Este tipo de análisis comparativos también se han llevado a cabo para identificar diferencias entre los procesos presentes en humanos y los presentes en *Wolbachia*, con el objetivo de descubrir nuevas dianas farmacológicas, como es el caso de la glicólisis. En humanos, el último paso de esta ruta lo lleva a cabo la piruvato quinasa, mientras que en *Wolbachia* lo realiza la piruvato fosfato diquinasa (PPDK), una enzima que no está presente en los mamíferos. Por esta razón también se ha tenido en cuenta esta enzima en los rastreos del A-WOL (30).

A partir de las librerías de compuestos antiinfecciosos, se ha identificado un macrólido con actividad contra *Wolbachia*, la tilosina A. Es el único macrólido con esta actividad y que ha demostrado su efectividad en ensayos *in vitro* y en modelos murinos de filariasis. Debido a su baja biodisponibilidad por vía oral, se modificó la estructura química obteniendo compuestos análogos que mostraron una mayor biodisponibilidad y potencia frente a *Wolbachia*. Dicha molécula, a la que se ha denominado A-1574083, ha mostrado un prometedor perfil de seguridad preclínico y un periodo de tratamiento mucho más corto comparado con las tetraciclinas. Aún se necesitan más datos para conocer adecuadamente la relación entre las dosis y la duración del tratamiento, lo que es fundamental para aplicar este tratamiento en programas de MDA (31).

Existen líneas de investigación que se han centrado en la búsqueda de alternativas para la prevención de las filariasis, como son las vacunas. En un estudio se observó que ratones inmunizados con una única proteína de *Wolbachia* mostraban una fuerte resistencia, aunque no completa, a la infección por filarias (6). La búsqueda de vacunas anti-filariales podría ser un campo de estudio de gran interés para la lucha contra estas enfermedades.

## 6 CONCLUSIONES

El avance en el conocimiento de la biología de *Wolbachia* ha supuesto la apertura de un interesante campo de estudio que, en un futuro próximo, podría tener un gran impacto en la salud de millones de personas. *Wolbachia* ha demostrado que puede ser una herramienta útil en la eliminación y prevención de enfermedades producidas por artrópodos y filarias. En el caso de artrópodos, por su capacidad para modificar poblaciones de vectores transmisores de enfermedades víricas y parasitarias y, en el de las filarias, a través del uso de antibióticos para la eliminación de *Wolbachia* que, debido a su mutualismo, induce la muerte de estos parásitos.

A pesar de los buenos resultados, aún se necesita:

1. Una mayor comprensión de los procesos moleculares que están implicados en
  - a. el proceso de incompatibilidad citoplasmática en artrópodos,
  - b. la relación de simbiosis entre *Wolbachia* y las filarias,con el objetivo de mejorar y ampliar las aplicaciones de *Wolbachia* y entender su relación con los organismos a los que infecta.
2. Llevar a cabo más estudios que permitan conocer mejor las técnicas de control de vectores y su impacto, así como su aplicación en otros artrópodos, frente a otros patógenos (virus, protozoos) y el uso de diferentes cepas de *Wolbachia*.
3. Encontrar nuevos fármacos con actividad frente a *Wolbachia* que sean seguros, efectivos, baratos, se puedan administrar de una forma sencilla y permitan la reducción de la incidencia de las filariasis.

Para cumplir estos objetivos es fundamental aumentar el interés y la financiación de la investigación de estas enfermedades que, principalmente, afectan a países desfavorecidos.

## **7 BIBLIOGRAFÍA**

1. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Brock. Biología de los microorganismos. 14.<sup>a</sup> ed. Madrid: Pearson Educación; 2015. 515-516 p.
2. March-Rosselló GA, Eiros-Bouza JM. Cómo combatir con bacterias a las enfermedades infecciosas parasitarias. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2014;52(6):654-659. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457745499010>
3. Willey J, Sherwood LM, Woolverton CJ. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7.<sup>a</sup> ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2009. 720-721 p.
4. Rodríguez MS. Wolbachia, una pandemia con posibilidades. Rev la Soc Entomol Arg. 2013;72(3-4):117-137.
5. Tamarozzi F, Halliday A, Gentil K, Hoerauf A, Pearlman E, Taylor MJ. Onchocerciasis: The role of Wolbachia bacterial endosymbionts in parasite biology, disease pathogenesis, and treatment. Clin Microbiol Rev. 2011;24(3):459-468.
6. LePage D, Bordenstein SR. Wolbachia: Can we save lives with a great pandemic? Trends Parasitol. 2013;29(8):385-393.
7. Sicard M, Bonneau M, Weill M. Wolbachia prevalence, diversity, and ability to induce cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. Curr Opin Insect Sci. 2019;34:12-20.
8. Bonneau M, Landmann F, Labbé P, Justy F, Weill M, Sicard M. The cellular phenotype of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* in the light of *cidB* diversity. PLoS Pathog. 2018;14(10):1-25.
9. Beckmann JF, Ronau JA, Hochstrasser M. A Wolbachia deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. Nat Microbiol. 2017;2(March):1-7.
10. Werren JH, Baldo L, Clark ME. Wolbachia: Master manipulators of invertebrate biology. Nat Rev Microbiol. 2008;6(10):741-751.
11. Kenton RS-. Papel de la bacteria endosimbionte Wolbachia en el control de enfermedades vectoriales: dengue, zika y chikungunya. Acta Med Costarric. 2017;59(4):130-133.
12. Thomas S, Verma J, Woolfit M, O'Neill SL. Wolbachia-mediated virus blocking in mosquito cells is dependent on XRN1-mediated viral RNA degradation and influenced by viral replication rate. PLoS Pathog. 2018;14(3):1-21.
13. Pillai RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? RNA. 1 de diciembre de 2005;11(12):1753-1761.
14. Bian G, Joshi D, Dong Y, Lu P, Zhou G, Pan X, et al. Wolbachia invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to Plasmodium infection. Science. 2013;340(6133):748-751.
15. Slatko BE, Taylor MJ, Foster JM. The Wolbachia endosymbiont as an anti-filarial nematode target. Symbiosis. 2010;51(1):55-65.
16. Bouchery T, Lefoulon E, Karadjian G, Nieguitsila A, Martin C. The symbiotic role of Wolbachia in Onchocercidae and its impact on filariasis. Clin Microbiol Infect. 2012;19(2):131-140. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12069>
17. Díaz-Menéndez M, Norman F, Monge-Maillo B, Antonio Pérez-Molina J, López-Vélez R. Las filarías en la práctica clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(5):27-37.

18. Semenza JC, Suk JE. Vector-borne diseases and climate change: A European perspective. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(2):1-9.
19. Mains JW, Kelly PH, Dobson KL, Petrie WD, Dobson SL. Localized Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Miami, FL, via Inundative Releases of Wolbachia-Infected Male Mosquitoes. *J Med Entomol.* 2019;56(5):1296-1303.
20. Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, et al. Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature.* 2011;476(7361):454-459. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10356>
21. Flores HA, O'Neill SL. Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(8):508-518.
22. Hoffmann AA, Iturbe-Ormaetxe I, Callahan AG, Phillips BL, Billington K, Axford JK, et al. Stability of the wMel Wolbachia Infection following Invasion into *Aedes aegypti* Populations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(9):1-9.
23. O'Neill SL. The Use of Wolbachia by the World Mosquito Program to Interrupt Transmission of *Aedes aegypti* Transmitted Viruses. En: Hilgenfeld R, Vasudevan SG, editores. *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies.* 1.<sup>a</sup> ed. Springer Singapore; 2018. p. 355-360. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1062). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8727-1>
24. Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA). Técnica de los insectos estériles. [citado 14 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.iaea.org/es/temas/tecnica-de-los-insectos-esteriles>
25. Marris E. Bacteria could be key to freeing South Pacific of mosquitoes. *Nature* [Internet]. 2017;548(7665):17-18. Disponible en: <https://www.nature.com/news/bacteria-could-be-key-to-freeing-south-pacific-of-mosquitoes-1.22392>
26. Zheng X, Zhang D, Li Y, Yang C, Wu Y, Liang X, et al. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature.* 2019;572(7767):56-61.
27. Crawford JE, Clarke DW, Criswell V, Desnoyer M, Cornel D, Deegan B, et al. Efficient production of male Wolbachia-infected *Aedes aegypti* mosquitoes enables large-scale suppression of wild populations. *Nat Biotechnol.* 2020;38(April):22-25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-0471-x>
28. Herren JK, Mbaisi L, Mararo E, Makhulu EE, Mobegi VA, Butungi H, et al. A microsporidian impairs *Plasmodium falciparum* transmission in *Anopheles arabiensis* mosquitoes. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16121-y>
29. Sulaiman WAW, Kamtchum-Tatuene J, Mohamed MH, Ramachandran V, Ching SM, Lim SMS, et al. Anti-Wolbachia therapy for onchocerciasis & lymphatic filariasis: Current perspectives. *Indian J Med Res.* 2019;149(6):706-714. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31496523/>
30. Taylor MJ, Hoerauf A, Townson S, Slatko BE, Ward SA. Anti-Wolbachia drug discovery and development: Safe macrofilaricides for onchocerciasis and lymphatic filariasis. *Parasitology.* 2014;141(1):119-127.
31. Taylor MJ, Von Geldern TW, Ford L, Hübner MP, Marsh K, Johnston KL, et al. Preclinical development of an oral anti-Wolbachia macrolide drug for the treatment of lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Sci Transl Med.* 2019;11(483):1-11.