

Establecimiento de una línea celular de *Aedes albopictus* infectada con *Wolbachia* spp.

Establishment of an *Aedes albopictus* cell line infected with *Wolbachia* spp.

Luis Francisco Morier Díaz^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9502-347X>

Gladys Gutiérrez-Bugallo² <https://orcid.org/0000-0003-4415-7045>

Dianeya Mendoza Llanes² <https://orcid.org/0000-0003-1343-4062>

María Magdalena Rodríguez Coto^{†2} <https://orcid.org/0000-0001-7312-0853>

Juan Andrés Bisset Lazcano² <https://orcid.org/0000-0002-3447-4947>

¹Universidad de La Habana, Facultad de Biología. La Habana, Cuba.

²Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: lmorier@infomed.sld.cu

RESUMEN

Wolbachia es un género de bacterias intracelulares obligatorias que infectan más de la mitad de las especies de insectos conocidas. En mosquitos, esta rickettsia induce incompatibilidad citoplasmática entre el ovocito no infectado y el espermatozoide infectado, provocando la inviabilidad de la descendencia. Además, se ha comprobado que determinadas cepas de *Wolbachia* transinfectadas en algunas especies de mosquitos son capaces de bloquear la transmisión de patógenos por estos. Los efectos generados por *Wolbachia* en sus hospederos pueden ser usados en el control de vectores y los patógenos que transmiten, de ahí la importancia de su estudio. Sin embargo, la imposibilidad de su cultivo libre demanda el uso de cultivos celulares infectados con la rickettsia

como fuente del microorganismo. En el presente artículo se describe la obtención de una línea celular de *Aedes albopictus* infectada con *Wolbachia* como herramienta que permita el desarrollo de investigaciones básicas y aplicadas para el control vectorial.

Palabras clave: mosquito; cultivo de células; bacteria; rickettsia; culicidos.

ABSTRACT

Wolbachia is an obligatory intracellular bacterial gender which infects more than a half of known insects. In mosquitoes, that rickettsia induces cytoplasmic incompatibility between non infected oocyte and infected spermatozoon provoking non-viable offspring. Also, it has been proven that determined strains of transinfected *Wolbachia* are able to block, in some mosquitoes species, their capacity of pathogen transmissions. The effect provoked by this *Wolbachia* gender in their hosts can be used in vector control and pathogens, that's way the importance of this study. However, the impossibility of its free culture, demand cell infected cultures with rickettsia as microorganism source. This article describes a cell line from *Aedes albopictus* infected with *Wolbachia* and its use as a tool which allows the development of basic and applied researches in vector control

Keywords: mosquito, cell culture, bacterium, rickettsia, culicids

Recibido: 02/08/2022

Aceptado: 04/11/2022

Introducción

El género *Wolbachia* reúne un grupo de bacterias intracelulares, transmitidas maternalmente y que pertenecen al orden Rickettsiales.⁽¹⁾ Este género se

encuentra ampliamente distribuido en artrópodos y se estima que más del 65 % de las especies de insectos son hospederas de *Wolbachia*, lo que lo convierte en uno de los géneros de bacterias intracelulares más abundantes.⁽²⁾ El género *Wolbachia* está dividido en 17 diferentes supergrupos (A-Q), basado en la secuencia del ADN ribosomal 16S y de otras regiones del genoma, de los cuales el A y el B son los más comunes en mosquitos.⁽³⁾ Al contrario de otras rickettsias, las especies de este género solo infectan a sus hospederos invertebrados y habitualmente no son transmitidas a vertebrados.⁽¹⁾

Desde finales del siglo XX, este género ha atraído considerable interés no solo por su distribución “pandémica”, sino por los interesantes efectos que provoca en sus hospederos.⁽⁴⁾ El conjunto de estos efectos es conocido como parasitismo reproductivo y constituye una estrategia adaptativa de la rickettsia que favorece la generación de hembras infectadas.⁽¹⁾ La más estudiada de estas manipulaciones reproductivas es la incompatibilidad ovocito-espermatozoide, la cual es conocida como incompatibilidad citoplasmática (IC). Producto de este fenómeno, los machos infectados con una cepa de *Wolbachia* diferente al de la hembra no dejan descendencia viable.⁽⁵⁾ Este fenotipo reproductivo resulta prometedor, con aplicaciones potenciales en el control de poblaciones de vectores y plagas.⁽⁶⁾ Adicionalmente, se ha comprobado que determinadas cepas de esta bacteria son capaces de limitar la transmisión de arbovirus en mosquitos *Aedes aegypti* cuando estos son transinfectados con la rickettsia.⁽⁷⁾ Esta propiedad “antiviral” le confiere mayor valor al uso de *Wolbachia* en estrategias de control de patógenos transmitidas por vectores.⁽⁸⁾

El mosquito *Aedes albopictus* es una especie invasiva de creciente interés epidemiológico debido a su capacidad para transmitir los virus del dengue, chikungunya y Zika, entre otros.⁽⁸⁾ En Cuba y otras partes del mundo, esta especie de culícido se ha encontrado naturalmente infectada con dos cepas de *Wolbachia* (*wAlbA* y *wAlbB*),^(9,10) las cuales han demostrado sus potencialidades en el control de los patógenos transmitidos por mosquitos.^(11,12)

Uno de los mayores impedimentos en el trabajo con *Wolbachia* ha sido la imposibilidad de cultivarlas, dada su condición de bacterias intracelulares obligatorias. Por eso resulta imprescindible contar con un sistema que sea fuente del microorganismo y que permita el desarrollo de investigaciones básicas y aplicadas en este campo.⁽¹³⁾

El objetivo de este trabajo fue establecer un cultivo celular de *Aedes albopictus* infectado con *Wolbachia* que pudiera utilizarse como fuente del microorganismo.

Preparación del cultivo primario de *Aedes albopictus* y establecimiento de la línea

Mosquitos *Ae. albopictus* infectados naturalmente con rickettsias del género *Wolbachia* fueron criados bajo condiciones controladas (28 °C, 12 h: 12 h ciclo luz-oscuridad, 80 % de humedad relativa). Los huevos depositados en tiras de papel fueron colectados y transferidos cuidadosamente (aproximadamente 1000) a un tubo de centrífuga de 15 mL. Con el objetivo de esterilizar su superficie, los huevos fueron lavados por inmersión con una solución de hipoclorito de sodio (1,6 %) y posteriormente con etanol (70 %). Seguidamente, se realizaron tres lavados con solución salina tamponada (PBS 1X, por sus siglas en inglés) suplementada con penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL).

Inmediatamente, los huevos lavados se transfirieron a un homogenizador de vidrio Tenbroeck de 2 mL donde se procesaron en 0,5 mL de medio de crecimiento que consistió en medio de cultivo MM/VP12, suplementado con suero fetal bovino (SFB) (15 %) inactivado por calor y con penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL).⁽¹⁴⁾ La suspensión resultante se mezcló con 5 mL del medio de crecimiento antes descrito, se colocó en un frasco de 25 cm² y se incubó a 28 °C en atmósfera de CO₂ (5 %).

Pasadas 24 h, se observó el frasco al microscopio invertido Olympus CK con aumento 40X para detectar la presencia de fragmentos de huevos y se cambió el medio cuidadosamente por medio de crecimiento fresco. Se incubó nuevamente

bajo las mismas condiciones y se observó diariamente hasta los 30 días. A partir de este momento, se comenzaron a hacer cambios de medio (medio fresco) cada 4 o 5 días. Tres semanas después, se observó la morfología celular utilizando el microscopio invertido.

Los subcultivos se realizaron con razón de pase 1:2, de forma mecánica, por medio de un "policia de goma" (*Rubber policeman*). Aunque en el primer pase se empleó el mismo medio de crecimiento, en el segundo se varió a MM/VP12 a partes iguales con medio Leibovitz (L-15) suplementado con 10 % de caldo triptosa fosfato (CTF) (2,9 %) con el objetivo de adaptar la línea a este medio que no necesita atmósfera de CO₂.⁽¹⁵⁾

El tercer pase se realizó a los 8 días con un cambio de medio a las 96 horas para estimular el crecimiento. En este pase, se sustituyó la mezcla de medios empleada anteriormente por medio L-15 suplementado con CTF (10 %) y SFB (15 %).

A partir del cuarto pase, se mantuvieron estables las condiciones descritas en cuanto a la forma de subcultivar, temperatura y medio de crecimiento. Solo varió la razón de pase a 1:3 y el SFB que se rebajó del 15 % al 10 %.

De la línea estabilizada, se criopreservaron en nitrógeno líquido lotes de células en suspensión a razón de 4 x 10⁶ cél./mL en los subcultivos 7; 9 y 11.

Detección de *Wolbachia* spp. en la línea celular Walb

Extracción de ADN

La extracción del material genético del cultivo celular se realizó empleando el estuche comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue conservado a 4 °C hasta su utilización.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de *Wolbachia* spp.

Los cebadores 81F y 691R⁽¹⁶⁾ que amplifican un fragmento del gen que codifica para la proteína de superficie de *Wolbachia* (*wsp*, por sus siglas en inglés) fueron usados para detectar la presencia de la rickettsia, mediante PCR a punto final según describe Ruiz y otros.⁽¹⁰⁾ Como control positivo se empleó ADN extraído de un mosquito adulto *Ae. albopictus* infectado con *Wolbachia* y como control negativo ADN extraído de un mosquito adulto *Ae. aegypti*. Se empleó una electroforesis horizontal en gel de agarosa para verificar la presencia y talla de los amplicones resultantes de la PCR.

La detección de *Wolbachia* fue realizada en los subcultivos del 7 al 11, partiendo del material celular completo contenido en frascos de cultivo de 5 mL.

La obtención del cultivo primario de *Ae. albopictus* y posteriormente de la línea celular Walb constituyó el primer paso para el cultivo de *Wolbachia* spp. A las primeras 24 h de iniciados los procedimientos, se observaron fragmentos de huevos adheridos a la superficie del frasco de cultivo. Al cabo de cuatro semanas se visualizaron las primeras células alargadas que migraban de los explantos o fragmentos de huevos formando colonias. Tres semanas después se verificó una monocapa semiconfluente de células adherentes con morfología heterogénea, predominantemente fibroblástica. La monocapa se completó luego de aproximadamente ocho semanas de iniciar el cultivo. Esta mantuvo la morfología celular predominantemente fibroblástica, el medio de crecimiento L-15 suplementado con CTF (10 %) y SFB (10 %) y razón de pase 1:3, debido a una estable velocidad de crecimiento a una temperatura de 28 °C. La línea celular se consideró establecida a partir del cuarto pase, denominándose Walb.

Las PCR realizadas demostraron la presencia de *Wolbachia* spp. en los subcultivos 7; 8 y 9. Sin embargo, en el décimo subcultivo ya no se detectó la rickettsia en las células cultivadas.

Los factores responsables de la variabilidad de los niveles de infección entre las poblaciones celulares, así como entre células de una misma población permanecen desconocidos.⁽¹³⁾ Otros autores han detectado la infección con

Wolbachia en más de 32 pases;⁽¹⁷⁾ sin embargo, en nuestro caso la infección solo fue detectada hasta el noveno pase. Al comparar nuestra línea con otras reportadas, esta difiere en el medio de crecimiento, el cual está suplementado con compuestos químicamente no definidos como el CTF y el SFB, los cuales pueden comprometer la incorporación de isotopos y el uso de inhibidores metabólicos.^(13,17) También se plantea que el método de pase impacta en el nivel de infección resultando en algunos casos hasta la pérdida total del microorganismo.⁽¹⁸⁾ Se deben realizar otros estudios para identificar la posible causa de la pérdida de *Wolbachia* en la línea celular y posibles métodos para mantenerla persistentemente en el cultivo.

En resumen, la presente línea celular infectada con *Wolbachia* spp. desde el subcultivo 7, que fue el primer banco celular criopreservado, y hasta el 9, representa una fuente segura y confiable de esta bacteria y provee una importante herramienta para las investigaciones que impliquen las interacciones hospedero-microorganismo.

Referencias bibliográficas

1. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nat Rev Microbiol. 2008;6(10):741-51. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
2. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. How many species are infected with *Wolbachia*? -A statistical analysis of current data. FEMS Microbiol Lett. 2008;281(2):215-20. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x>
3. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.02.005>

4. Landmann F. The Wolbachia endosymbionts. *Microbiol Spectr*. 2019;7(2). DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0018-2019>
5. Werren JH. Biology of Wolbachia. *Annu Rev Entomol*. 1997;42:587-609. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.587>
6. Bourtzis K. Wolbachia-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol*. 2008;627:104-13. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-78225-6_9
7. Dutra HLC, Rocha MN, Dias FBS, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. Wolbachia blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016;19:771-4.
8. Yen PS, Failloux AB. A Review: Wolbachia-based population replacement for mosquito control shares common points with genetically modified control approaches. *Pathogens*. 2020;22;9(5):404. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9050404>
9. Inacio da Silva LM, Dezordi FZ, Paiva MHS, Wallau GL. Systematic review of Wolbachia symbiont detection in mosquitoes: an entangled topic about methodological power and true symbiosis. *Pathogens*. 2021;10(1). DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10010039>
10. Ruiz AM, Gutiérrez-Bugallo G, Rodríguez-Roche R, Pérez L, González-Broche R, Piedra LA, *et al*. First report of natural Wolbachia infections in Cuban mosquitoes. *Acta Trop*. 2023 Jun;242:106891. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106891>.
11. Chouin-Carneiro T, Ant TH, Herd C, Louis F, Failloux AB, Sinkins SP. *Wolbachia* strain wAlbA blocks Zika virus transmission in *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol*. 2020;34(1):116-9. DOI: <https://doi.org/10.1111/mve.12384>
12. Ekwudu O, Devine GJ, Aaskov JG, Frentiu FD. *Wolbachia* strain wAlbB blocks replication of flaviviruses and alphaviruses in mosquito cell culture. *Parasit Vectors*. 2020;10;13(1):54. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3936-3>

13. O'Neill SL, Pettigrew MM, Sinkins SP, Braig HR, Andreadis TG, Tesh RB. In vitro cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol.* 1997;6(1):33-9. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1997.00157.x>
14. Varma MG, Pudney M. The growth and serial passage of cell lines from *Aedes aegypti* (L.) larvae in different media. *J Med Entomol.* 1969;6(4):432-9. DOI: <https://doi.org/10.1093/jmedent/6.4.432>
15. Sudeep AB, Parashar D, Jadi RS, Basu A, Mokaski CH, Arankalle VA, *et al.* Establishment and characterization of a new *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Lulicidae) cell line with special emphasis on virus susceptibility. 2009;45:491-5.
16. Zhou W, Rousset F, O'Neil S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc Biol Sci.* 1998;22;265(1395):509-15. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0324>
17. Fallon AM. Cytological properties of an *Aedes albopictus* mosquito cell line infected with *Wolbachia* strain wAlb B. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2008;44(5-6):154-61.
18. Khoo CC, Venard CM, Fu Y, Mercer DR, Dobson SL. Infection, growth and maintenance of *Wolbachia pipientis* in clonal and non-clonal *Aedes albopictus* cell cultures. *Bull Entomol Res.* 2013;103(3):251-60. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007485312000648>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Luis Morier Díaz, Gladys Gutiérrez-Bugallo, María Magdalena Rodríguez Coto[†], Juan A. Bisset Lazcano.

Investigación: Luis Morier Díaz, Gladys Gutiérrez-Bugallo, Dianeya Mendoza Llanes.

Supervisión: Juan A. Bisset Lazcano.

Visualización: Luis Morier Díaz, Gladys Gutiérrez-Bugallo.

Redacción - borrador original: Luis Morier Díaz, Gladys Gutiérrez-Bugallo.

Redacción - revisión y edición: Luis Morier Díaz, Gladys Gutiérrez-Bugallo.