

**Internalização de ferro e heme por bactérias isoladas do
intestino médio de *Aedes aegypti***

GABRIELA PETROCELI MOTA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

Fevereiro de 2018

**Internalização de ferro e heme por bactérias isoladas do
intestino médio de *Aedes aegypti***

GABRIELA PETROCELI MOTA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Amorim Berbert de Molina

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Fevereiro de 2018

**Internalização de ferro e heme por bactérias isoladas do
intestino médio de *Aedes aegypti***

GABRIELA PETROCELI MOTA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

Comissão examinadora:

Prof^a Dr^a. Aline Chaves Intorne (IFRJ-Niterói, RJ)

Prof. Dr. Francisco José Alves Lemos (LBT/CBB/UENF)

Dr. Adão Valmir dos Santos (LBT/CBB/UENF)

Prof^a. Dr^a. Marília Amorim Berbert de Molina (LBT/CBB/UENF) – Orientadora

Dedico esta conquista aos meus pais, Gilza e José Antônio, pelo amor incondicional, incentivo, e por não medirem esforços para que este sonho se realizasse. Ao meu noivo, Vinicius Azevedo, por todo cuidado e dedicação, e pela certeza que não estive sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos mais difíceis dessa caminhada, me dando forças para superar todas as dificuldades e me permitir chegar até aqui, além de ter me dado uma família maravilhosa e amigos sinceros.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao corpo docente, a coordenação e direção do Centro de Biociências e Biotecnologia, pela oportunidade, pelos ensinamentos e por contribuir para o meu crescimento profissional.

À CAPES, instituição de fomento, pelo auxílio financeiro à pesquisa.

À minha orientadora, Prof^a Marília Amorim Berbert de Molina, por todo conhecimento e ensinamento transmitido desde a graduação, pela dedicação e por confiar em mim. Agradeço também pela amizade que cultivamos e por me acolher como uma filha.

Ao Prof. Francisco José Alves Lemos, por ter acompanhado meu trabalho desde a graduação, contribuindo nas discussões e por aceitar prontamente a participar da avaliação deste trabalho.

Às amigas que o Laboratório me concedeu, Sâmella Machado, Josiane Ribeiro, Rívea Rodrigues e Nathália Duarte, obrigada pelo convívio, pelos aprendizados e, acima de tudo, pela amizade.

À minha grande amiga, Priscila Sousa, pela sincera amizade, pelo ombro amigo nos momentos difíceis e pela confiança. Apesar de não ter mais o contato diário, pelo fato de cada uma seguir seu caminho acadêmico, eu sei que você sempre estará comigo.

Aos meus pais, Gilza Petroceli e José Antônio Almeida, por toda criação, dedicação, ensinamentos, que com certeza me fizeram chegar até aqui e ser o que sou hoje.

Às minhas avós, Clicelita Petroceli e Rita Mota, por terem cuidado de mim quando precisei e por serem um exemplo que eu quero seguir.

Aos meus irmãos, Vinicius Petroceli e Danielle Pedra, e à minha cunhada, Andressa por estarem presentes em todos os momentos da minha vida; vocês foram essenciais nessa caminhada.

Ao meu sobrinho, Antônio Petroceli, à minha sobrinha Yasmim Pedra e ao meu afilhado Kayo Pedra, por toda felicidade que tenho em ter vocês na minha vida.

E, por último, ao meu noivo Vinicius Azevedo, que esteve presente durante toda a realização desse trabalho. Sua dedicação e abdicção de alguns momentos para si mesmo, para me fazer companhia enquanto realizava os experimentos, foram essenciais na conclusão desse trabalho.

A todos o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O mosquito <i>Aedes aegypti</i> : características biológicas e mecanismos de digestão de sangue.....	1
1.2. Microbiota intestinal em insetos.....	5
1.3. Captação e armazenamento de ferro por bactérias.....	9
1.3.1. Ferro e Grupo Prostético Heme.....	9
1.3.2. Mecanismos de captação de ferro e heme.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Geral.....	15
2.2. Específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Microrganismos.....	16
3.2. Meios de cultivo	16
3.3. Condições de cultivo	17
3.3.1. Ativação das culturas	17
3.3.2. Preparo do inóculo.....	17
3.3.3. Ensaio de fermentação	18
3.4. Métodos Analíticos.....	18
3.4.1. Concentração celular	18
3.4.2. Quantificação de hemina.....	20
3.4.3. Análise do perfil proteico	20
3.4.3.1. Extração de proteínas bacterianas	20
3.4.3.2. Quantificação proteica.....	21
3.4.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	21
3.4.4. Atividade peroxidásica em gel de poliacrilamida.....	22

3.5. Cálculo de parâmetros de fermentação	22
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Efeito da presença de ferro no meio de cultivo sobre a cinética de crescimento bacteriano	23
4.1.1. Fermentação em meios contendo quelante de ferro.....	23
4.1.2. Fermentação em meios suplementados com sais de ferro	27
4.2. Cinética de crescimento e consumo de hemina em meios com diferentes concentrações do composto	30
4.3. Perfil proteico e atividade peroxidásica de biomassa bacteriana obtida em cultivos com ferro e hemina	39
4. CONCLUSÕES.....	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de desenvolvimento do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	2
Figura 2. Morfologia interna do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	3
Figura 3. Representação esquemática do trato intestinal de insetos.	4
Figura 4. Representações da estrutura do grupo prostético heme	10
Figura 5. Sistemas de aquisição de ferro por bactérias Gram-negativas. As proteínas de transporte estão localizadas na membrana externa (ME), periplasma (PP) e membrana interna (MI)	12
Figura 6. Curva de calibração para determinação da concentração celular das espécies bacterianas: <i>P. putida</i> , <i>Pantoea sp.</i> e <i>C. gleum</i>	19
Figura 7. Curva de calibração para determinação da concentração de hemina.	20
Figura 8. Curva de calibração para análise de proteínas feita com albumina bovina.	21
Figura 9. Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de <i>P. putida</i> , <i>Pantoea sp.</i> e <i>C. gleum</i> nos meios MC, MC _{200Bp} e MC _{300Bp}	25
Figura 10. Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de <i>P. putida</i> , <i>Pantoea sp.</i> e <i>C. gleum</i> nos meios MC, MC _{CF} e MC _{SF}	28
Figura 11. Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de <i>P. putida</i> em meio MC, MC _{100He} , MC _{150He} e MC _{200He}	31
Figura 12. Concentração de células e hemina, em função do tempo, no cultivo de <i>P. putida</i> em meio MC _{150He}	32
Figura 13. Concentração de células e hemina, em função do tempo, no cultivo de <i>P. putida</i> em meio MC _{200He}	32
Figura 14. Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de <i>Pantoea sp.</i> e <i>C. gleum</i> em meio MC _{100He} e MC.	33

- Figura 15.** Concentração de células e hemina, em função do tempo, no cultivo de *Pantoea sp.* e *C. gleum* em meio MC_{100He}.34
- Figura 16.** Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de *P. putida*, *Pantoea sp.* e *C. gleum* nos meios MC_{100He} e MC_{SF}.37
- Figura 17.** Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de *P. putida* nos meios MC_{150He}, MC_{200He} e MC_{SF}.38
- Figura 18.** Perfil proteico de *P. putida*, no tempo de 10 h, e de *C. gleum*, no tempo de 8 h, cultivadas nos meios: MC, MC_{100He}, MC_{200Bp}, MC_{300B}, MC_{CL} e MC_{SF}. Marcador molecular (M). Foram utilizadas 15 µg de proteína por raia.39
- Figura 19.** Perfil proteico de *Pantoea sp.* no tempo de 8 h cultivada nos meios: MC, MC_{100He}, MC_{200Bp}, MC_{300Bp}, MC_{CL} e MC_{SF}. Marcador molecular (M). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia.40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição do meio de cultivo MC.....	16
Tabela 2.	Composição dos meios de cultivo para avaliação de diferentes fontes de ferro.....	17
Tabela 3.	Parâmetros de crescimento de <i>P. putida</i> , <i>Pantoea sp.</i> e <i>C. gleum</i> na fermentação dos meios MC, MC _{200Bp} e MC _{300Bp}	23
Tabela 4.	Parâmetros de crescimento de <i>P. putida</i> , <i>Pantoea sp.</i> e <i>C. gleum</i> na fermentação dos meios MC, MC _{CF} e MC _{SF}	27
Tabela 5.	Parâmetros de crescimento de <i>P. putida</i> , <i>Pantoea sp.</i> e <i>C. gleum</i> na fermentação do meio controle (MC) e em meios contendo hemina.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

DO	Densidade ótica
ERO	Espécies reativas de oxigênio
MC	Meio controle ou referência
MC _{200Bp}	Meio controle suplementado com 200 μ M de 2,2' bipyridil
MC _{300Bp}	Meio controle suplementado com 300 μ M de 2,2' bipyridil
MC _{CF}	Meio controle suplementado com cloreto férrico
MC _{He100}	Meio controle suplementado com 100 μ M de hemina
MC _{He150}	Meio controle suplementado com 150 μ M de hemina
MC _{He200}	Meio controle suplementado com 200 μ M de hemina
MC _{SF}	Meio controle suplementado com sulfato ferroso
MP	Matriz peritrófica
Q _x	Produtividade em células
t _{xm}	Tempo para obtenção de X _m
X _m	Máxima concentração celular

RESUMO

Aedes aegypti é vetor de arboviroses com grande impacto para a Saúde Pública, como dengue, febre amarela urbana, febre chikungunya e febre Zika. Nas fêmeas, que são hematófagas, elevadas concentrações de heme são liberadas no intestino médio durante a digestão do sangue, o que é potencialmente tóxico para o hospedeiro, pois a molécula é altamente pró-oxidante. Parte do heme liga-se à matriz peritrófica, estratégia que reduz o estresse oxidativo gerado. No entanto, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa sugerem que bactérias associadas ao lúmen intestinal participam do processo de degradação do sangue e podem contribuir para a neutralização dos efeitos tóxicos do heme, o que precisa ser estudado em maior profundidade. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a capacidade de três espécies bacterianas isoladas do intestino médio de *Ae. aegypti* (*Pseudomonas putida*, *Pantoea sp.* e *Chryseobacterium gleum*) para utilizar ferro e heme para o crescimento. O cultivo foi feito em frascos agitados a 30 °C e 130 min⁻¹, empregando-se meios suplementado com 200 e 300 µM de quelante de ferro (MC_{200Bp} e MC_{300Bp}), sulfato ferroso (MC_{SF}), cloreto férrico (MC_{CL}) e hemina (100, 150 e 200 µM; meios MC_{100He}, MC_{150He} e MC_{200He}), tomando-se como base o meio MC (controle). Foi avaliada a cinética de crescimento, a produção total de células, consumo de hemina, expressão diferencial de proteínas e atividade peroxidásica da biomassa. Os resultados mostraram que todas as espécies necessitam de ferro para o crescimento, sendo a produção de biomassa inibida em meios com baixas concentrações do metal (MC_{300Bp}), sobretudo *C. gleum*. Por outro lado, o crescimento é estimulado por quaisquer das fontes de ferro inorgânico, em especial para *P. putida*, cuja concentração celular final (~4,0 g/L) foi 70% maior que em MC. Da mesma forma, todas as espécies demonstraram capacidade de internalizar e metabolizar hemina para o crescimento, verificando-se diminuição progressiva do consumo com o aumento da concentração do composto. *Pantoea sp.* e *C. gleum* consumiram a maior parte da hemina em meio com 100 µM do composto, mas o crescimento foi similar ao do controle (~5,6 g/L). Com *P. putida*, o residual de hemina nos meios MC_{150He} e MC_{200He} foi de 61 e 75%, respectivamente, mas o crescimento foi amplamente favorecido nestas concentrações mais elevadas do composto. Meios suplementados com sais de ferro, na mesma concentração de MC_{100He}, foram mais eficientes para o crescimento que o próprio MC_{100He}, especialmente para *P. putida*. Porém, a produção de biomassa desta espécie em meios com concentrações mais altas de hemina (MC_{150He} e MC_{200He}) foram similares às obtidas nos meios MC_{SF} e MC_{CL}, que tem menor concentração de ferro. Foram verificadas diferenças nos perfis de expressão de proteínas, o que também variou com a espécie bacteriana testada. As diferenças foram mais proeminentes nos meios MC_{300Bp} e MC_{CL}. Não foi observada atividade peroxidásica em nenhuma das espécies nas condições testadas. Em conjunto, os resultados obtidos demonstraram que as três espécies bacterianas são capazes de consumir heme, em concentrações elevadas, o que pode indicar sua habilidade de participar do processo de detoxificação de heme durante a digestão de sangue em fêmeas de *Ae. aegypti*.

ABSTRACT

Aedes aegypti is vector of arboviruses with great impact for Public Health, such as dengue, yellow fever, chikungunya fever and zika virus fever. In females mosquitoes, which are hematophagous, high concentrations of heme are released into the midgut during blood digestion. Free heme is potentially toxic to the host since the molecule is highly pro-oxidant. However, part of the heme binds to the peritrophic matrix as a way to reduce the oxidative stress. Some data obtained by our research group suggest that bacteria associated with intestinal lumen participate in the process of blood degrading and may contribute to neutralize the toxic effects of heme, which needs to be further studied. In this context, the main objective of this work was to investigate the ability of three bacterial species isolated from the mosquito gut (*Pseudomonas putida*, *Chryseobacterium gleum* and *Pantoea sp.*) to use iron and heme for growth. The fermentation runs were carried out in shake flasks under the established operational conditions (30 °C and 110 min⁻¹) using a reference medium (MC) supplemented with 200 and 300 µM of iron chelator (MC_{200Bp} e MC_{300Bp}), ferrous sulphate (MC_{SF}), ferric chloride (MC_{CL}) e hemin (100, 150 e 200 µM; MC_{100He}, MC_{150He} e MC_{200He}). Growth kinetics, total cell production, hemin consumption, differential protein expression and biomass peroxidase activity were evaluated. The results showed that all species require iron for growth and biomass production was inhibited in media with low iron concentrations (MC_{300Bp}), mainly *C. gleum*. On the other hand, the cellular growth was stimulated by both inorganic iron sources, especially with *P. putida*, whose final cellular concentration (~ 4.0 g/L) was 70% higher than in MC medium. Likewise, all species showed the ability to internalize and metabolize hemin for growth, with a progressive decrease in consumption profile with increasing concentrations of the compound. *Pantoea sp.* and *C. gleum* assimilated most of the hemin present in medium with 100 µM of the compound, but the growth was similar to that observed in control medium (~ 5.6 g/L). With *P. putida*, the residual heme in MC_{150He} and MC_{200He} media was 61 and 75%, respectively, but growth was largely improved at these higher concentrations of hemin. In media supplemented with iron salts, at the same concentration as MC_{100He} medium, was more efficient for growth than MC_{100He} itself, especially for *P. putida*. However, with this species the biomass production in media with higher concentrations of hemin (MC_{150He} and MC_{200He}) were similar to those obtained in MC_{SF} and MC_{CL} media, which has lower iron concentration. It was observed some differences in the protein profile, which also varied with the bacterial species. The differences were more prominent in MC_{300Bp} and MC_{CL} media. No peroxidase activity was observed in any of the species under the conditions tested. These results showed that the three bacterial species are able to consume heme at high concentrations, which may indicate their ability to participate in the heme detoxification process during the digestion of blood in *Ae. aegypti*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O mosquito *Aedes aegypti*: características biológicas e mecanismos de digestão de sangue

Os mosquitos do gênero *Aedes* possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas regiões temperadas e tropicais, no qual o clima quente e úmido favorece seu desenvolvimento e proliferação (Harbach, 2017). *Aedes aegypti* (Linnaeus) é vetor de arboviroses relacionadas a doenças de grande importância para a saúde pública, como dengue, febre amarela urbana (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994), febre chikungunya (Mourya *et al.*, 2001) e febre pelo zika vírus (Butler, 2016). Isto se deve à elevada competência do mosquito para a transmissão de vírus e à sua característica antropofílica, ou seja, preferência por sangue humano. A espécie apresenta hábitos diurnos e grande capacidade de se adaptar a ambientes urbanos densamente povoados, sendo seu controle dificultado pelo crescimento da população e a globalização (Gubler, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil registrou 1.483.623 casos prováveis e 694 óbitos de dengue em 2016. No boletim publicado pela Secretaria de Vigilância em Saúde, em novembro de 2017, que apresenta os dados verificados neste mesmo ano, foram registrados 184.458 casos prováveis da doença, 243 casos graves e 122 óbitos. Nesse período, a região Nordeste registrou o maior número de casos (84.051; 35,2%), seguida das regiões Centro-Oeste (74.691; 31,2%), Sudeste (55.381; 23,2%), Norte (21.057; 8,8%) e Sul (3.896; 1,6%) (Ministério da Saúde, 2017). Embora tenha havido uma redução do número de casos em 2017, dados históricos mostram grande variação na ocorrência da doença nos últimos anos, havendo preocupação constante das autoridades de Saúde Pública no país.

A febre Chikungunya vem se espalhando pelo Brasil, com 277.882 mil notificações de casos suspeitos no ano de 2016 e 184.458 mil em 2017 (Ministério da Saúde, 2017). Outro vírus transmitido por *Ae. aegypti*, o zika vírus, foi confirmado em 14 estados brasileiros em 2015 (Ministério da Saúde, 2015) e têm sintomas leves, como febre, erupção cutânea e dor de cabeça. Segundo a Organização Mundial da Saúde, existe forte suspeita de haver relação da infecção do zika vírus durante a gravidez e microcefalia (Butler, 2016).

O *Ae. aegypti* apresenta em seu ciclo de vida quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Assim como para outros mosquitos, a fase reprodutiva se inicia nos primeiros dias da fase adulta. Depois da fase de acasalamento, a fêmea realiza hematofagia, ou repasto sanguíneo, para o desenvolvimento e maturação dos ovos, e torna-se apta para a oviposição após 3 a 5 dias. Os ovos eclodem depois de completar o desenvolvimento embrionário, dando origem à fase larvária. A larva apresenta quatro instares larvais e quando madura transforma-se em pupa e posteriormente no adulto (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

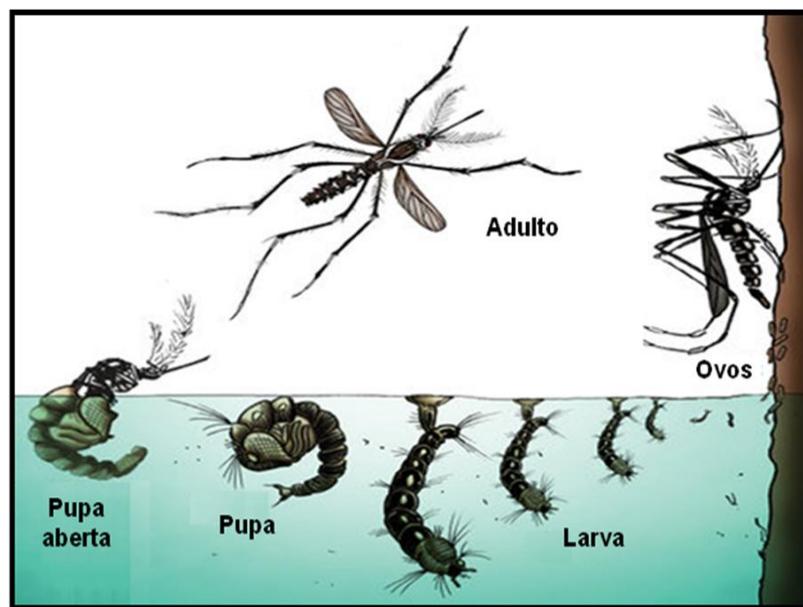


Figura 1 - Ciclo de desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti*. Adaptado de Esper (2016).

O metabolismo energético do mosquito adulto é dependente da ingestão de carboidrato proveniente de seiva, flores e frutos. O macho se alimenta somente de soluções açucaradas de origem vegetal como fonte de energia, enquanto a fêmea adulta diminui a ingestão de açúcar quando em contato frequente com vertebrados, devido à preferência pelo repasto sanguíneo. Durante a alimentação, as fêmeas injetam sua saliva no hospedeiro, a qual pode conter patógenos. A frequência da alimentação sanguínea nos vertebrados e a alta densidade da população pode

elevar significativamente o risco de transmissão de patógenos (Scott e Takken, 2012).

A hematofagia é realizada mais de uma vez a cada ciclo gonadotrófico, sendo capaz de suprir reservas nutricionais, aumentar a fecundidade e longevidade das fêmeas. O mosquito realiza a digestão do alimento no aparelho digestivo que se inicia na boca (região anterior) e se estende até o ânus (região posterior). O tubo digestivo é formado por uma camada de células epiteliais e é dividido em três regiões: intestino anterior, médio e posterior (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994), conforme esquematizado na Figura 2.

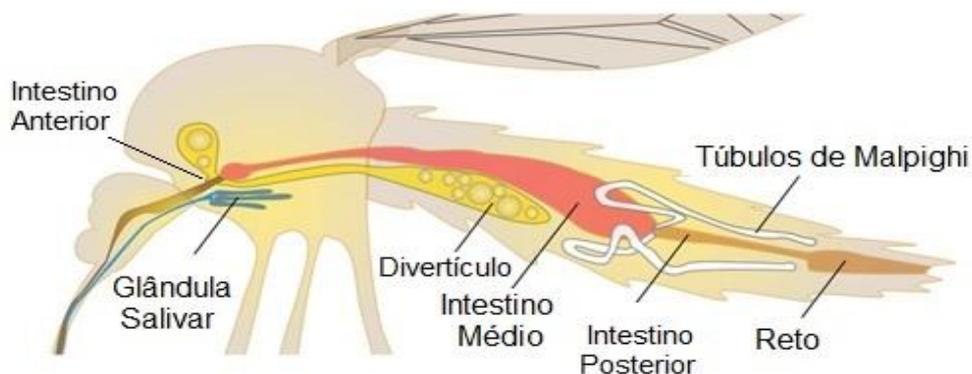


Figura 2 - Morfologia interna do mosquito *Ae. aegypti* (Adaptado de Hine *et al.*, 2014).

O intestino anterior é responsável pela ingestão, condução e armazenamento do alimento. É formado pelas bombas cibarial e faríngea, que são êmbolos de sucção, pelo divertículo ventral, que reserva carboidratos, e pela válvula de estomodel, que direciona carboidrato e sangue ingeridos pela fêmea (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Quando a fêmea realiza o repasto sanguíneo a válvula abre-se e o sangue é encaminhado e armazenado no intestino médio; no entanto, na ingestão de alimentos ricos em açúcares, a válvula permanece fechada e o alimento é encaminhado para o divertículo ventral, onde ocorre a digestão inicial através de enzimas da glândula salivar. O carboidrato é liberado gradativamente para o intestino médio, sendo digerido aos poucos. Esse mecanismo da válvula de estomodel proporciona à fêmea a capacidade para manter o intestino médio vazio, estando apta a realizar o repasto sanguíneo (Romoser, 1996). O alimento não

digerido no intestino médio é encaminhado para o intestino posterior que é responsável pelo processo de excreção, composto por íleo, ampola retal e ânus. O intestino posterior reabsorve seletivamente água, aminoácidos e alguns íons, produzindo uma urina hiper ou hiposmótica, que é secretada junto ao bolo fecal. O bolo fecal é composto por produtos não digeridos e produtos inutilizáveis que passam pelo intestino posterior e perdem água (Phillips *et al.*, 1986; Klowden, 2013).

Em insetos hematófagos, como o mosquito *Ae. aegypti*, uma matriz constituída por quitina, proteínas e proteoglicanas (Lehane, 1997), denominada matriz ou membrana peritrófica (MP), é sintetizada após a alimentação com sangue por células epiteliais ao longo da porção posterior do intestino médio (Lehane, 2005). Esta MP é formada em volta do alimento ingerido e separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (localizado dentro da MP) e o espaço ectoperitrófico (espaço fora da MP) (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994) (Figura 3). A digestão do sangue que resulta na liberação de peptídeos, aminoácidos e grandes quantidades de heme no lúmen intestinal (Pascoa *et al.*, 2002), inicia no interior da MP, sob a ação de enzimas que degradam as moléculas, então os compostos de menor massa molecular se difundem para o espaço ectoperitrófico. A digestão final ocorre nas microvilosidades do intestino médio (Terra, 1990).

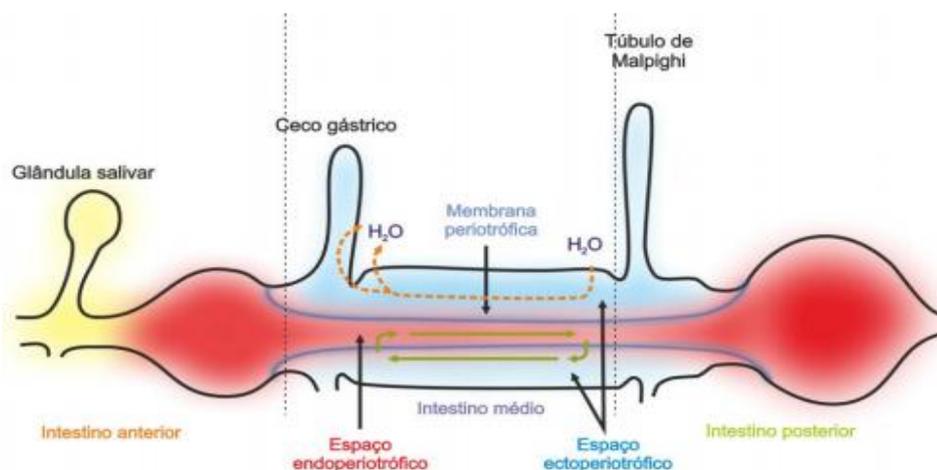


Figura 3 - Representação esquemática do trato intestinal de insetos (Silva *et al.*, 2012).

Em ensaios realizados com moscas tsé-tsé (*Glossina spp.*), Weiss *et al.* (2014) observaram que a MP age como uma barreira física contra microrganismos invasores, ingeridos durante a alimentação. Em *Ae. aegypti*, grande parte do heme gerado no catabolismo da hemoglobina liga-se fortemente à MP, ficando retido no lúmen intestinal, o que sugere que esta matriz pode funcionar como uma barreira eficiente para o heme, auxiliando na sua detoxificação (Pascoa *et al.*, 2002).

1.2. Microbiota intestinal em insetos

De modo geral, todos os animais abrigam um número elevado de microrganismos no intestino. Nos insetos, acredita-se que a associação com microrganismos influenciou, em grande parte, a diversificação e o sucesso evolutivo destes animais (Engel e Moran, 2013). Segundo Douglas (2014), os diferentes aspectos das vias de sinalização e das vias reguladoras das funções animais evoluíram no contexto das interações contínuas com microrganismos, e embora alguns táxons não sejam obrigatoriamente dependentes da sua microbiota, é cada vez mais evidente que os microrganismos influenciam muitas características do inseto. Constantemente os insetos adquirem microrganismos do ambiente, incluindo bactérias e fungos, mas podem também adquirir espécies de seus pais por transmissão vertical (Colman *et al.*, 2012). Nos afídeos (Homoptera, Insecta), por exemplo, ocorre uma interação simbiótica obrigatória com bactérias, como *Buchnera sp.*, que sintetiza moléculas essenciais à reprodução, como vitaminas e aminoácidos (Shigenobu *et al.*, 2000). Os triatomíneos, vetores da doença de Chagas, são exclusivamente hematófagos e, embora este tipo de dieta seja rico em aminoácidos essenciais e proteínas, é escassa em carboidratos, lipídeos e vitaminas. Bactérias da espécie *Rhodococcus rhodnii*, que colonizam o trato digestivo destes insetos, completam a alimentação do hospedeiro pelo fornecimento de nutrientes, tornando-se essenciais para o desenvolvimento do inseto (Yassin, 2005).

As interações benéficas entre microrganismos e insetos podem ser essenciais para o desenvolvimento do hospedeiro (Dillon e Dillon, 2004). Com frequência, os microrganismos residentes contribuem na suplementação de dietas pobres em nutrientes, fornecem proteção contra predadores, parasitas e agentes patogênicos, auxiliam na digestão de componentes alimentares recalcitrantes, colaboram na comunicação inter e intraespecífica e influenciam processos de reprodução (Engel e

Moran, 2013). No caso de insetos vetores de importantes doenças, também foi demonstrada a importância da microbiota residente para a digestão de nutrientes, metabolismo, produção de ovos, desenvolvimento e resposta imune (Jupatanakul *et al.*, 2014).

De modo geral, os mosquitos abrigam uma dinâmica e complexa comunidade de microrganismos (Osei-Poku *et al.*, 2012; Champion e Xu, 2017). A estrutura da comunidade microbiana varia em função de fatores como a espécie, sexo e estágio de vida, origem geográfica e comportamento alimentar, bem como o órgão analisado (Boissière *et al.*, 2012; Moro *et al.*, 2013). A composição é também significativamente influenciada pelas fontes onde os mosquitos adquirem microrganismos do ambiente, ou seja, habitats aquáticos e terrestres (Buck *et al.*, 2016). Especificamente em relação ao estágio de desenvolvimento, o microbioma tende a ser diferente, sobretudo em relação ao do intestino, uma vez que o habitat das fases larval e de pupa (aquática) é completamente diferente do habitat da fase adulta (terrestre). A microbiota do intestino de larvas de mosquitos é amplamente eliminada no mecônio através da remodelação do intestino durante a metamorfose e, assim, o microbioma do intestino médio de adultos tem que ser repovoado (Jupatanakul *et al.*, 2014). Os mosquitos recém emergidos adquirem novas bactérias do néctar ou outras fontes de açúcar natural das plantas (Champion e Xu, 2017). Em *Anopheles gambiae*, o intestino das fases aquáticas é predominantemente povoado por cianobactérias (Thiery *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2011), enquanto a microbiota do intestino médio de adultos é composta sobretudo por Proteobacteria e Bacteroidetes oriundos do meio ambiente e veiculados pela dieta (Wang *et al.*, 2011).

Bactérias podem colonizar diferentes órgãos do inseto, sendo o intestino o principal deles e, em menor grau, glândulas salivares e órgãos reprodutivos. O intestino é uma interface com o ambiente externo e fornece nutrientes e espaço favoráveis à multiplicação microbiana (Minard *et al.*, 2013a). O intestino médio de mosquitos é o principal sítio de interação entre insetos hematófagos e os patógenos por eles transmitidos (Billingsley e Lehane, 1996). Um impacto significativo na estrutura microbiana no intestino de fêmeas de mosquitos pode ocorrer após uma refeição com sangue, observando-se aumento na população e, ao contrário, diminuição na diversidade (Wang *et al.*, 2011; Boissiere *et al.*, 2012).

Bactérias residentes no intestino destes insetos podem ter um papel decisivo na epidemiologia de doenças infecciosas humanas (Gusmão *et al.*, 2007), ao reduzir

a competência vetorial de arboviroses e outros agentes patogênicos. Esta redução pode ocorrer por meio da ativação da resposta imune, competição por nutrientes ou produção de moléculas antivirais (Jupatanakul *et al.*, 2014). Schlein *et al.* (1985) mostraram que a prevalência de microrganismos no trato digestivo de fêmeas de flebotomíneos possuem efeito negativo na transmissão da leishmaniose em áreas endêmicas. Beier *et al.* (1994) concluíram que bactérias Gram-negativas reduzem significativamente o número de oocistos em *Plasmodium*.

Alguns estudos mostraram que a microbiota associada a insetos vetores influencia a competência do vetor na transmissão de arbovírus. Xi *et al.* (2008) verificaram que a remoção da microbiota intestinal de *Ae. aegypti* com antibióticos resultou em maiores títulos do vírus dengue no intestino médio do inseto. A bactéria *Wolbachia* presente nas glândulas salivares de *Ae. albopictus* proporciona resistência à infecção pelo vírus da dengue (Mousson *et al.*, 2012), enquanto aquelas que residem nos órgãos reprodutivos têm o potencial de transmissão vertical do patógeno (Ricci *et al.*, 2011). A bactéria também induz resistência ao mesmo vírus em *Ae. aegypti* (Bian *et al.*, 2010). Ramirez *et al.* (2012) também constataram que a bactéria *Proteus sp.*, isolada do intestino de *Ae. aegypti* de campo aumentou a resistência do mosquito à infecção com vírus dengue. Em trabalho publicado recentemente, Ramirez *et al.* (2014) mostraram que a bactéria *Chromobacterium sp.* isolada de *Ae. aegypti* de campo pode reduzir a susceptibilidade do mosquito à infecção com vírus dengue.

A microbiota do intestino de mosquitos adultos tem sido a mais estudada. O intestino médio de fêmeas é na maior parte colonizada por membros de *Gammaproteobacteria*, assim como para outros insetos que se alimentam de sangue. Bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia* e *Enterobacter* estão frequentemente associadas às fêmeas de várias espécies de mosquito (Minard *et al.*, 2013a). Alguns gêneros, como *Pantoea*, *Acinetobacter* e *Asaia* são também muito prevalentes em mosquitos, e podem colonizar diferentes espécies (Terenius *et al.*, 2012; Moro *et al.*, 2013). Em trabalho realizado na Índia com *Culex quinquefasciatus*, mosquito vetor da febre do Nilo, Chandel *et al.* (2013) identificaram bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Proteus* (Proteobacteria), além de *Bacillus* (Firmicutes) e *Acinetobacter* (Actinobacteria). Em outro estudo, feito com diferentes espécies de mosquitos do Quênia, as bactérias mais comuns foram *Gammaproteobacteria* (tais como *Aeromonas*), *Flavobacteria*

(tais como *Chryseobacterium*) e *Alphaproteobacteria* (tais como *Asaia*) (Osei-Poku *et al.*, 2012). Os genomas de vários isolados bacterianos derivados de mosquitos foram sequenciados, incluindo *Elizabethkingia anophelis* (Kukutla *et al.*, 2013; Raygoza *et al.*, 2016), *Enterobacter sp.* (Jiang *et al.*, 2012), *Pseudomonas sp.* (Alvarez *et al.*, 2012), *Serratia sp.* (Pei *et al.*, 2015), *Stenotrophomonas maltophilia* (Hughes *et al.*, 2016a) e *Staphylococcus hominis* (Hughes *et al.*, 2016b).

Usando métodos dependentes de cultivo, Moro *et al.* (2013) avaliaram a composição bacteriana em populações de campo de *Ae. albopictus* em diferentes regiões de Madagascar. O estudo permitiu identificar 27 gêneros, distribuídos em três filos principais. Em mosquitos fêmea, os isolados bacterianos foram principalmente *Proteobacteria* (51,3%), seguido por *Firmicutes* (30,3%) e *Actinobacteria* (18,4%). Por outro lado, o filo mais abundante em mosquitos machos foi *Actinobacteria* (48%), seguido de *Proteobacteria* (30,6%) e *Firmicutes* (20,4%). *Pantoea* foi o gênero mais comum em ambos os sexos, em todos os pontos de amostragem. *Acinetobacter* tem sido frequentemente associada com mosquito de diferentes espécies, incluindo *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. triseriatus*, *An. stephensi*, *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*. Esta bactéria também foi encontrada em locais de reprodução de larvas e em várias fontes alimentares do mosquito adulto tais como vertebrados ou plantas (Minard *et al.*, 2013a e b). De maneira semelhante, os gêneros *Asaia* e *Pantoea*, cujo habitat natural é o néctar de flores tropicais, também foram observados em mosquitos (Moro *et al.*, 2013).

Gusmão *et al.* (2007, 2010) isolou e caracterizou espécies bacterianas do divertículo ventral do trato digestivo de *Ae. aegypti*, identificando *Serratia sp.*, *Bacillus sp.* e *Bacillus subtilis*, com predominância de *Serratia sp.* Os dados indicaram o provável papel desta espécie na fermentação de sacarose. De acordo com Gusmão *et al.* (2010), algumas espécies bacterianas se associam ao epitélio intestinal de *Ae. aegypti* durante a digestão sanguínea e prevalecem em regiões com alta atividade proteolítica, sugerindo que a microbiota pode participar na indução da expressão de proteínas envolvidas no processo digestivo do sangue. Gaio *et al.* (2011a) reforçaram esta hipótese, demonstrando que a redução da população bacteriana por administração de antibióticos afetou a lise de hemácias, retardando o processo digestivo e privando o mosquito de nutrientes essenciais, o que afetou a maturação de oócitos, reduzindo a produção de ovos.

De acordo com (Douglas, 2014), além do interesse intrínseco, o estudo das interações de insetos com a microbiota residente pode gerar conhecimentos sobre os processos equivalentes em outros animais, incluindo seres humanos. Pesquisas nesta área têm potencial para identificar os mecanismos fundamentais sobre como os animais interagem com sua microbiota residente. Os autores ressaltam que as interações entre mosquitos e sua microbiota ainda precisam ser investigadas em profundidade. A maioria dos estudos publicados descrevem a diversidade bacteriana e sua variação com fatores específicos. No entanto, uma análise mais abrangente das interações simbióticas de mosquitos é necessária em níveis evolutivos e funcionais. Jupatanakul *et al.* (2014) também afirmam que o estudo das interações entre insetos vetores e sua microbiota é um passo importante para o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle de transmissão de arbovírus. Neste contexto, a hipótese do nosso grupo de pesquisa, que vem estudando diferentes aspectos da colonização do trato digestivo de *Ae. aegypti* por bactérias, é que esta microbiota pode contribuir no processo de resposta ao estresse oxidativo provocado pelo heme durante a digestão do sangue.

1.3. Captação e armazenamento de ferro por bactérias

1.3.1. Ferro e Grupo Prostético Heme

O ferro é um elemento essencial para todos os organismos, incluindo bactérias. É considerado o quarto metal mais abundante na superfície terrestre. O ferro pode existir em um dos dois estados redox prontamente interconvertíveis, na forma férrica (Fe^{3+}), encontrado na presença de altas concentrações de oxigênio, e na forma ferrosa (Fe^{2+}) que possui uma maior solubilidade, mas é encontrado apenas em ambientes com ausência de oxigênio ou com baixo pH (Andrews *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2010). O ferro normalmente é utilizado como grupo prostético ou cofator de proteínas, participando de processos metabólicos como fixação de nitrogênio, ciclo do ácido cítrico, resistência a estresse redox, transporte de oxigênio, fotossíntese, regulação gênica e biossíntese de DNA (Andrews *et al.*, 2003).

Apesar de o ferro estar envolvido em processos metabólicos importantes, em condições aeróbicas pode ser extremamente tóxico, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), que compreendem os radicais de O_2 , como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) e alguns não-radicais (HOCl ,

HOBr, O₃, ONOO⁻) (Halliwell, 2006). As células possuem mecanismos antioxidantes para proteção contra a produção elevada desses radicais, que apesar de ser essencial para um bom funcionamento do sistema biológico como na defesa contra agentes infecciosos e sistema de sinalização celular, em altas concentrações podem ser prejudiciais às células, causando danos às estruturas e componentes celulares, incluindo membranas, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Valko *et al.*, 2006). Deste modo, para obter homeostase eficaz, o ferro se mantém associado a proteínas ou outros ligantes dentro dos organismos, o que garante a solubilidade do metal e previne a formação de ERO (Chu *et al.*, 2010). O desequilíbrio entre a geração e neutralização de ERO é denominado estresse oxidativo (Valavanidis, 2006). O distúrbio ocorre, portanto, quando as defesas antioxidantes não são suficientes para combater as altas concentrações de ERO (Foyer e Noctor, 2003).

Em vertebrados, o ferro é limitado dentro de um anel de porfirina, como ferriprotoporfirina IX ou heme (Anzaldi e Skaar, 2010). O grupo prostético heme está presente na hemoglobina (Hb) e é constituído por uma parte orgânica e um átomo de ferro (Rose *et al.*, 1985) (Figura 4). Dessa forma, a hemoglobina é uma hemoproteína e faz parte da família das proteínas globulares, que são caracterizadas por terem a cadeia polipeptídica enrolada de forma esférica ou globular, possuindo vários tipos de estruturas secundárias (Nelson e Cox, 2004). O heme pode ser degradado para liberar ferro ou ser usado como um co-fator em proteínas respiratórias (hemoglobina e mioglobina), translocases de elétrons (citocromo) e enzimas redox (catalases, peroxidase) (Tong e Guo, 2009).

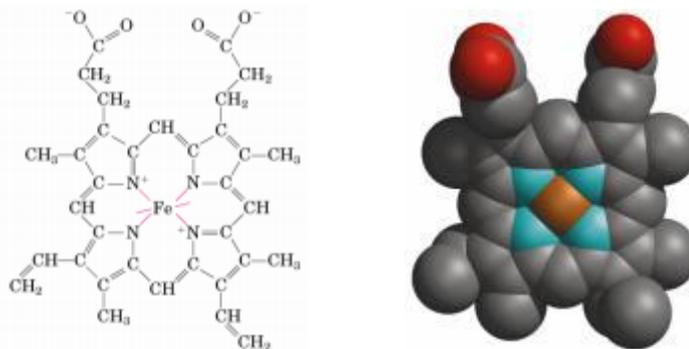


Figura 4 - Representações da estrutura do grupo prostético heme (Fe-protoporfirina IX). Adaptado de Nelson e Cox (2004).

O heme é uma importante molécula catalisadora de muitos processos oxidativos, no entanto quando está livre da cadeia polipeptídica da hemoglobina, o heme é altamente pró-oxidante (Dansa-Petretski *et al.*, 1995; Ryter e Tyrrell, 2000). Portanto, a digestão da hemoglobina libera uma quantidade significativa de heme livre, gerando radicais hidroxílicos através da reação de Fenton, que pode induzir o estresse oxidativo (Sadrzadeh *et al.*, 1984; Gutteridge e Smith, 1988; Ryter e Tyrrel, 2000). Do mesmo modo, quando a degradação de heme por oxigenases ultrapassar a demanda de ferro livre dentro da célula, a toxicidade é desencadeada (Anzaldi e Skaar, 2010). Como molécula anfifílica, o heme pode se associar a membranas biológicas causando uma perturbação na sua permeabilidade e seletividade, além da peroxidação de lipídeos componentes destas membranas (Schmitt *et al.*, 1993). Por isso, as concentrações desse metal nas células são finamente reguladas.

A microbiota intestinal de mosquitos se adaptou às condições oxidativas geradas após a alimentação com sangue. Ambos, inseto e sua microbiota intestinal trabalham em conjunto para manter uma homeostase redox, adotando múltiplos mecanismos para contornar os níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Champion e Xu, 2017). Os mosquitos também produzem ROS para combater agentes patogênicos. Em uma cepa refratária de *Anopheles gambiae*, elevados níveis de ROS demonstraram ser um dos fatores limitantes ao desenvolvimento de *Plasmodium*, parasita da malária (Kumar *et al.*, 2003). O mosquito *Ae. polynesiensis*, vetor primário de *Wuchereria bancrofti*, que é o agente causador da filariose linfática, é naturalmente infectado com *Wolbachia*. Andrews *et al.* (2012) infectaram *Ae. polynesiensis* com uma cepa de *Wolbachia* isolada de *Ae. albopictus* e observaram aumento nos níveis de ROS, o que afetou a fisiologia do hospedeiro e o desenvolvimento do agente causador da filariose.

1.3.2. Mecanismos de captação de ferro e heme

Apesar de o ferro ser abundante na terra e o crescimento celular depender de concentrações micromolares do metal, este é biologicamente indisponível na maioria dos ambientes. Em condições anaeróbicas, o ferro férrico pode ser transportado para dentro da célula bacteriana sem nenhum quelante, e sob condições aeróbicas, o ferro está na sua forma insolúvel e precisa ser complexado e solubilizado para a captação. Outra fonte de ferro para bactérias é aquele ligado ao grupo prostético

heme, e que pode ser captado a partir das moléculas de hemoglobina, hemopexina e haptoglobina (Andrews *et al.*, 2003).

As bactérias utilizam dois mecanismos de captação específicos para mobilizar ferro e heme. O primeiro envolve um contato direto entre a bactéria e a fonte exógena de ferro e heme, e o segundo, baseia-se em compostos sintetizados e liberados no meio extracelular para retirar ferro ou heme de diferentes fontes (Figura 5) (Köster, 2001). Como a sobrecarga de ferro é tóxica para as células bacterianas, sua assimilação é estritamente regulada. A maioria dos genes bacterianos envolvidos na captação do metal são expressos em condições de deficiência de ferro, e quando a concentração do metal aumenta, estes genes são reprimidos (Wandersman e Depeleire, 2004).

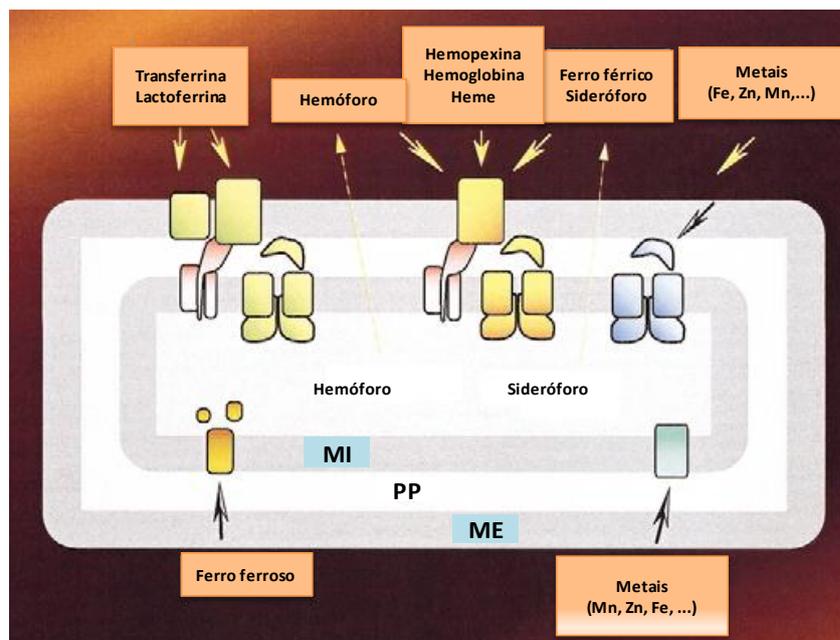


Figura 5 - Sistemas de aquisição de ferro por bactérias Gram-negativas. As proteínas de transporte estão localizadas na membrana externa (ME), periplasma (PP) e membrana interna (MI). Adaptado de Köster (2001).

Bactérias são capazes de secretar quelantes de ferro de baixo peso molecular, denominados sideróforos (Figura 5), que são capazes de ligar Fe^{3+} com alta afinidade e apresentam três tipos estruturais envolvidos na complexação dessa forma do metal: catecolatos, hidroxamatos e α -hidroxicarboxilatos (Andrews *et al.*, 2003; Wandersman e Depeleire, 2004). O sideróforo é produzido na sua forma

isenta de ferro, liga-se ao ferro formando o complexo ferrisideróforo, mas não é transportado através da membrana da bactéria por difusão passiva (Wandersman e Stojilivic, 2000).

Em bactérias Gram-negativas, essas moléculas são reconhecidas por receptores específicos da superfície celular e transportadas ativamente contra um gradiente de concentração para o periplasma bacteriano (Wandersman e Stojilivic, 2000). A proteína TonB localizada no espaço periplasmático, juntamente com as proteínas ExbB e ExbD, ambas ancoradas à membrana interna, formam uma unidade funcional denominada sistema TonB-ExbB-ExbD, capaz de acoplar o transporte mediado pelo receptor de membrana externa ao potencial eletroquímico através da membrana interna, permitindo abertura do canal e transporte de moléculas para o periplasma (Köster, 2001; Andrews *et al.*, 2003). Dessa forma, as proteínas de ligação periplasmáticas transferem ferrisideróforos dos receptores de membrana externa para transportadores cassetes de ligação de ATP (ABC) na membrana citosólica que, por sua vez, liberam os ferrisideróforos para o citosol onde os complexos são dissociados por redução, liberando o ferro complexado para utilização no metabolismo celular (Wandersman e Stojilivic, 2000).

Como não possuem membrana externa, as bactérias Gram-positivas não necessitam de receptores de membrana externa, nem de sistema TonB-ExbB-ExbD. Estas utilizam permeases ABC dependentes de proteínas de ligação que são análogas às utilizadas por Gram-negativas, exceto que a proteína de ligação é geralmente uma lipoproteína ligada a superfície externa da membrana citosólica (Wandersman e Stojilivic, 2000; Köster, 2001; Andrews *et al.*, 2003; Wandersman e Depeleire, 2004).

Como o heme é fonte de ferro para as bactérias, o grupo prostético é prontamente internalizado por receptores dependentes de TonB, mas também pode ser internalizado por proteínas de ligação de ferro de elevada afinidade. Uma proteína de ligação de heme, chamada hemofóro (HasA), é secretada por transportadores ABC para o meio extracelular na sua forma apo, com função de captar o heme de diferentes hemoproteínas, e o devolvem ao seu receptor de membrana externa específico, HasR (Wandersman e Stojilivic, 2000). O sistema HasA já foi caracterizado em *Serratia marcescens* (Létoffé *et al.*, 1994), *Pseudomonas aeruginosa* (Idei *et al.*, 1999) e *Yersinia enterocolitica* (Rossi *et al.*,

2001). De acordo com Létoffé *et al.* (1994), a bactéria Gram-negativa *Serratia marcescens* secreta a proteína HasA em condições de deficiência de ferro.

Certas bactérias Gram-negativas adquirem heme a partir de proteínas transportadoras de heme do hospedeiro, como transferrina, com função de transporte e proteção contra toxicidade do ferro, e lactoferrina, cuja função é captura de ferro (Figura 5). A internalização desses complexos contendo ferro é mais uma vez realizada por receptores dependentes de TonB. As proteínas carreadoras de heme são descarregadas na superfície celular, mediado por receptores de membrana externa e o heme é encaminhado para o periplasma. Do mesmo modo, ao chegar no periplasma, o heme é transportado por permeases periplasmáticas dependentes da proteína ABC específica, pela membrana interna até o citoplasma, onde é degradado pela heme oxigenase, liberando o ferro complexado (Köster, 2001; Andrews *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2010).

Algumas espécies bacterianas, como *E. coli*, apresentam proteínas de armazenamento de ferro, denominadas ferritinas e bacterioferritinas, as quais fornecem reserva de ferro intracelular quando os suprimentos externos são restritos, e proteínas de desintoxicação de ferro (Dps) para proteger o cromossomo de danos causados por radicais livres induzidos pelo ferro. As proteínas de armazenamento absorvem ferro na forma ferrosa solúvel, mas o ferro é depositado na cavidade central na forma férrica oxidada (Andrews *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

1.4. Geral

O trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de crescimento de três espécies bacterianas isoladas do intestino médio do mosquito *Aedes aegypti*, *Pseudomonas putida*, *Pantoea sp.* e *Chryseobacterium gleum*, em meios contendo heme e duas fontes inorgânicas de ferro, visando mostrar o papel auxiliar desta microbiota no processo de detoxificação do heme durante a digestão de sangue no inseto.

1.5. Específicos

- Avaliar o perfil cinético de crescimento das três espécies bacterianas em meios de cultivo suplementados com composto quelante de ferro ou com fontes inorgânicas do metal, de modo a identificar seu efeito sobre a produção de células;
- Avaliar o perfil cinético de crescimento e de consumo de hemina, pelas três espécies bacterianas, em meios suplementados com este composto, buscando verificar a capacidade de internalização e metabolismo desta fonte orgânica de ferro;
- Analisar a expressão diferencial de proteínas bacterianas nos cultivos realizados com todos meios empregados nos ensaios de avaliação da cinética de crescimento;
- Analisar a atividade peroxidásica nos cultivos realizados em meios suplementados com hemina.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

As espécies bacterianas isoladas do intestino médio de *Aedes aegypti* (Gaio *et al.*, 2011b; Rodrigues, 2008) e identificadas como *Pseudomonas putida*, *Chryseobacterium gleum* e *Pantoea sp.* (Mota, 2016) foram utilizadas no trabalho. As culturas foram estocadas em solução de glicerol em freezer a -70 °C.

3.2. Meios de cultivo

O meio CASO_{mod} (Tabela 1), estabelecido por Mota (2016), foi utilizado para manutenção das culturas, preparo de inóculos e como meio controle ou de referência. O meio foi renomeado como meio MC neste trabalho, ressaltando-se que sua composição não inclui a adição de qualquer fonte de ferro.

Para avaliar o efeito da presença de ferro sobre o crescimento bacteriano foram testados os meios MC_{SF} e MC_{CF}, formulados com sulfato ferroso (FeSO₄) e cloreto férrico (FeCl₃), respectivamente. A concentração de cada sal foi aquela necessária para manter a concentração de ferro aportada por 100 µM de hemina (0,00558 g/L). A massa de cada um dos sais foi calculada a partir da concentração de ferro presente em 1 mol do composto (Tabela 2). Para evidenciar o efeito da supressão de ferro do meio sobre o crescimento bacteriano, foi empregado o meio MC contendo 200 ou 300 µM do composto quelante de ferro 2,2'-bipiridil (SIGMA). Este meio foi denominado MC_{200Bp} e MC_{300Bp}, respectivamente.

Para avaliar o crescimento bacteriano em meios com concentrações crescentes de hemina (Sigma), o meio MC foi suplementado 100, 150 e 200 µM do composto (meios MC_{100He}, MC_{150He} e MC_{200He}, respectivamente).

Tabela 1- Composição do meio de cultivo MC.

Componente	Concentração (g/L)
Peptona de caseína	15,0
K ₂ HPO ₄	2,5
NaCl	5,0
Glicose	2,5* ou 10,0**
Agar	15,0

* Meio de preparo de cultura estoque e inóculos;

** Meio de fermentação

Tabela 2 – Composição dos meios de cultivo para avaliação de diferentes fontes de ferro.

Meio →	MC _{SF}	MC _{CF}
↓ Componente		
Peptona de caseína	15,0	15,0
K ₂ HPO ₄	2,5	2,5
NaCl	5,0	5,0
Glicose	10,0	10,0
Sulfato ferroso	0,0278	-
Cloreto férrico	-	0,01622

Para preparo dos meios, os componentes foram dissolvidos em água ultrapura (Milli-Q) e, após solubilização, os meios foram autoclavados a 121 °C por 15 min. O pH foi ajustado para 7,5 com KOH antes da esterilização.

3.3. Condições de cultivo

3.3.1. Ativação das culturas

Para reativação das culturas, estocadas em freezer a -70 °C, foi utilizado meio MC com 2,5 g/L de glicose. Frascos Erlenmeyer de 250 mL, com chicanas, contendo 50 mL de meio foram inoculados pela transferência direta de uma alçada de cultura estocada em meio MC sólido, em placa de Petri, a 4 °C. Os frascos foram cobertos com manta de algodão e gaze e incubados em agitador orbital (Nova Ética modelo 430 RDB) a 30 °C e 130 min⁻¹, por tempo suficiente para atingir densidade óptica total de cerca de 1,0 a 600 nm. Uma alíquota da cultura foi repicada em meio MC sólido, em placa de Petri, por estria simples, usando alça de platina. As placas foram incubadas por 24 h em estufa a 30 °C e a cultura assim obtida foi usada para preparo de inóculos ou estocada em geladeira até realização de novo ensaio, em prazo não superior a 10 dias.

3.3.2. Preparo do inóculo

Para o preparo de inóculos, frascos Erlenmeyer de 250 mL, com chicanas, contendo 50 mL de meio MC com 2,5 g/L de glicose foram inoculados pela transferência direta de alçada da cultura estoque. Os frascos foram cobertos com manta feita de algodão e gaze e incubados em agitador orbital (Nova Ética modelo

430 RDB) a 30 °C e 130 min⁻¹. O tempo de incubação foi aquele necessário para o cultivo atingir a metade da fase linear de crescimento, registrando-se a densidade ótica do cultivo neste momento para padronização dos ensaios subsequentes. Uma curva de crescimento até a fase estacionária foi feita previamente, para cada espécie bacteriana, para definir o tempo adequado de incubação.

3.3.3. Ensaios de fermentação

Os ensaios de fermentação em frascos agitados foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com chicanas, contendo 100 mL de meio, cobertos com manta de algodão e gaze, e inoculados com 5% (v/v) de inóculo. Os frascos foram incubados em agitador orbital (Nova Ética modelo 430 RDB) a 30 °C e 130 min⁻¹ até que o cultivo atingisse a fase estacionária. Sob estas condições foi avaliado o desempenho das diferentes espécies bacterianas nos meios MC, MC_{200Bp}, MC_{300Bp}, MC_{SF}, MC_{CF}, MC_{He100, 150 e 200}. Em todos os casos, a concentração inicial de glicose foi de 10 g/L. Os valores de DO, medidos ao longo do cultivo, foram convertidos em concentração por meio da equação da curva de calibração.

Para cada isolado, foram retiradas amostras do meio fermentado em diferentes tempos de fermentação para quantificação do consumo de hemina (item 3.4.2.), análise do perfil proteico (item 3.4.4.) e atividade peroxidásica (item 3.4.5.).

3.4. Métodos Analíticos

3.4.1. Concentração celular

A concentração celular foi quantificada indiretamente pela medida da absorbância de suspensões diluídas do meio fermentado, convertida em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) por uma equação que descreve o trecho linear de uma curva de calibração. Foi construída uma curva de calibração para cada espécie bacteriana.

Para a construção da curva foi utilizada uma suspensão de células obtidas nas mesmas condições adotadas para os ensaios de fermentação em frascos agitados, usando meio MC com 10 g/L de glicose. Foi usado o procedimento descrito por Berbert-Molina (1998). Um volume do meio fermentado foi centrifugado, descartando-se o sobrenadante; o pellet foi homogeneizado em água destilada e

centrifugado duas vezes. As células foram transferidas para cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados, os quais foram colocados em estufa para secagem por 24 h. Os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados, calculando-se a concentração celular. Paralelamente às operações de determinação da massa seca de células, a absorbância das amostras, convenientemente diluídas, foi medida em espectrofotômetro (SHIMADZU UV1800) a 600 nm.

A absorbância de cada uma das suspensões de células foi correlacionada com a concentração e, com os pontos do trecho linear da reta obtida, foi definida a equação, por regressão linear. Esta foi utilizada no cálculo da concentração celular das amostras de fermentação durante os diferentes ensaios. As equações e a curva de calibração estão representadas na Figura 6, em que X representa a concentração celular, em g/L.

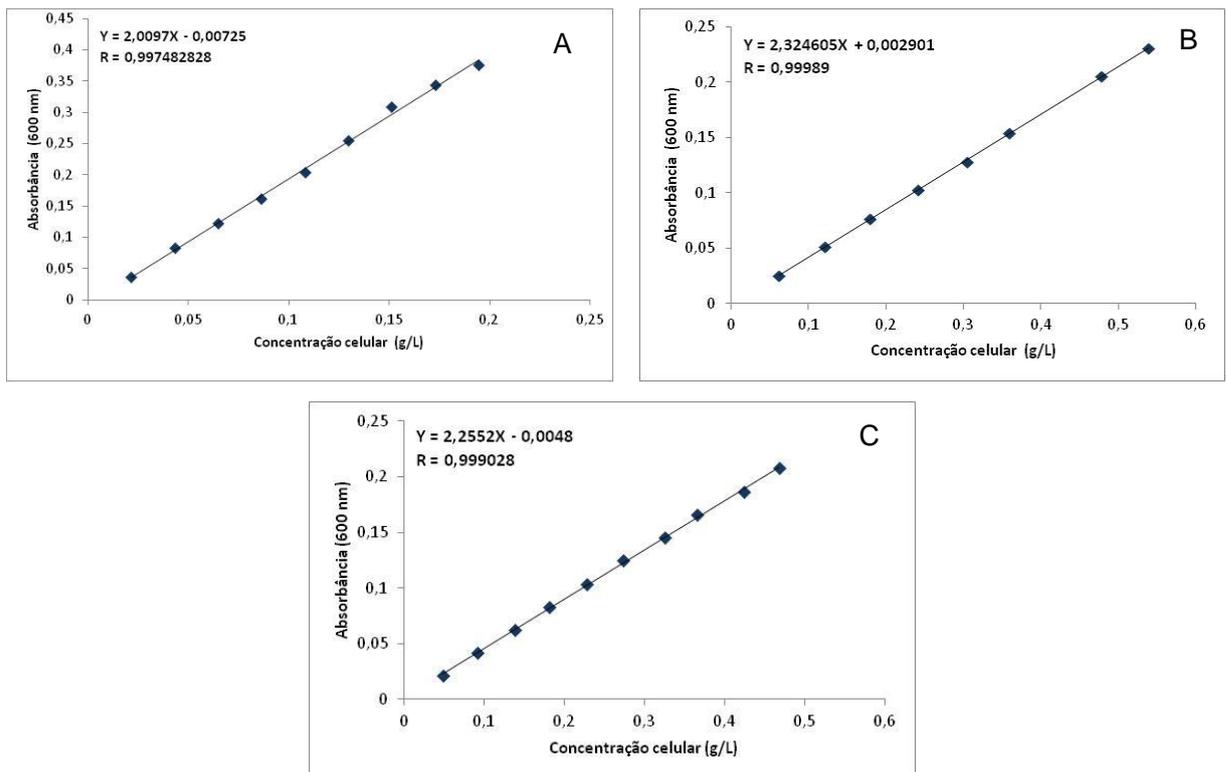


Figura 6 - Curva de calibração para determinação da concentração celular das espécies bacterianas: *P. putida* (A), *Pantoea sp.* (B) e *C. gleum* (C).

3.4.2. Quantificação de hemina

A quantificação do teor de hemina no sobrenadante de amostras do meio fermentado, foi feita pelo método proposto por Huy *et al.* (2005). Uma alíquota de 100 μL de amostra convenientemente diluída foi misturada com 400 μL do reagente Turbo TMB-ELISA (3,3',5,5' tetrametil benzidina). A mistura foi incubada por 30 min a temperatura ambiente e, em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de ácido sulfúrico 2M, sendo a absorbância medida em espectrofotômetro (SHIMADZU UV1800) a 450 nm. Para a construção da curva padrão (Figura 7), uma solução concentrada de hemina (1 mM) foi diluída para concentrações finais entre 0,1 e 13,0 μM , realizando-se a análise da mesma forma.

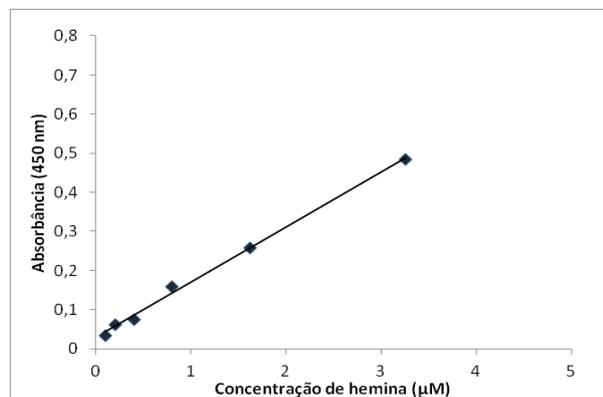


Figura 7 - Curva de calibração para determinação da concentração de hemina.

3.4.3. Análise do perfil proteico

3.4.3.1. Extração de proteínas bacterianas

Uma alíquota (1 mL) das culturas bacterianas obtida em processo fermentativo (item 3.3.3.) foi centrifugada a 5.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes com água Milli-Q autoclavada. Após a lavagem as bactérias foram ressuspensas em Tris-HCl 20 mM pH 7,5 e sonicadas no Lavadora Ultrassom (Embrasol, modelo: LS-8D-1/X) com 2 ciclos de 1 minuto. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 15 min. e o sobrenadante foi retirado para um novo tubo e congelado.

3.4.3.2. Quantificação proteica

A quantificação proteica dos extratos bacterianos foi feita utilizando-se o método de Lowry *et al.* (1951). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, reagente Folin-Ciocalteu, que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima a 660 nm.

A curva padrão de albumina foi feita com as concentrações de 2,5; 10; 25 e 50 µg/mL. A curva padrão (Figura 8), relaciona a concentração protéica das soluções com a leitura de absorbância no Espectrofotômetro Shimadzu no comprimento de onda igual a 660 nm. Após a construção da curva padrão, foi feita uma regressão linear com o auxílio do *software* EXCEL e obteve-se uma equação da reta que foi utilizada para a quantificação de proteína nas diferentes amostras. A quantificação de proteínas totais nas amostras foi feita com os mesmos reagentes utilizados na construção da curva padrão.

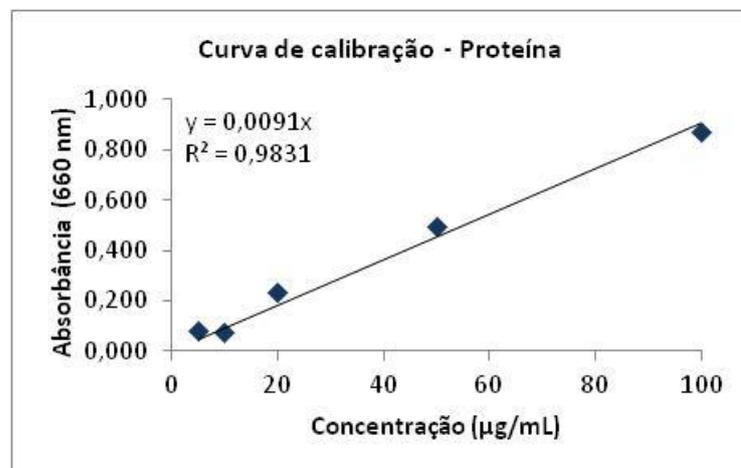


Figura 8 - Curva de calibração para análise de proteínas feita com albumina bovina.

3.4.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As eletroforeses desnaturantes foram feitas em gel de poliacrilamida a 12,5% e 1,0 mm de espessura. Foram aplicadas 15 µg de proteínas dissolvidas tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS 2%, glicerol 10%; azul de bromofenol 0,0005%; β-mercaptoetanol 2,5%) e fervidas por 3 min a 100 °C. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 110 V por aproximadamente 1h em

tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1%). O gel foi fixado com 40% de etanol e 10% de ácido acético por 1h, corado com uma solução de 80% Colloidal Coomassie Staining (0,1% Coomassie Brilliant Blue G250, 2% de ácido ortofosfórico e 10% de sulfato de amônia) e 20% de metanol, overnight e descorado com solução de ácido acético a 1%.

3.4.4. Atividade peroxidásica em gel de poliacrilamida

As eletroforeses não desnaturantes, feitas na ausência de SDS, foram realizadas em gel de poliacrilamida 12,5%, e 1,0 mm de espessura. Foram aplicadas 40 µg de proteínas dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol 10% e azul de bromofenol 0,0005%). As corridas eletroforéticas foram feitas a 110 V por aproximadamente 1,5 h, em tampão de corrida (Tris 25 mM e glicina 192 mM). O gel foi fixado com TCA 12,5% por 30 min e lavado em água destilada, por 30 min. Para revelação da atividade, os géis foram submersos em 20 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,4 contendo DAB (dimetoxibenzidina) 1 mg/mL e peróxido de hidrogênio 0,06%. Após o aparecimento das bandas, o gel foi lavado com água destilada.

3.5. Cálculo de parâmetros de fermentação

Para o cálculo da produtividade volumétrica em células (Q_x) foi utilizada a equação:

$$Q_x = X_m / t_{X_m}$$

Em que X_m é a máxima concentração celular produzida no processo, já descontado a biomassa presente no tempo inicial de cultivo (X_0), enquanto t_{X_m} representa o tempo para obtenção de X_m .

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da presença de ferro no meio de cultivo sobre a cinética de crescimento bacteriano

4.1.1. Fermentação em meios contendo quelante de ferro

Para avaliar a presença de traços de ferro no meio MC, usado como referência para estudar o crescimento celular nos demais meios empregados no trabalho, este foi suplementado com um forte quelante de ferro (2,2'-bipiridil) nas concentrações de 200 μM (MC_{200Bp}) e 300 μM (meio MC_{300Bp}). A escolha da concentração de 200 μM , testada inicialmente, foi feita com base no trabalho de Chaves (2013), que permitiu o sequestro de todo o ferro disponível no meio usado no cultivo de *Xylella fastidiosa*.

A Tabela 3 mostra alguns parâmetros de fermentação, enquanto a Figura 9 apresenta a cinética de crescimento das três espécies bacterianas nestes meios de cultivo. Verificou-se que, com *P. putida*, os perfis de crescimento foram similares nos meios MC e MC_{200Bp} até o tempo de 12 h de fermentação, aproximadamente (Fig. 9A). Porém, em MC o cultivo atingiu a máxima concentração celular ($X_m = 2,3 \text{ g/L}$) com 12,6 h (t_{x_m}), enquanto em MC_{200Bp} o crescimento se estendeu por mais tempo, sendo t_{x_m} alcançado com 16,3 h, quando o cultivo entrou na fase estacionária. Como o valor de X_m neste meio (2,4 g/L) foi muito similar ao do controle, a produtividade em células (Q_x), que em MC foi de 0,19 g/L.h, caiu para 0,15 g/L.h, uma diferença de 27%.

Tabela 3 - Parâmetros de crescimento de *P. putida*, *Pantoea sp.* e *C. gleum* na fermentação dos meios MC, MC_{200Bp} e MC_{300Bp}.

Parâmetro	<i>P. putida</i>			<i>Pantoea sp.</i>			<i>C. gleum</i>		
	MC	MC _{200Bp}	MC _{300Bp}	MC	MC _{200Bp}	MC _{300Bp}	MC	MC _{200Bp}	MC _{300Bp}
t_{x_m} (h)	12,6	16,3	12,6	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	10,0
X_m (g/L)	2,3	2,4	1,7	5,6	3,6	1,9	5,4	4,1	0,87
Q_x (g/L.h ⁻¹)	0,19	0,15	0,14	0,40	0,26	0,18	0,38	0,29	0,087

t_{x_m} - Tempo para obtenção da máxima concentração celular; X_m - Máxima concentração celular (diferença entre a concentração celular em t_{x_m} e no início do cultivo); Q_x - Produtividade em células. MC: meio controle; MC_{200Bp} e MC_{300Bp}: meios com 200 e 300 μM de 2,2'-bipiridil, respectivamente.

Ao avaliar as curvas de crescimento das outras duas espécies, *Pantoea sp.* e *C. gleum* (Fig. 9B e 9C, respectivamente), observou-se um comportamento completamente distinto. O cultivo de *Pantoea sp.* no meio de referência (MC) levou a uma concentração total de biomassa de 5,6 g/L em 14 h de processo, o que representa uma produtividade em células de 0,40 g/L.h. No entanto, no meio MC_{200Bp} o crescimento foi muito mais lento e a cinética apresentou um perfil linear durante todo o processo. Aparentemente, seria necessário um maior tempo de incubação para que o cultivo alcançasse a máxima concentração celular, mas verifica-se que o valor obtido com 14 h ($X_m = 3,6$ g/L) é 55,5% menor que o verificado no meio MC no mesmo tempo. Da mesma forma, o valor de Q_x (0,26 g/L.h) foi negativamente afetado (54% menor). No caso do cultivo com *C. gleum*, verificou-se igualmente um impacto negativo da composição do meio MC_{200Bp} sobre o crescimento, mas o efeito da supressão do ferro foi mais brando. Após uma fase *lag* e, possivelmente, uma fase exponencial, verificou-se aumento das velocidades de crescimento, alcançando-se 4,1 g/L de células em 14 h, valor 32% menor que o obtido no meio MC. Como t_{x_m} foi idêntico, o valor de Q_x no meio MC_{200Bp} (0,29 g/L.h) foi inferior ao do meio MC (0,38 g/L.h).

Os resultados obtidos no cultivo de *Pantoea sp.* e *C. gleum* no meio MC_{200Bp} permitem deduzir que o meio MC contém ferro, uma vez que a diminuição da concentração do metal no meio prejudicou o crescimento celular. De modo geral, a exigência de ferro para maioria das bactérias Gram-negativas varia de 0,3 a 1,8 μM (Vasil e Ochsner, 1999). Não foi possível afirmar que a concentração empregada do composto quelante (200 μM) era suficiente para retirar de solução todo o ferro existente no meio, pois nenhuma das duas espécies foi completamente inibida. No caso de *P. putida*, este meio não impactou negativamente a produção de biomassa, embora tenha levado à diminuição da produtividade em células, o que poderia indicar que a bactéria apresenta, aparentemente, uma menor dependência de ferro para o crescimento, que as outras duas espécies. Ou seja, mesmo que na concentração usada o quelante não tenha sido suficiente para sequestrar todo o ferro, a concentração residual permitiu a produção de biomassa no mesmo nível do obtido no meio controle. Outra hipótese para justificar o comportamento observado seria a captação de ferro residual proveniente do inóculo ou, ainda, que as células inicialmente cultivadas no MC, durante a etapa de produção de inóculo, tenham estocado reservas intracelulares desse metal. Fawazy *et al.* (2016) identificaram

uma cepa de *P. putida* que, quando cultivada em meios com ferro, acumulam o metal em vacúolos intracelulares.

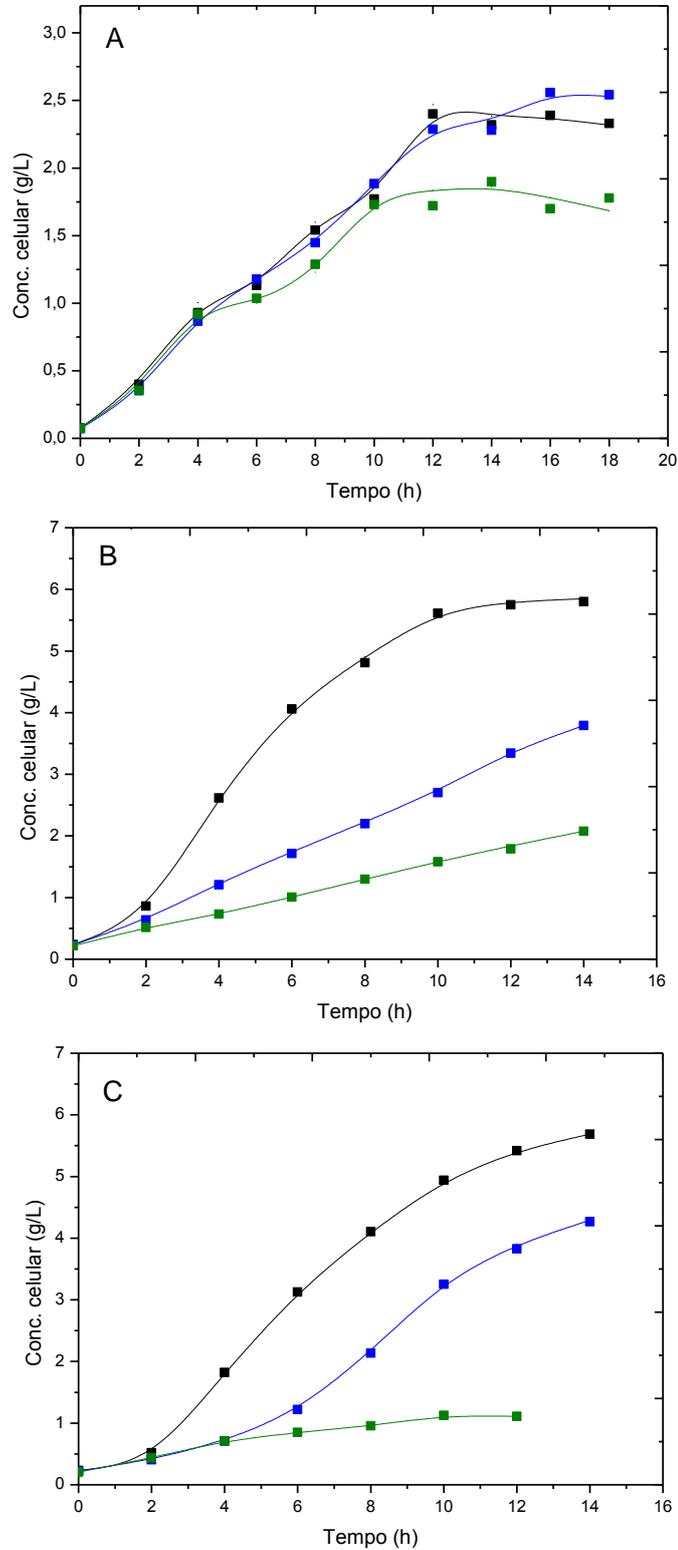


Figura 9 - Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de *P. putida* (A), *Pantoea sp.* (B) e *C. gleum* (C) nos meios MC (■), MC_{200Bp} (■) e MC_{300Bp} (■).

Na busca de melhor esclarecer os resultados, optou-se por aumentar a concentração de quelante no meio MC para 300 μM (meio MC_{300Bp}). Como mostra a Figura 9, nessa condição, o crescimento de todas as espécies foi negativamente afetado, com maior evidência para o cultivo de *C. gleum* (Fig. 9C), em que a produção de biomassa foi extremamente reduzida. Comparando-se com o meio MC, o valor de X_m alcançado com o meio MC_{300Bp} foi mais de 6 vezes menor para esta espécie. No cultivo de *Pantoea sp.*, verificou-se o mesmo perfil linear apresentado no meio MC_{200Bp}, mas com velocidades de crescimento ainda menores. Neste caso, em relação ao controle, a produção de biomassa foi quase três vezes menor, enquanto a diferença no valor da produtividade em células foi superior a 100%. Com *P.putida*, a cinética de crescimento no meio MC_{300Bp} foi distinta às verificadas em MC e MC_{200Bp}. Embora os perfis tenham sido coincidentes nas primeiras 4 horas de processo, verificou-se redução das velocidades de crescimento a partir deste momento do processo, obtendo-se concentração celular 35% menor que em MC. Como t_{x_m} foi idêntico ao de MC, a produtividade em células foi 36% menor.

Os resultados obtidos no cultivo das três espécies bacterianas no meio com maior concentração de composto quelante (300 μM) reforçam a constatação de que todas elas necessitam de ferro para o crescimento. No entanto, fica também evidente que essa dependência é bastante variável entre as espécies, uma vez que o impacto sobre a produção de biomassa variou de modo significativo.

Bactérias podem assimilar ferro de forma passiva ou pela secreção de sideróforos, que ligam Fe^{3+} com alta afinidade, formando o complexo ferrisideróforo que se liga a receptores de membrana externa (Wandersman e Stojiljkovic, 2000; Andrews *et al.*, 2003). Bactérias Gram-negativas, como é o caso das três espécies aqui estudadas, apresentam proteínas transportadoras no periplasma, que transferem ferrisideróforos para o citosol, onde o ferro é liberado (Wandersman e Stojiljkovic, 2000). A maioria dos genes bacterianos envolvidos na captação do metal são expressos em condições de deficiência de ferro, e quando a concentração do metal aumenta, estes genes são reprimidos (Wandersman e Depeleire, 2004). Desta forma, estudos mais aprofundados são necessários para identificar os mecanismos usados por *P. putida*, *Pantoea sp.* e *C. gleum* para o transporte e captação de ferro, o que pode esclarecer as diferenças encontradas nos perfis de crescimento.

4.1.2. Fermentação em meios suplementados com sais de ferro

As três espécies bacterianas foram cultivadas em meio MC suplementado com duas fontes distintas de ferro, os sais sulfato ferroso (meio MC_{SF}) e cloreto férrico (meio MC_{CF}), buscando identificar eventuais diferenças nos perfis de crescimento. A concentração de cada sal foi equivalente à concentração do metal presente em 100 μM de hemina, uma vez que era objetivo do trabalho avaliar a capacidade da bactéria de utilizar este composto (item 3.2). Os resultados são mostrados na Figura 10 e na Tabela 4, as quais também apresentam os resultados obtidos no meio MC para facilitar a comparação.

Tabela 4 - Parâmetros de crescimento de *P. putida*, *Pantoea sp.* e *C. gleum* na fermentação dos meios MC, MC_{CF} e MC_{SF} .

Parâmetro	<i>P. putida</i>			<i>Pantoea sp.</i>			<i>C. gleum</i>		
	MC	MC_{CF}	MC_{SF}	MC	MC_{CF}	MC_{SF}	MC	MC_{CF}	MC_{SF}
t_{X_m} (h)	12,6	20,0	18,0	14,0	10,8	10,8	14,0	12,0	12,3
X_m (g/L)	2,3	3,9	4,0	5,6	6,9	6,5	5,4	6,6	7,1
Q_x (g/L.h ⁻¹)	0,19	0,19	0,22	0,40	0,64	0,60	0,38	0,55	0,58

t_{X_m} - Tempo para obtenção da máxima concentração celular; X_m - Máxima concentração celular (diferença entre a concentração celular em t_{X_m} e no início do cultivo); Q_x - Produtividade em células. MC: meio controle; MC_{CF} e MC_{SF} : meios suplementados com cloreto férrico e sulfato ferroso, respectivamente.

Verificaram-se cinéticas de crescimento semelhantes, na maior parte do tempo de cultivo, nos meios MC_{SF} e MC_{CF} e para todas as três espécies, com evidente estímulo da produção de biomassa, mostrando que estas apresentam afinidade pelas duas fontes de ferro. Porém, comparando-se com MC, o resultado mais marcante refere-se ao cultivo de *P. putida*, que, de forma surpreendente, apresentou aumento médio de 70% em X_m (3,9 e 4,0 g/L em MC_{CF} e MC_{SF} , respectivamente) (Tabela 4). Ainda em relação ao controle, as velocidades de crescimento foram maiores e a produção de biomassa prolongou-se por várias horas, verificando-se t_{X_m} muito superiores (20 e 18 h, em MC_{CF} e MC_{SF} , respectivamente). Apesar disso, compensando as maiores concentrações de células em ambos os meios, os valores de Q_x no cultivo desta espécie foram similares ao obtido em MC.

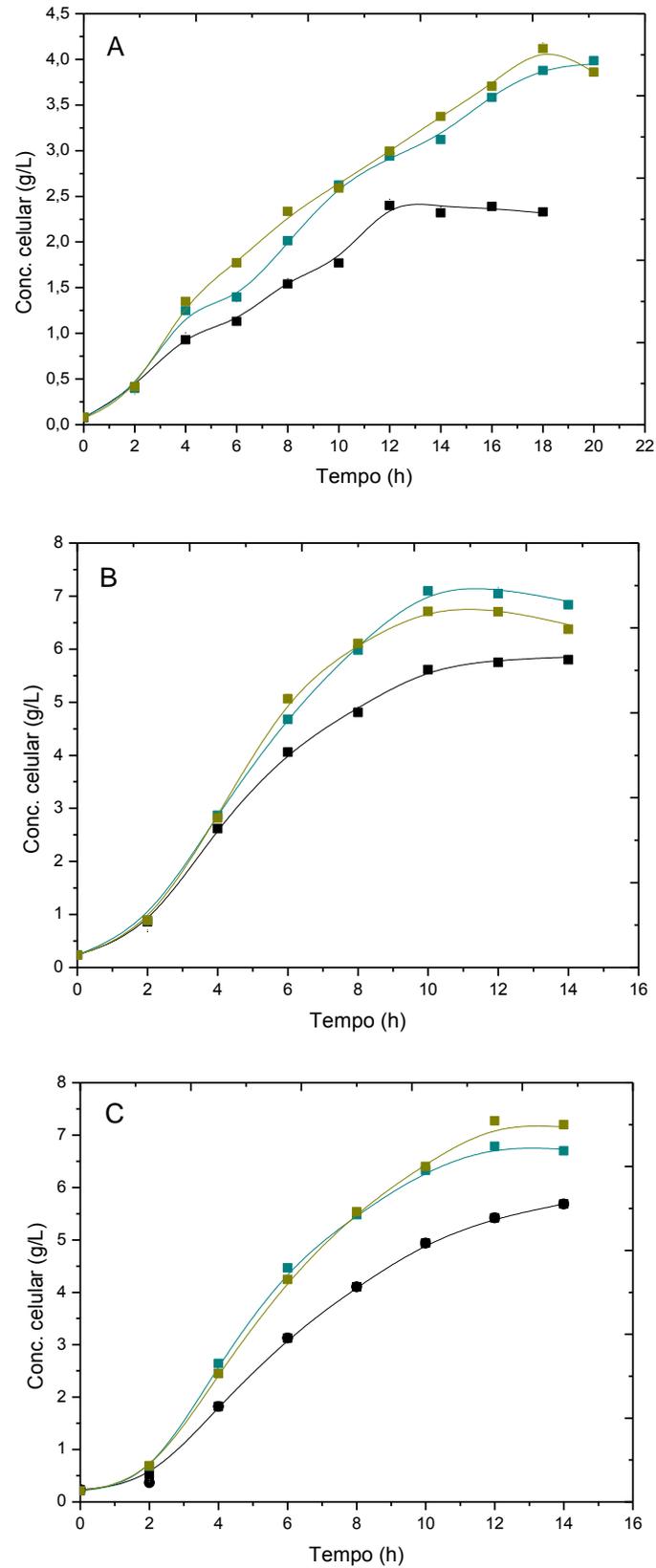


Figura 10 – Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de *P. putida* (A), *Pantoea sp.* (B) e *C. gleum* (C) nos meios MC (■), MC_{CF} (■) e MC_{SF} (■).

A expressiva produção de biomassa no cultivo de *P. putida* nos meios MC_{SF} e MC_{CF} indica que a hipótese feita anteriormente de que o crescimento da bactéria seja menos influenciado pelo ferro que o das demais espécies testadas não se confirma. Assim, é mais provável que a suposição usada para justificar o crescimento nos meios MC e MC_{200BP}, baseada na eventual capacidade de armazenamento de ferro em vacúolos, possa explicar os resultados.

Para as espécies *Pantoea sp.* e *C. gleum*, foram observadas diferenças no efeito dos dois sais de ferro sobre alguns parâmetros de fermentação, em comparação com o controle. Com *Pantoea sp.*, a maior concentração celular obtida no meio MC_{CF} (6,9 g/L) foi 23% maior que a de MC, enquanto a diferença no caso do cultivo de MC_{SF} ($X_m = 6,5$ g/L) para o controle foi de 16%. Em ambos os meios, t_{X_m} foi 30% menor (10,8 h) que o do controle, resultando em incremento de 60 e 50%, respectivamente, na produtividade em células ($Q_x = 0,64$ e $0,60$ g/L.h, respectivamente). No cultivo de *C. gleum*, a diferença entre os valores de X_m obtidos em MC_{CF} e MC foi similar à observada no cultivo de *Pantoea sp.*, 22%. De modo distinto, no entanto, no meio MC_{SF} o valor de X_m (7,1 g/L) foi 31,5% maior que em MC. Os valores de t_{X_m} também foram menores que o do controle (~ 12 h), mas a diferença foi de apenas 17%. Nesse contexto, verificaram-se valores de Q_x 45 e 53% maiores (para MC_{CF} e MC_{SF}, respectivamente) que o controle.

Ao avaliar o efeito de concentrações crescentes de FeCl₃ (0,1; 10; 50 e 100 µM) sobre o cultivo em meio líquido de *Xylella fastidiosa*, Silva-Stenico *et al.* (2005) verificaram aumento progressivo da densidade celular. O aumento na máxima densidade ótica foi de 66% no meio com 100 µM da fonte de ferro. Cabaj e Kosakowska (2009) observaram que a concentração de ferro III influenciou fortemente a cinética de crescimento de *Micrococcus luteus* e *Bacillus silvestres*, com variação na duração das diferentes fases e menor velocidade deste último. Para *M. luteus*, a maior densidade ótica foi obtida com 1 µM de cloreto férrico, comparando-se concentrações de 0,4 e 50 µM. Os autores relatam que ambas as espécies são produtoras de diferentes tipos de sideróforos.

Em ensaios de cultivo de quatro isolados de água subterrânea em meios suplementados com sulfato ferroso, Fawazy *et al.* (2016) identificaram uma cepa de *P. putida* que demonstrou resistência a concentração de até 8 mg/L do composto. O crescimento bacteriano foi inibido em meio com 9 mg/L de FeSO₄, concentração 3 vezes menor que a utilizada nos meios MC_{SF} no presente trabalho.

4.2. Cinética de crescimento e consumo de hemina em meio contendo hemiem meios com diferentes concentrações do composto

Para avaliar a capacidade das espécies bacterianas em captar ferro associado ao heme, as três espécies bacterianas foram cultivadas em meio MC suplementado com hemina. Para as espécies *Pantoea sp.* e *C. gleum*, foi testada uma única concentração do composto, 100 μM (meio MC_{100He}), enquanto para *P. putida*, foram avaliadas duas outras concentrações, 150 e 200 μM (meios MC_{150He} e MC_{200He}, respectivamente).

Na Tabela 5 são mostrados alguns parâmetros de fermentação obtidos no processo. A Figura 11 apresenta os perfis cinéticos de crescimento de *P. putida* nos diferentes meios, além do resultado obtido em MC. Observa-se que, em comparação com o controle, todos os meios formulados com hemina permitiram maior crescimento celular. A diferença entre os valores de X_m obtidos no meio com menor concentração do composto (MC_{100He}) e em MC foi de 17,4% ($X_m = 2,7$ e $2,3$ g/L, respectivamente), indicando a capacidade da bactéria de captar ferro presente na molécula orgânica. Perfis análogos foram observados até 8 h de processo nos dois meios, mas em MC_{100He} as velocidades de crescimento aumentaram a partir desse ponto, indicando que a presença de maior quantidade de ferro permitiu melhor aproveitamento dos demais componentes do meio pela bactéria. A máxima concentração celular foi alcançada mais de 5 h depois ($t_{x_m} = 18$ h) que o observado em MC, mas sem incremento proporcional da concentração celular, houve diminuição da produtividade em células ($Q_x = 0,15$ g/L.h), que em MC foi igual a $0,19$ g/L.h.

O aumento da concentração de hemina de 100 para 150 e 200 μM (meios MC_{150He} e MC_{200He}) favoreceu amplamente o crescimento celular, verificando-se valores de X_m 44,4 e 59,6% maiores, respectivamente, que o alcançado em MC_{100He}. Ainda que o tempo necessário para atingir essas concentrações também tenha sido maior ($t_{x_m} = 20,5$ e $21,1$ h, respectivamente), a grande diferença entre os valores de X_m resultou em produtividades 30% maiores, em média. Comparando-se, por outro lado, os resultados obtidos nos meios MC_{150He} e MC_{200He}, constatou-se que a produção de biomassa foi apenas 10% maior em MC_{200He}, em tempo de processo similar, implicando em produtividades análogas.

Tabela 5 - Parâmetros de crescimento de *P. putida*, *Pantoea sp.* e *C. gleum* na fermentação do meio controle (MC) e em meios contendo hemina.

Parâmetro	<i>P. putida</i>				<i>Pantoea sp.</i>		<i>C. gleum</i>	
	MC	MC _{100He}	MC _{150He}	MC _{200He}	MC	MC _{100He}	MC	MC _{100He}
t_{X_m} (h)	12,6	18,0	20,5	21,1	14,0	10,6	14,0	14,0
X_m (g/L)	2,3	2,7	3,9	4,3	5,6	5,8	5,4	5,7
Q_x (g/L.h ⁻¹)	0,19	0,15	0,19	0,203	0,40	0,54	0,38	0,41

t_{X_m} - Tempo para obtenção da máxima concentração celular; X_m - Máxima concentração celular (diferença entre a concentração celular em t_{X_m} e no início do cultivo); Q_x - Produtividade em células. MC_{100He}, MC_{150He} e MC_{200He} - meios com 100, 150 e 200 µM de hemina, respectivamente.

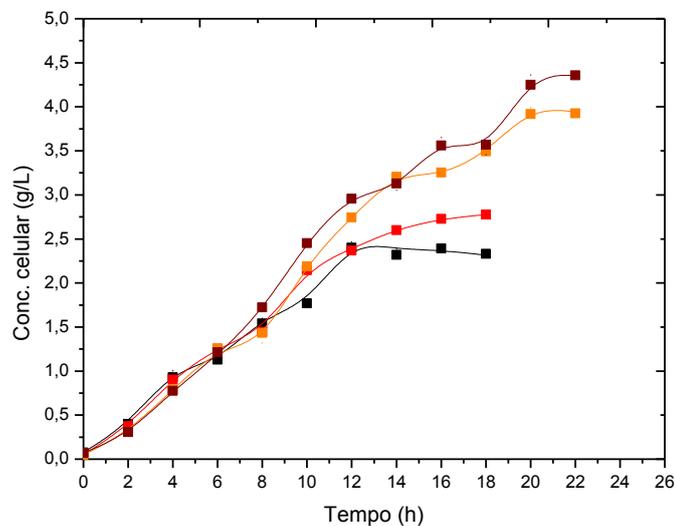


Figura 11 - Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de *P. putida* em meio MC (■), MC_{100He} (■), MC_{150He} (■) e MC_{200He} (■).

As Figuras 12 e 13 apresentam, além do perfil de crescimento, a cinética de consumo de hemina por *P. putida* nos meios MC_{150He} e MC_{200He}, respectivamente, ficando evidenciada, em ambos os casos, uma elevada concentração residual do composto ao final do processo. Os percentuais de consumo, em relação à concentração inicial no meio, foram de 38,7 e 25%, respectivamente. Notou-se, igualmente, que as maiores velocidades de consumo ocorreram nas primeiras 10 horas de fermentação, tendo havido, a partir desse ponto, uma baixa internalização do composto pela biomassa bacteriana. Também nos dois casos, observou-se que a diminuição das velocidades de crescimento foi coincidente com o período do processo de menor consumo de hemina.

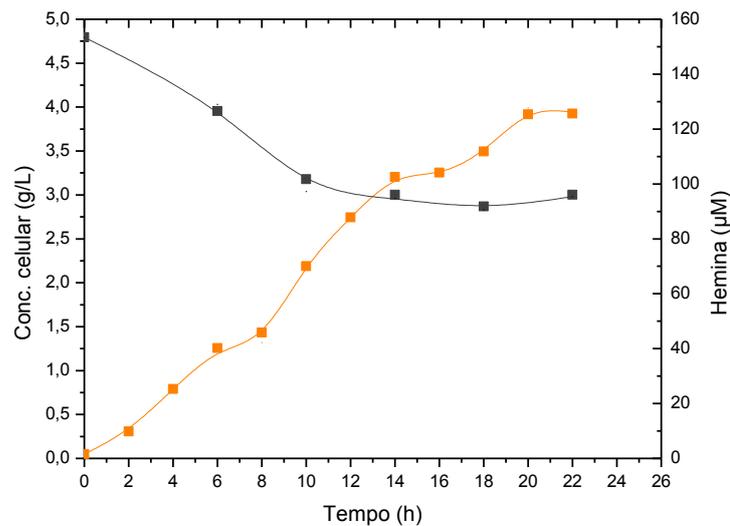


Figura 12 - Concentração de células (■) e hemina (■), em função do tempo, no cultivo de *P. putida* em meio MC_{150He}.

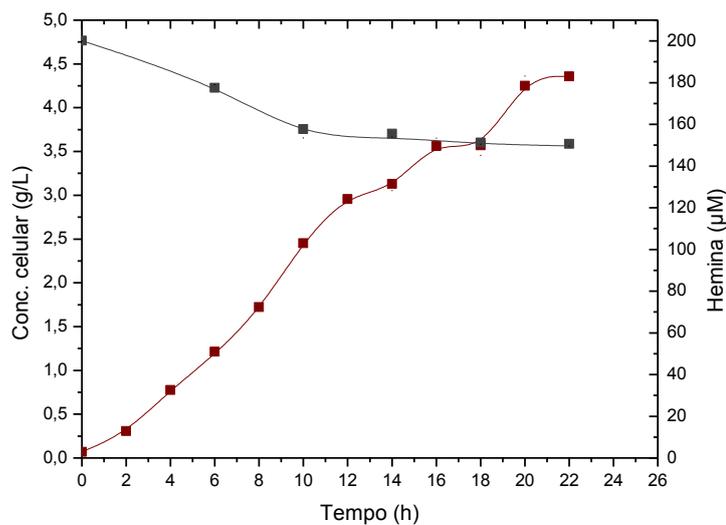


Figura 13 - Concentração de células (■) e hemina (■), em função do tempo, no cultivo de *P. putida* em meio MC_{200He}.

Na Figura 14 são mostrados os perfis de crescimento de *Pantoea sp.* e *C. gleum* no meio MC_{100He}, rerepresentando-se também a cinética obtida em MC. Observou-se que, para ambas as espécies, a evolução do crescimento no meio MC_{100He} ocorreu de modo muito semelhante ao verificado no meio controle. Comparando-se o desempenho das duas espécies no meio com hemina constatam-se valores análogos de X_m (Tabela 5), embora com *Pantoea sp.* o valor de t_{X_m}

(10,6 h) tenha sido 32% menor que o obtido com *C. gleum* ($t_{x_m} = 14$ h), resultando em valor de Q_x (0,54 g/L.h) quase 32% maior. Contrastando-se estes resultados com os obtidos no cultivo de *P. putida* em MC_{100He} , verifica-se que esta espécie apresentou concentração máxima de biomassa duas vezes menor. O valor de t_{x_m} também foi superior (~ 70%) para esta bactéria, especialmente em relação ao cultivo de *Pantoea sp.*, o que implicou em Q_x quase três vezes menor.

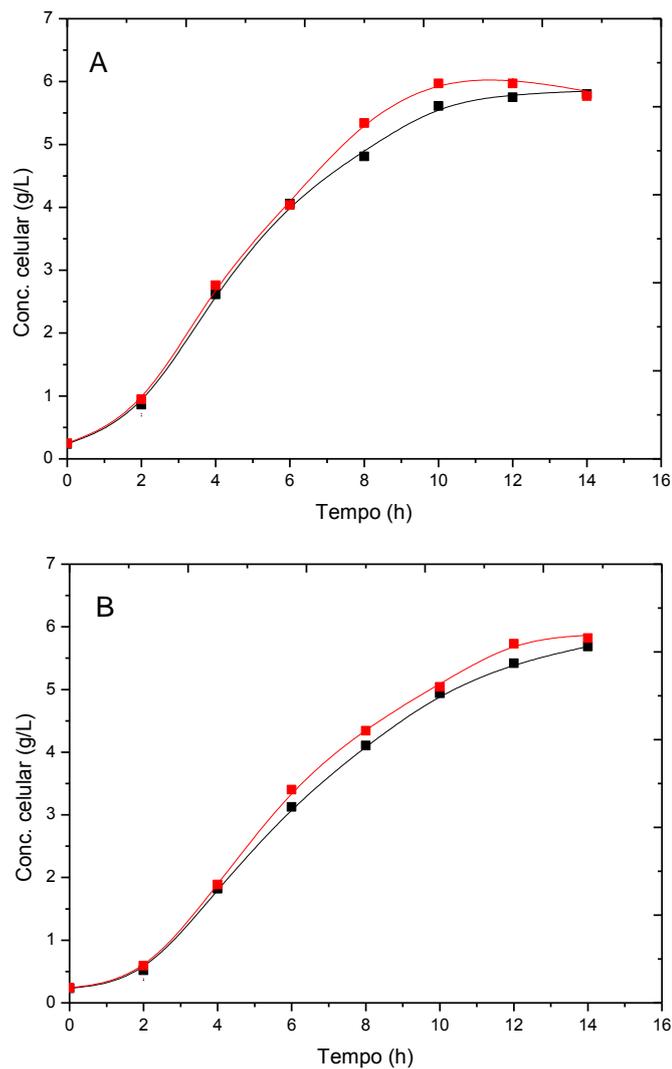


Figura 14 - Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de *Pantoea sp.* (A) e *C. gleum* (B) em meio MC_{100He} (■) e MC (■).

A análise do consumo de hemina durante o cultivo de *Pantoea sp.* e *C. gleum* no meio MC_{100He} , apresentada na Figura 15, mostrou que, para ambas as espécies, a maior parte do composto (70 e 80%, respectivamente) foi consumida no processo.

No entanto, isto não resultou em aumento da produção de biomassa, uma vez que os perfis de crescimento neste meio foram similares aos verificados no meio controle, conforme já destacado.

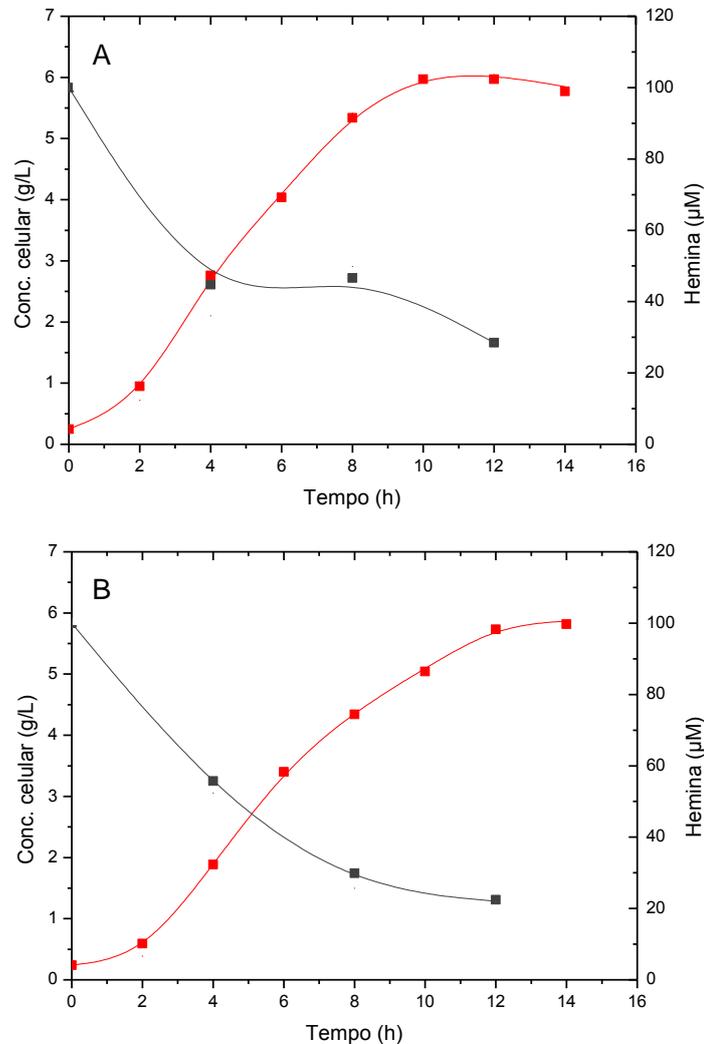


Figura 15 - Concentração de células (■) e hemina (■), em função do tempo, no cultivo de *Pantoea sp.* (A) e *C. gleum* (B) em meio MC_{100He}.

No caso de *P. putida*, os resultados da análise das concentrações de hemina durante o cultivo em MC_{100He} não foram conclusivos e deverão ser posteriormente repetidos. No entanto, ao contrário das demais espécies, a curva de crescimento da bactéria neste meio mostrou aumento das velocidades de crescimento a partir de 8 h (Figura 11) e resultou em maior concentração celular em comparação com MC. A diferença no comportamento foi atribuída à maior disponibilidade de ferro no meio,

aportado pela hemina. Os resultados indicam, portanto, que a captação do metal presente na molécula do composto ocorre de modo distinto nas diferentes espécies estudadas. Ainda que o cultivo de *Pantoea sp.* e *C. gleum* não tenha sido avaliado nos meios com 150 e 200 μM de hemina, a análise conjunta dos resultados indica que o aumento da concentração inicial do composto implica em aumento progressivo de sua concentração residual no meio de fermentação. Com *P. putida*, 75% da hemina permaneceu no meio ao final do processo com $\text{MC}_{200\text{He}}$, diferença importante do observado, por exemplo, em relação ao cultivo de *C. gleum* em $\text{MC}_{100\text{He}}$, cujo residual foi de 20%.

De acordo com Schmitt *et al.* (1993), os danos oxidativos induzidos por heme em membranas fosfolipídicas já são significativos em concentrações na faixa de 50-100 μM , mas em concentrações acima de 100 μM o efeito sobre a permeabilidade da membrana é importante. Nossos resultados evidenciam que as espécies bacterianas avaliadas não parecem ter sido afetadas pelo estresse oxidativo provocado pelo heme nas concentrações usadas.

A maioria das bactérias não é capaz de crescer em meios contendo heme como única fonte de ferro. Porém, algumas espécies estabeleceram estratégias para a captura, importação e gestão da toxicidade de heme, sobretudo bactérias patogênicas para humanos (Cornelissen e Sparling, 1994; Mayfield *et al.*, 2011). A participação de proteínas é requerida para absorção e o transporte de heme através das membranas bacterianas e uma variedade de receptores de membrana, específicos para ligação de hemeproteínas e heme, foram desenvolvidos. Após este reconhecimento seletivo na superfície da célula bacteriana, heme é transportado através da membrana externa em um processo dependente de TonB. O controle da expressão do receptor parece ser multifatorial, provavelmente envolvendo uma série de reguladores globais (Lee, 1995).

Staphylococcus aureus requer ferro para o crescimento e utiliza heme como fonte de ferro durante a infecção. Proteínas de superfície capturam hemoglobina, liberam heme da molécula e transportam este composto através da parede celular e da membrana plasmática para o citoplasma. Proteínas citoplasmáticas (IsdG e IsdI) com propriedade de ligar heme, clivando o anel tetrapirrólico e liberando ferro. Cultivo em meio contendo heme mostrou significativo aumento do crescimento da bactéria (Skaar *et al.*, 2004). Wyckoff *et al.* (2005) compararam o crescimento de um mutante de *Shigella dysenteriae* defectivo para utilização de heme como fonte de

ferro com o da cepa parental em meio sólido contendo diferentes concentrações de heme. Em baixas concentrações (5 μM), o mutante cresceu lentamente, enquanto em concentrações intermédias (25 μM), o crescimento foi moderadamente prejudicado, mas a estirpe parental cresceu muito bem. Em concentrações elevadas de heme (40 μM) não houve crescimento do mutante, mas sim da estirpe selvagem. Em cultivo de *Shigella dysenteriae* em meio líquido, sob agitação, contendo 5, 10 e 15 μM de heme como única fonte de ferro, observou-se aumento de quatro vezes na densidade celular, independentemente da concentração de heme empregada (Wyckoff *et al.*, 2005).

Na busca de evidenciar eventuais diferenças entre os perfis de crescimento em meios contendo heme e aqueles suplementados com sais de ferro, foi feita uma análise da cinética de crescimento das três espécies nos meios $\text{MC}_{100\text{He}}$ e MC_{SF} (Figura 16), que apresentam concentrações equivalentes de ferro. Este último foi escolhido aleatoriamente para a comparação, uma vez que as cinéticas de crescimento foram semelhantes às verificadas em MC_{CF} . Observou-se que, em todos os casos, o crescimento celular foi favorecido nos meios formulados com a fonte inorgânica de ferro, embora o aumento em X_m tenha variado com a espécie bacteriana. A maior diferença foi observada no cultivo de *P. putida*, no qual a produção de biomassa obtida no meio MC_{SF} ($X_m = 4,0 \text{ g/L}$) foi 48% maior que a obtida em $\text{MC}_{100\text{He}}$ ($X_m = 2,7 \text{ g/L}$). A diferença, no caso de *Pantoea sp.* e *C. gleum*, foi de 12 e 24,6%, respectivamente. Por outro lado, plotando-se os resultados obtidos para *P. putida* nos meios com maiores concentrações de heme ($\text{MC}_{150\text{He}}$ e $\text{MC}_{200\text{He}}$) e em MC_{SF} (Figura 17), observa-se que, apesar de variações nos perfis cinéticos ao longo do cultivo, as máximas concentrações celulares obtidas nos meios com 150 e 200 μM de heme foram similares à alcançada no meio com sulfato ferroso, que apresenta muito menos ferro solúvel. O resultado sugere, mais uma vez, que a cepa de *P. putida* usada neste trabalho é capaz de armazenar ferro para posterior utilização no crescimento. Conforme pode ser constatado nas Figuras 12 e 13, cerca de 56 e 58% da concentração total de biomassa foi produzida pela bactéria no período de maior consumo de heme em $\text{MC}_{150\text{He}}$ e $\text{MC}_{200\text{He}}$, respectivamente. Isto significa que, aparentemente, as reservas internas de ferro foram responsáveis por uma parcela importante do total de células produzida, em ambos os meios.

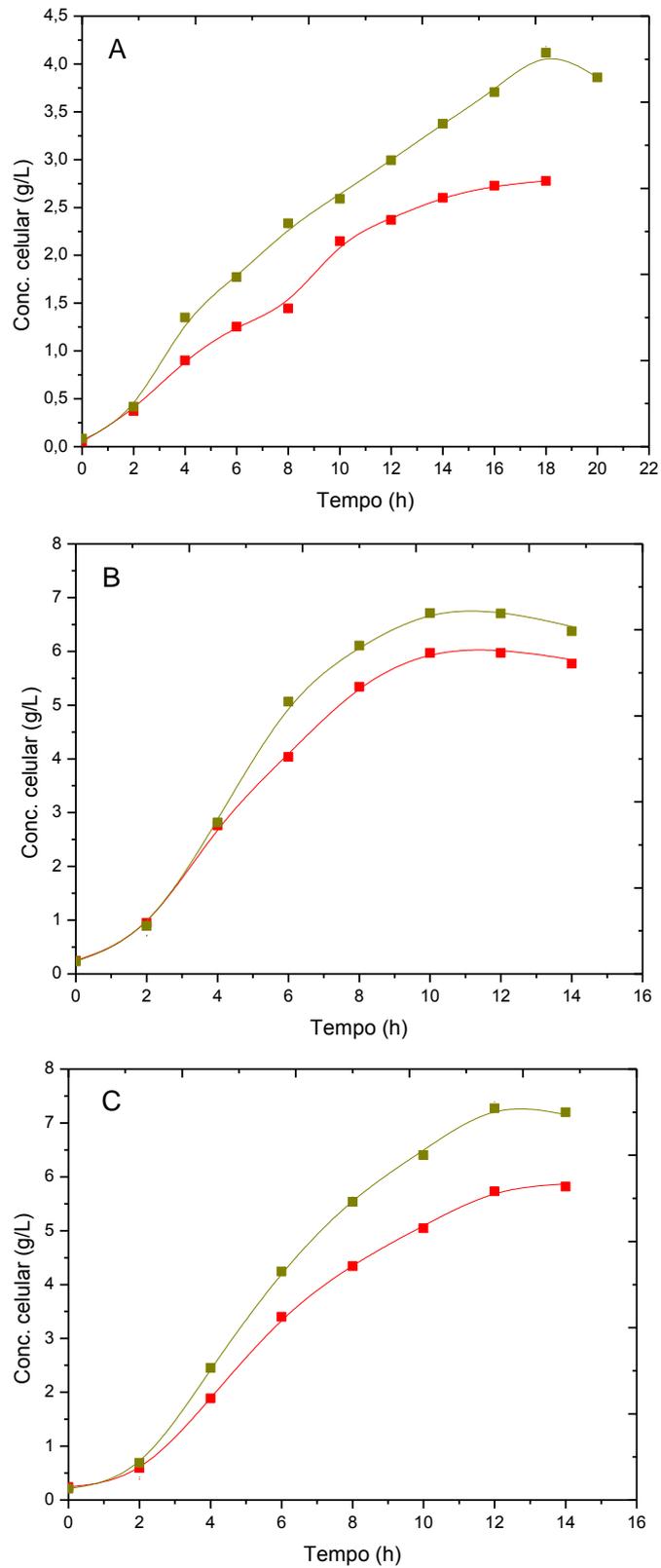


Figura 16 - Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de *P. putida* (A), *Pantoea* sp. (B) e *C. gleum* (C) nos meios MC₁₀₀He (■) e MC_{SF} (■).

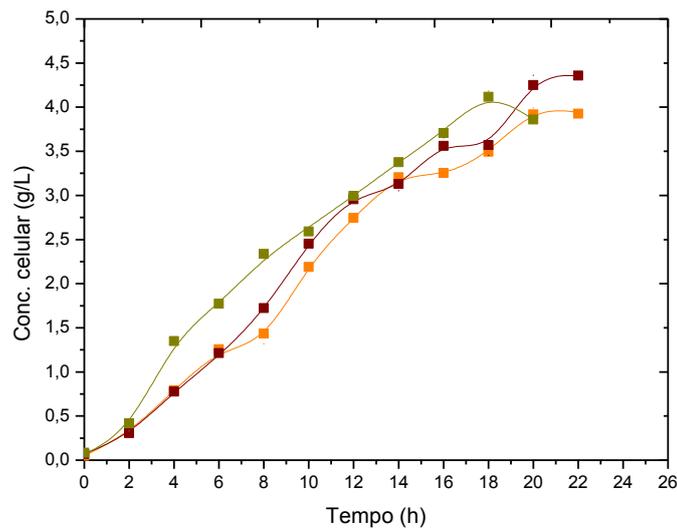


Figura 17 - Concentração de células, em função do tempo, no cultivo de *P. putida* nos meios MC_{150He} (■), MC_{200He} (■) e MC_{SF} (■).

Em resumo, é possível afirmar que *P. putida* não é inibida por concentrações de heme de até 200 μM . Para *Pantoea sp.* e *C. gleum*, a concentração de 100 μM também não foi inibitória, mas, por outro lado, não estimulou o crescimento além do observado em MC. Em relação às fontes de ferro, o melhor desempenho foi verificado na presença de sais de ferro, quando em concentração equivalente àquela presente em 100 μM de heme. Porém, para *P. putida*, a produção de biomassa em meios com ferro inorgânico é equivalente à obtida no meio com 200 μM de heme, que tem o dobro da concentração de ferro.

O ambiente de cultivo artificial aqui testado para avaliar a resposta das espécies bacterianas na presença de heme é muito distinto daquele do intestino médio do mosquito durante a digestão de sangue. Da mesma forma, o desempenho de cada uma foi testado separadamente, enquanto, no mosquito, estas bactérias compõem uma comunidade diversificada e dinâmica. Além disso, não se sabe o grau de representatividade das três espécies em relação à microbiota como um todo. Porém, ainda que com essas ressalvas, os resultados obtidos, na medida em que comprovam a capacidade de todas elas de consumir heme, sugerem a possibilidade de sua participação como coadjuvantes na detoxificação de heme durante a digestão sanguínea. As concentrações de heme internalizadas pelas espécies no presente trabalho são equivalentes às utilizadas por bactérias patogênicas, que apresentam mecanismos eficientes para esta finalidade.

4.3. Perfil proteico e atividade peroxidásica de biomassa bacteriana obtida em cultivos com ferro e hemina

As bactérias intestinais de mosquitos precisam se adaptar ao metabolismo de seus hospedeiros para utilizar o sangue como fonte nutricional para a sua multiplicação. De acordo com Gusmão *et al.* (2010), esses micro-organismos colonizam o epitélio intestinal de *Ae. aegypti* durante a digestão do sangue, no qual a microbiota pode induzir a expressão de proteínas envolvidas no processo digestivo do sangue. Neste contexto, foi utilizada a técnica de eletroforese unidimensional para verificar possíveis diferenças no perfil proteico das espécies estudadas, quando cultivadas em meio de cultura rico em nutrientes.

A Figura 18 apresenta os perfis proteicos obtidos para *P. putida sp.* e *C. gleum*, respectivamente, quando cultivadas nos meios MC, MC_{100He}, MC_{200Bp}, MC_{300Bp}, MC_{CL} e MC_{SF}. Verificaram-se perfis proteicos similares em todos os tratamentos, ressaltando-se a presença de duas bandas (~ 35 kD) nos meios com sais de ferro, não observadas nas demais condições, no caso da espécie *P. putida* (Fig. 18A).

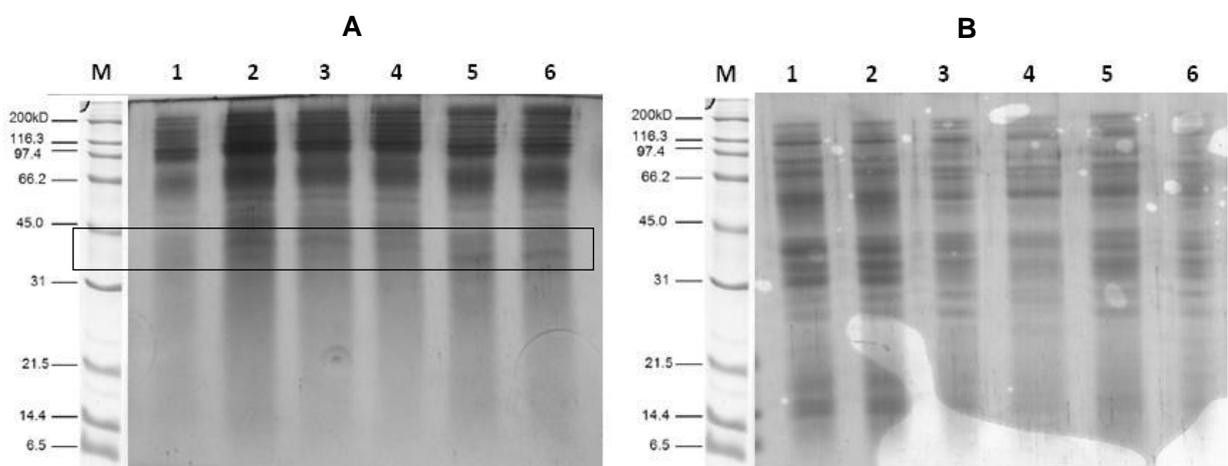


Figura 18 - Perfil proteico de *P. putida* (A), no tempo de 10 h, e de *C. gleum* (B), no tempo de 8 h, cultivadas nos meios: MC (raia 1), MC_{100He} (2), MC_{200Bp} (raia 3), MC_{300Bp} (raia 4), MC_{CL} (raia 5) e MC_{SF} (raia 6). Marcador molecular (M). Foram utilizadas 15 µg de proteína por raia.

Com *Pantoea sp.* não foi verificada diferença entre o controle e o meio com hemina (Figura 19). Porém, foi possível observar a expressão diferencial em alguns casos. As diferenças mais visíveis estão na faixa de massa molecular apontada na marcação. O resultado obtido em meio com 200 µM de quelante não será

considerado na análise, pois não é confiável. Constatou-se uma banda de ~ 66,2 kD mais visível no meio MC_{300Bp} em comparação com os demais meios. Por outro lado, verificou-se uma banda de ~ 60 kD em todos os meios, à exceção do meio com 300 µM de quelante. Outra proteína de menor massa molecular (~ 25 kD) ficou evidente no meio formulado com cloreto férrico (MC_{CL}), pouco pronunciada no meio com hemina (MC_{100He}) e ausente no meio com sulfato ferroso (MC_{SF}). Esses resultados parecem indicar que as diferentes fontes de ferro ativam diferentes genes na bactéria e configuram mecanismos distintos de captação do metal.

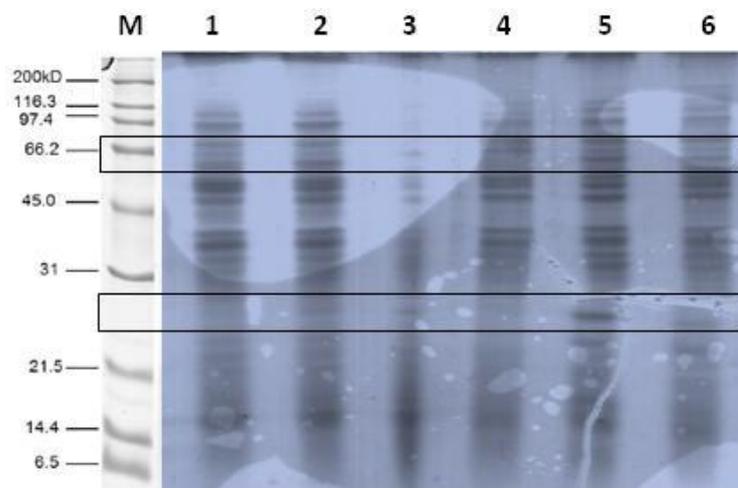


Figura 19 - Perfil proteico de *Pantoea sp.* no tempo de 8 h cultivada nos meios: MC (raia 1), MC_{100He} (2), MC_{200Bp} (raia 3), MC_{300Bp} (raia 4), MC_{CL} (raia 5) e MC_{SF} (raia 6). Marcador molecular (M). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia.

Para verificar se hemina seria capaz de induzir/aumentar a expressão de heme-proteínas nos isolados bacterianos, foi avaliada a atividade peroxidásica em gel de poliacrilamida. Estas proteínas seriam proteínas especializadas para a mobilização de heme e para manter os reservatórios intracelulares deste composto (Anzaldi e Skaar, 2010). A análise foi feita em amostras obtidas em diferentes tempos de fermentação, para as três espécies, não tendo sido observada atividade peroxidásica em nenhuma delas. O resultado contrasta com os obtidos nos ensaios de fermentação, uma vez que, conforme discutido no item 4.2, as três espécies bacterianas foram capazes de utilizar heme durante o crescimento.

4. CONCLUSÕES

- As três espécies bacterianas estudadas (*Pseudomonas putida*, *Pantoea sp.* e *Chryseobacterium gleum*) utilizam ferro para o crescimento, mas o efeito do metal sobre a produção de biomassa varia com a espécie. O impacto mais contundente da sua escassez foi observado no cultivo de *C. gleum*, que mostrou significativa diminuição da concentração celular final. Por outro lado, a suplementação do meio com ferro, independentemente do sal empregado, estimulou a produção de biomassa, com destaque para *P. putida*, em que o aumento da concentração celular foi expressivamente maior que o das demais.
- As três espécies demonstraram capacidade de internalizar e metabolizar hemina para o crescimento. Com *P. putida*, o consumo do composto diminuiu progressivamente com o aumento de sua concentração inicial no meio. Para a bactéria, concentrações de até 200 µM não foram inibitórias, mas, ao contrário, favoreceram amplamente a produção de células. *Pantoea sp.* e *C. gleum* consumiram a maior parte da hemina presente em meios com 100 µM do composto, mas a produção de biomassa não foi incrementada.
- Em comparação aos meios formulados com 100 µM de hemina, os meios compostos com sulfato ferroso e cloreto férrico, que contém a mesma concentração de ferro do primeiro, favoreceram o crescimento celular, especialmente de *P. putida*. No entanto, com concentrações mais altas de hemina (150 e 200 µM), esta espécie produz concentrações celulares similares às obtidas nos meios com menor concentração de ferro;
- A análise do perfil de proteínas apontou algumas diferenças na expressão em alguns meios, notadamente aqueles com quelante de ferro e com ferro III, o que também variou com a espécie. Não foi observada atividade peroxidásica em nenhuma das espécies nas condições testadas.
- Em conjunto, os resultados obtidos demonstraram que as três espécies bacterianas são capazes de consumir heme, em concentrações elevadas, indicando sua habilidade para participar do processo de detoxificação de heme durante a digestão de sangue em fêmeas de *Ae. aegypti*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, C.; Kukutla, P.; Jiang, J.; Yu, W.; Xu, J. Draft genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain Ag1, isolated from the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Bacteriology*, v.194, n.19, p.5449-5449, 2012.
- Andrews, E.S.; Crain, P.R.; Fu, Y.; Howe, D.K.; Dobson, S.L. Reactive oxygen species production and *Brugia pahangi* survivorship in *Aedes polynesiensis* with artificial *Wolbachia* infection types. *PLoS pathogens* 8, n.12, e1003075, 2012.
- Andrews, S.C.; Robinson, A.K.; Rodriguez-Quiñones, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, v.27, p.215-237, 2003.
- Anzaldi, L.L.; Skaar, E.P. Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infection and Immunity*, v.78, n.12, p.4977-4989, 2010.
- Beier, M.S.; Pumpuni, C.B.; Beier, J.C.; Davis, J.R. Effects of para-aminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in Anopheline mosquitos (Diptera, Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v.31, p.561-565, 1994.
- Berbert-Molina, M.A. Estudo da influência do suprimento de oxigênio e da concentração de glicose sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IPS 82 em regime descontínuo. 1998. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo. Brasil. 1998.
- Bian, G.; Xu, Y.; Lu, P.; Xie, Y.; Xi, Z. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens* 6, e1000833, 2010.
- Billingsley, P.F.; Lehane, M.J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Lehane, M.J., Billingsley, P.F., *Biology of the insect midgut*. 1ª edição. Londres: Chapman & Hall, p.86-114, 1996.
- Boissière, A.; Tchioffo, M.T.; Bachar, D.; Abate, L.; Marie, A.; Nsango, S.E.; Shahbazkia, H.R.; Awono-Ambene, P.H.; Levashina, E.A.; Christen, R.; Morlais, I. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogens* 8, e1002742, 2012.
- Buck, M.; Nilsson, L.K.; Brunius, C.; Dabire, R.K.; Hopkins, R.; Terenius, O. Bacterial associations reveal spatial population dynamics in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Scientific Reports*, v.6, p.22806, 2016.
- Butler, D. Microcephaly surge in doubt. *Nature*, v.530, p.13-14, 2016.
- Cabaj, A.; Kosakowska, A. Iron-dependent growth of and siderophore production by two heterotrophic bacteria isolated from brackish water of the southern Baltic Sea. *Microbiological Research*, v.164, n.5, p.570-577, 2009.
- Champion, C.J.; Xu, J. The impact of metagenomic interplay on the mosquito redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, v.105, p.79-85, 2017.

Chandel, K.; Mendki, M.J.; Parikh, R.Y.; Kulkarni, G.; Tikar, S.N.; Sukumaran, D.; Prakash, S.; Parashar, B.D.; Shouche, Y.S.; Veer, V. Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. *PLoS One* 8, e80453, 2013.

Chaves, G.A.T. Captação de ferro e efeito desse metal para crescimento e morfologia de *Xylella fastidiosa*. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo – USP, 2013

Chu, B.C.; Garcia-Herrero, A.; Johanson, T.H; Krewulak, K.D.; Lau, C.K.; Peacock, R.S.; Slavinskaya, Z.; Vogel, H.J. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals*, v.23, p.601–611, 2010.

Colman, D.R.; Toolson, E.C.; Takacs-Vesbach, C.D. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Molecular Ecology*, v:21, p.5124-5137, 2012.

Consoli, R.A.G.B.; Lourenço-de-Oliveira, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 2ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, 226p, 1994.

Cornelissen, C.N.; Sparling, P.F. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*, v.14, n.5, p.843-850, 1994.

Dansa-Petretski, M.; Ribeiro, J.M.; Atella, G.C.; Masuda, H.; Oliveira, P.L. Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.10893–10896, 1995.

Dillon, R.J.; Dillon, V.M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, v.49, p.71-92, 2004.

Douglas, A.E. The molecular basis of bacterial-insect symbiosis. *Journal of Molecular Biology*, v.426, n.23, p.3830-3837, 2014.

Engel, P.; Moran, N.A. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, v.37, p.699-735, 2013.

Esper, P.M. Disponível em: <<http://paulomarcio.deviantart.com/art/Aedes-aegypti-2617160162011>>. Acesso em: 25 jan 2016.

Fawazy, G.K.; Khalid, A.E.; Khalid, A.S.; Essam, I.A. Bioremediation Of Heavy Metals By *Pseudomonas Putida* Isolated From Groundwater In Egypt. *International Journal of Scientific & Technology Research*, v.5, n.07, p.71-75, 2016.

Foyer, C.H.; Noctor, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia plantarum*, v.119, p.355-364, 2003.

Gaio, A. O. Estudo da microbiota intestinal de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e sua contribuição para a digestão de sangue. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia)- Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, p.99, 2011b.

Gaio, A.D.; Gusmão, D.S.; Santos, A.V.; Berbert-Molina, M.A.; Pimenta, P.F.P.; Lemos, F.J.A. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasites & Vectors*, v.4, p.105, 2011a.

Gubler, D.J.; Ooi, E.E.; Vasudevan, S.; Farrar, J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. 2ª edição. London: CABI, 606p, 2014.

Gusmão, D.S.; Santos, A.V.; Marini, D.C.; Bacci, M.; Berbert-Molina, M.A.; Lemos, F.J.A. Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Tropica*, v.115, p.275-281, 2010.

Gusmão, D.S.; Santos, A.V.; Marini, D.C.; Russo, E.D.; Peixoto, A.M.D.; Bacci, M.; Berbert-Molina, M.A.; Lemos, F.J.A. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.102, p.919-924, 2007.

Gutteridge J.M.; Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem stimulated lipid peroxidation. *Biochemical Journal*, v.256, n.3, p.861-865, 1988.

Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v.141, p.312–322, 2006.

Harbach, R. Family Culicidae Meigen, 1818. In: Mosquito Taxonomic Inventory. Disponível em: <<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/family-culicidae-meigen-1818>>. Acesso em: 20 dez 2017.

Hine, R. M.; Rouhier, M. F.; Park, S. T.; Qi, Z.; Piermarini, P. M.; Beyenbach, K. W. The excretion of NaCl and KCl loads in mosquitoes. 1. Control data. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.307, n.7, p.R837-R849, 2014.

Hughes, G.L.; Raygoza Garay, J.A.; Koundal, V.; Rasgon, J.L.; Mwangi, M.M. Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* strain SmAs1, isolated from the Asian malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Genome Announcements*, v.4, n.2, e00086-16, 2016a.

Hughes, G.L.; Raygoza Garay, J.A.; Koundal, V.; Rasgon, J.L.; Mwangi, M.M. Genome sequences of *Staphylococcus hominis* strains ShAs1, ShAs2, and ShAs3, isolated from the Asian malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Genome Announcements*, v.4, n.2, e0008516, 2016b.

Huy, N.T.; Trang, D.T.X., Uyen, D.T., Sasai, M.; Harada, S.; Kamei, K. An improved colorimetric method for quantitation of heme using tetramethylbenzidine as substrate. *Analytical Biochemistry*, v.344, p.289–291, 2005.

Idei, A.; Kawai, E.; Akatsuka, H.; Omori, K. Cloning and characterization of the *Pseudomonas fluorescens* ATP-Binding cassette exporter, HasDEF, for the Heme acquisition protein HasA. *Journal of Bacteriology*, v.181, p.7545-7551, 1999.

Jiang, J.; Alvarez, C.; Kukutla, P.; Yu, W.; Xu, J. Draft genome sequences of *Enterobacter* sp. isolate Ag1 from the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Bacteriology*, v.194, n.19, p.5481-5481, 2012.

Jupatanakul, N.; Sim, S.; Dimopoulos, G. The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*, n.6, p.4294-4313, 2014.

- Klowden, M.J. *Physiological Systems in Insects*. Londres: Academic Press. 3rd ed., 2013.
- Köster, W. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology*, v.152, p.291–301, 2001.
- Kukutla, P.; Lindberg, B.G.; Pei, D.; Rayl, M.; Yu, W.; Steritz, M.; Faye, I.; Xu, J. Draft genome sequences of *Elizabethkingia anophelis* strains R26T and Ag1 from the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Genome Announcements*, v.1, n.6, 2013.
- Kumar, S.; Christophides, G.K.; Cantera, R.; Charles, B.; Han, Y.S.; Meister, S.; Dimopoulos, G.; Kafatos, F.C.; Barillas-Mury, C. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.100, n.24, p.14139-14144, 2003.
- Lee, B.C. Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Molecular Microbiology*, v.18, n.3, p.383-390, 1995.
- Lehane, M.J.. *The Biology of Blood-Sucking in Insects*. 2ª edição. Cambridge: University Press, 2005.
- Lehane, M.J.; Wu, D.; Lehane, S.M. Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.94, p.11502–11507, 1997.
- Létoffé, S.; Ghigo, J.M.; Wandersman, C. Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proceedings of National Academy of Science*, v.91, p.9876-9880, 1994.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. v.193, p.265-275, 1951.
- Mayfield, J.A.; Dehner, C.A.; DuBois, J.L. Recent advances in bacterial heme protein biochemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.15, p.260–266, 2011.
- Minard, G.; Mavingui, P.; Moro, C.V. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors*, v.6, p.146, 2013a.
- Minard, G.; Tran, F.H.; Raharimalala, F.N.; Hellard, E.; Ravelonandro, P., Mavingui, P.; Valiente, M.C. Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS Microbiology Ecology*, v.83, p.63–73, 2013b.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Febre pelo vírus Zika: uma revisão narrativa sobre a doença. *Boletim Epidemiológico*, v.46, n.26, p.1-7. Disponível em <www.saude.gov.br>, 2015. Acessado em: 07 nov 2015.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45, 2017. *Boletim Epidemiológico*, v.48, n.38, p.1-13. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>.. Acessado em: 20 dez 2017.

Moro, C.V.; Tran, F.H.; Raharimalala, F.N.; Ravelonandro, P.; Mavingui, P. Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiology*, v.13, p.70, 2013.

Mota, G.P. Efeito de diferentes concentrações de heme sobre o crescimento de bactérias isoladas do intestino médio de *Aedes aegypti*. Monografia – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 2016.

Mourya, D.T.; Thakare, J.P.; Gokhale M.D.; Powers A.M.; Hundekar, S.L.; Jayakumar, P.C.; Bondre, V.P.; Shouche, Y.S.; Padbidri, V.S. Isolation of chikungunya virus from *Aedes aegypti* mosquitoes collected in the town of Yawat, Pune District, Maharashtra State, India. *Acta Virologica*, v.45, n.5-6, p.305-309, 2001.

Mousson, L.; Zouache, K.; Arias-Goeta, C.; Raquin, V.; Mavingui, P.; Failloux, A.-B. The native *Wolbachia* symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6, e1989, 2012.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. Lehninger, Principles of Biochemistry. 4a edição. New York: Worth Publishers, 1100p, 2004.

Osei-Poku, J.; Mbogo, C.M.; Palmer, W.J.; Jiggins, F.M. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Molecular Ecology*, v.21, p.5138–5150, 2012.

Ostrosky, E.A.; Mizumoto, M.K.; Lima, M.E.L.; Kaneko, T.M.; Nishikawa, S.O.; Freitas, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

Pascoa, V.; Oliveira, P.L.; Dansa-Ptretski, M.; SILVA, J.R.; Alvarenga, P.H.; Jacobs-Lorena, M.; Lemos, F.J.A. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.32, p.517-523, 2002.

Pei, D.; Hill-Clemons, C.; Carissimo, G.; Yu, W.; Vernick, K.D.; Xu, J. Draft genome sequences of two strains of *Serratia spp.* from the midgut of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Genome Announcements*, v.3, n.2, e00090-15, 2015.

Phillips, J.E.; Hanrahan, J.; Chamberlin, M.; Thomson B. Mechanisms and Control of Reabsorption in Insect Hindgut. In: *Advances in Insect Physiology*. Londres: Academic Press Inc., v.19, p.329-422, 1986.

Ramirez, J.L.; Short, S.M.; Bahia, A.C.; Saraiva, R.G.; Dong, Y.; Kang, S.; Tropathi, A.; Mlambo, G.; Dimopoulos, G. *Chromobacterium Csp_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and *in vitro* anti-pathogen activities. *PLOS Pathogens* 10, e1004398, 2014.

Ramirez, J.L.; Souza-Neto, J.; Torres Cosme, R.; Rovira, J.; Ortiz, A.; Pascale, J.M.; Dimopoulos, G. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6, e156, 2012.

- Raygoza Garay, J.A.; Hughes, G.L.; Koundal, V.; Rasgon, J.L.; Mwangi, M.M. Genome Sequence of *Elizabethkingia anophelis* strain EaAs1, isolated from the Asian malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Genome Announcements*, v.4, n.2, e00084-16, 2016.
- Ricci, I.; Damiani, C.; Rossi, P.; Capone, A.; Scuppa, P.; Cappelli, A.; Ulissi, U.; Mosca, M.; Valzano, M.; Epis, S. Mosquito symbioses: From basic research to the paratransgenic control of mosquito-borne diseases. *Journal of Applied Entomology*, v.135, p.487–493, 2011.
- Rodrigues, R.C.C. Isolamento e caracterização parcial da microbiota intestinal do mosquito *Aedes aegypti* mantido em condições estéreis. Monografia – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, p.67, 2008.
- Romoser, W.S. The vector alimentary system. In: Beaty, B.J.; Marquardt, W.C. *The Biology of Disease Vectors*. 1ª edição. Colorado:Colorado University, p.298-317, 1996.
- Rose, M.Y.; Thompson, R.A.; Light, W.R.; Olson, J.S. Heme transfer between phospholipid membranes and uptake by apohemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry*, v.260, n.11, p.6632-6640, 1985.
- Rossi, M.S.; Fetherston, J.D.; Létoffé, S.; Carniel, E.; Perry, R.D., Ghigo, J.M. Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*. *Infection Immunity*, v.69, p.6707-6717, 2001.
- Ryter, S.W.; Tyrrell, R.M. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity. heme oxygenase has both proand antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, v.28, n.2, p.289–309, 2000.
- Sadrzadeh, S.M.; Graf, E.; Panter, S.S.; Hallaway, P.E.; Eaton, J.W. Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.259, n.23, p.14354-14356, 1984.
- Schlein, Y.; Polacheck, I.; Yuval, B. Mycoses, bacterial-infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of Leishmaniasis. *Parasitology*, v.90, p.57-66, 1985.
- Schmitt, T.H.; Frezzatti Jr.; W.A.; Schereier, S. Heme-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cells lysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.307, p.96-103, 1993.
- Scott, T.W.; Takken, W. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends in Parasitology*, v.28, n.3, p.114-121, 2012.
- Shigenobu, S.; Watanabe, H.; Hattori, M.; Sakaki, Y.; Ishikawa, H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera sp.* APS. *Nature*, v.407, n.6800, p.81-86, 2000.
- Silva, C.P.; Lemos, F.J.A.; Silva, J.R. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. In: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular,

2012. Disponível em: <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1>>. Acesso em: 06 jan 2016.
- Silva-Stenico, M.E.; Pacheco, F.T.H.; Rodrigues, J.L.M.; Carrilho, E.; Tsai, S.M.. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiological Research*, v.160, n.4, p.429-436, 2005.
- Skaar, E.P.; Gaspar, A.H.; Schneewind, O. IsdG and IsdI, Heme-degrading Enzymes in the Cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.279, n.1, p.436–443, 2004.
- Terenius, O.; Lindh, J.M.; Eriksson-Gonzales, K.; Bussi re, L.; Laugen, A.T.; Bergquist, H.; Titanji, K.; Faye, I. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiology Ecology*, v.80, p.556–565, 2012.
- Terra, W.R. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*, v.35, n.1, p.181-200, 1990.
- Thiery, I.; Nicolas, L.; Rippka, R.; Tandeau de Marsac, N. Selection of cyanobacteria isolated from mosquito breeding sites as a potential food source for mosquito larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, p.1354–1359, 1991.
- Tong, Y.; Guo, M. Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, v.481, p.1-15, 2009.
- Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M.; Scoullou, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.64, n.2, p.178-189, 2006.
- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v.160, n.1, p.1-40, 2006.
- Vasil, M.L.; Ochsner, U.A. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Molecular Microbiology*, v.34, p.399–413, 1999.
- Wandersman, C.; Depeleire, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review in Microbiology*, v.58, p. 611-647, 2004.
- Wandersman, C; Stojiljkovic, I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current Opinion in Microbiology*, v.3, p.215–220, 2000.
- Wang, Y.; Gilbreath, T.M.; Kukutla, P.; Yan, G.; Xu, J. Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS One* 6, e24767, 2011.
- Weiss, B.L.; Savage, A.F.; Griffith, B.C.; Wu, Y.; Aksoy, S. The peritrophic matrix mediates differential infection outcomes in the tsetse fly gut following challenge with commensal, pathogenic, and parasitic microbes. *The Journal of Immunology*, v.193, n.2, p.773-782, 2014.

Wyckoff, E.E.; Lopreato, G.F.; Tipton, K.A.; Payne, S.M. *Shigella dysenteriae* ShuS promotes utilization of heme as an iron source and protects against heme toxicity. *Journal of Bacteriology*, v.187, n.16, p. 5658-5664, 2005.

Xi, Z.; Ramirez, J.L.; Dimopoulos, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLOS Pathogens* 4, e1000098, 2008.

Yassin, A.F. *Rhodococcus triatomae* sp. nov., isolated from a blood-sucking bug. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.55, n.4, p.1575-1579, 2005.