

**ESTUDO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE HEME POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DO INTESTINO MÉDIO DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

SÂMELLA DA HORA MACHADO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO – 2013

**ESTUDO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE HEME POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DO INTESTINO MÉDIO DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

SÂMELLA DA HORA MACHADO

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO - 2013

ESTUDO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE HEME POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO INTESTINO MÉDIO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

SÂMELLA DA HORA MACHADO

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

Aprovada em 28 de agosto de 2013.

Comissão Examinadora:

Dr. José Roberto da Silva (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UFRJ/Macaé

Dra. Desiely Silva Gusmão (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – IFF/Campos

Dra. Aline Chaves Intorne (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – UENF

Dr. Francisco José Alves Lemos (Doutor em Bioquímica) - UENF
(Orientador)

*Dedico esta conquista ao meu Pai José Carlos Machado
(in memoriam), pelo amor e exemplo de vida que me deste, por
nunca ter poupado esforço para que meus sonhos se realizassem.*

*“A vida pode ser comparada a um campo de batalhas, uma vez que boa parte de
nossas conquistas são resultados de muitas lutas.” (Dulce Consuelo Purin)*

Meus agradecimentos...

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças para o término deste trabalho, por estar ao meu lado em todos os momentos, por ter me concedido forças para trilhar este caminho e completá-lo com êxito.

Aos meus pais, José Carlos (*in memoriam*) e Edenir, pelo exemplo de vida e por nunca poupar esforços para realização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos e irmãs, por todo apoio e carinho e por todas as palavras de apoio e encorajamento vindo de cada um.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas, pelo amor, carinho, gargalhadas e por me darem tantos momentos alegres em meio a tantos momentos de tensão.

Ao meu namorado Rodrigo, meu grande amigo, presente de Deus pra mim. Obrigado pela compreensão e dedicação, amor e carinho. Obrigado por acreditar em mim, mesmo naqueles momentos que eu mesma desacreditava.

As minhas pastoras, Érica e Marta e a minha amada Igreja, Comunidade Evangélica Cura, obrigado pelas orações e preocupações comigo em todo o tempo, tenho certeza que esta dissertação é fruto da oração de cada um de vocês.

Ao Prof. Franzé, por confiar a mim este trabalho, obrigado pela paciência e pelos ensinamentos.

A Rívea, muito obrigado pela grande ajuda nos experimentos de microscopia, e companhia nos congressos.

A Analiz por aceitar revisar este trabalho.

Aos professores José Roberto Silva, Desiely Gusmão, Aline Intorne, por dedicarem o seu tempo na avaliação deste trabalho.

As companhias de laboratório, Geise, Josi e Juliani, obrigado pelas preocupações e pela ajuda nesse tempo.

As minhas grandes amigas Laís e Milena, pelo companheirismo. Com vocês eu pude compartilhar alegrias e tristezas e sei que posso contar com vocês sempre.

Ao Prof. André de Oliveira Carvalho pelo auxílio no uso do microscópio.

A Juliana Santos pela ajuda com o leitor de placas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho e deste sonho, o meu muito obrigada.

Sumário

Índice de figuras e tabelas.....	x
Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1. Introdução	1
1.1. <i>Aedes aegypti</i>	1
1.2. Principais doenças transmitidas pelo mosquito <i>Ae. aegypti</i>	2
1.2.1. Dengue.....	2
1.2.1.1. Transmissão da dengue	7
1.2.2. Febre amarela	9
1.3. Canal alimentar e digestão nos mosquitos	10
1.4. Matriz peritrófica	10
1.5. Heme	11
1.5.1. Captação de heme por bactérias.....	12
1.6. Bactérias utilizadas.....	14
2. Objetivo geral	18
2.1. Objetivos específicos.....	18
3. Metodologia.....	19
3.1. Bactérias utilizadas.....	19
3.2. Esterilização e preparo dos materiais.....	19
3.3. Atividade hemolítica	19
3.4. Atividade hemoglobínica.....	20
3.5. Incorporação de heme.....	20
3.6. Incorporação de ZN-protoporfirina IX.	20
3.7. Análise do perfil proteico	22
3.7.1 Extração das proteínas bacterianas	22

3.7.2. Quantificação protéica.....	22
3.7.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	23
3.8. Atividade peroxidásica em gel de poliacrilamida	23
3.9. Western blotting.....	24
4. Resultados	25
4.1. Atividade hemolítica dos isolados bacterianos	25
4.2. Atividade hemoglobínica.....	27
4.3. Incorporação de heme.....	29
4.4. Microscopia de fluorescência e espectrofluometria	31
4.4.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	31
4.4.2. <i>Burkholderia sp.</i>	33
4.4.3. <i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	35
4.4.4. <i>Enterobacter sp.</i>	37
4.4.5. <i>Herbaspirillum frisingense</i>	39
4.4.6. <i>Pantoea sp.</i>	41
4.4.7. <i>Pseudomonas putida</i>	43
4.4.8. <i>Serratia plymuthica</i>	45
4.4.9. <i>Serratia sp.</i>	47
4.4.10. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 e <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> <i>pqqC</i>	50
4.5. Análise do perfil proteico de bactérias crescidas em meio BHI contendo sangue, hemina e hemoglobina	53
4.5.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	53
4.5.2. <i>Burkholderia sp.</i>	54
4.5.3. <i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	54
4.5.4. <i>Enterobacter sp.</i>	55
4.5.5. <i>Herbaspirillum frisingense</i>	56
4.5.6. <i>Pantoea sp.</i>	57

4.5.7. <i>Pseudomonas putida</i>	58
4.5.8. <i>Serratia plymuthica</i>	59
4.5.9. <i>Serratia sp.</i>	60
4.6. Western blotting.....	61
5. Discussão.....	64
6. Conclusões.....	69
7. Referências bibliográficas	69

Índice de figuras e tabelas

Figura 1. Ciclo de vida do mosquito <i>Ae. aegypti</i>	2
Figura 2. Casos de dengue no Brasil de 2008 a 2012.	4
Figura 3. Casos de dengue na região sudeste de 2008 a 2012.	5
Figura 4. Número de casos de dengue por faixa etária.....	6
Figura 5. Sorotipos de dengue circulantes no Brasil.	7
Figura 6. Distribuição mundial da dengue.	7
Figura 7. Barreiras enfrentadas por um arbovírus durante a infecção de mosquitos ..	8
Figura 8. Distribuição da febre amarela no Brasil.....	10
Figura 9. Estrutura molecular do heme.	11
Figura 10. Curva padrão ZnPPiX.	22
Figura 11. Curva padrão de albumina.	23
Figura 12. Atividade hemolítica dos isolados bacterianos.	26
Figura 13. Atividade hemoglobínica dos isolados bacterianos.	28
Figura 14. Incorporação de heme.	30
Figura 15. Microscopia de fluorescência de <i>Aeromonas hydrophila</i>	32
Figura 16. Espectrofluometria de <i>Aeromonas hydrophila</i> incubada com 30 µM de ZnPPiX.....	33
Figura 17. Microscopia de fluorescência de <i>Burkholderia sp</i>	34
Figura 18. Espectrofluometria de <i>Burkholderia sp</i>	35
Figura 19. Microscopia de fluorescência de <i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	36
Figura 20. Figura 20. Espectrofluometria de <i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	37
Figura 21. Microscopia de fluorescência de <i>Enterobacter sp</i>	38
Figura 22. Espectrofluometria de <i>Enterobacter sp</i>	39
Figura 23. Microscopia de fluorescência de <i>Herbaspirillum frisingense</i>	40
Figura 24. Espectrofluometria de <i>Herbaspirillum frisingense</i>	41
Figura 25. Microscopia de fluorescência de <i>Pantoea sp</i>	42
Figura 26. Espectrofluometria de <i>Pantoea sp</i>	43

Figura 27. Microscopia de fluorescência de <i>Pseudomonas putida</i>	44
Figura 28. Espectrofluometria de <i>Pseudomonas putida</i>	45
Figura 29. Microscopia de fluorescência de <i>Serratia plymuthica</i>	46
Figura 30. Espectrofluometria de <i>S. plymultica</i>	47
Figura 31. Microscopia de fluorescência de <i>Serratia sp.</i>	48
Figura 32. Espectrofluometria de <i>Serratia sp.</i>	49
Figura 33. Captação de ZnPPIX pelos isolados bacterianos.....	49
Figura 34. Microscopia de fluorescência de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5	51
Figura 35. Microscopia de fluorescência de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PqqC.	52
Figura 36. Perfil proteico e atividade peroxidásica de <i>Aeromonas hydrophila</i>	53
Figura 37. Perfil proteico e atividade peroxidásica de <i>Burkholderia sp.</i>	54
Figura 38. Perfil proteico e atividade peroxidásica de <i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	55
Figura 39. Perfil proteico e atividade peroxidásica de <i>Enterobacter sp.</i>	56
Figura 40. Perfil proteico e atividade peroxidásica de <i>Herbaspirillum frisingense</i>	57
Figura 41. Perfil proteico e atividade peroxidásica de <i>Pantoea sp.</i>	58
Figura 42. Perfil proteico e atividade peroxidásica de <i>Pseudomonas putida</i>	59
Figura 43. Perfil proteico e atividade peroxidásica de <i>Serratia plymuthica</i>	60
Figura 44. Perfil proteico e atividade peroxidásica de <i>Serratia sp.</i>	61
Figura 45. Western blotting dos isolados bacterianos.....	63

Tabela 1. Bactérias de intestino médio de *Aedes aegypti* utilizadas neste trabalho. 19

Lista de abreviaturas

°C - Grau Celsius

μL – Microlitros

μm – Micrometro

D.O – Densidade óptica

dNTP - Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

g – Gramas

h – Horas

HCl – Ácido clorídrico

kDa - kilodalton

L – Litros

M – Molar

Min – Minutos

mL - Mililitros

mM – Milimolar

ng – Nanogramas

nm - Nanômetros

pb – Pares de base

pcmol – Picomol

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

rDNA - Ácido desoxibonucleico ribossômico

rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

seg – Segundos

sp. – Espécie não identificada

Tris – Trisaminometano

UV – Ultravioleta

V – Volts

ZnPIX – Zinco protoporfirina

µg – Micrograma

Resumo

O mosquito *Aedes aegypti* ingere uma enorme quantidade de sangue em uma única refeição para obter os nutrientes necessários para a maturação de seus ovos. A digestão proteica no intestino médio deste mosquito ocorre de forma coordenada e envolve, entre outros fenômenos, a lise das hemácias e a hidrólise progressiva da principal proteína do sangue, a hemoglobina. Durante este processo há uma liberação de grande quantidade de heme, o grupo prostético da hemoglobina, para o lúmen intestinal. O heme, na sua forma livre, é tóxico e é capaz de promover a oxidação de biomoléculas tais como ácidos nucléicos, proteínas e lipídios. Grande parte do heme gerado durante a digestão sanguínea, liga-se à matriz peritrófica. Durante o processo digestivo ocorre um crescimento exponencial das bactérias residentes intestinais coincidindo com o aumento da concentração de heme no lúmen intestinal. Este fato nos levou à hipótese de que as bactérias intestinais poderiam ter um papel auxiliar no bloqueio da atividade tóxica do heme. Assim, este trabalho visou analisar a incorporação de heme por bactérias isoladas do mosquito *Ae. aegypti*. Foram utilizadas as seguintes bactérias: *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia* sp., *Chryseobacterium kwangyangense*, *Enterobacter* sp., *Herbaspirillum frisingense*, *Pantoea* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas putida*, e *Serratia plymuthica*. Estas bactérias foram cultivadas em meio de cultura suplementado com três fontes de heme: sangue humano, hemina ou hemoglobina bovina. Como resultado, todas as bactérias foram capazes de incorporar heme do meio adicionado com hemina; seis bactérias incorporaram heme do meio suplementado com sangue e hemoglobina, excetuando-se *Burkholderia* sp., *H. frisingense* e *S. plymuthica*. As mesmas seis bactérias apresentaram atividade hemolítica enquanto que *C. kwangyangense*, *Pantoea* sp e *Serratia* sp possuem a capacidade de hidrolisar a hemoglobina. Verificamos também que todas as bactérias foram capazes incorporar um análogo fluorescente do heme, a zinco-protoporfirina. *P. putida* foi a mais eficiente na incorporação deste composto enquanto que *Serratia* sp. e *Enterobacter* sp. foram as menos eficientes durante os 30 minutos de incubação. Utilizando a técnica SDS-PAGE foi possível observar diferenças sutis na expressão de proteínas em sete das nove bactérias mantidas em meio de cultura com sangue, hemina e hemoglobina. A bactéria *Serratia* sp. foi a que apresentou diferenças mais visíveis nos seus perfis proteicos. Três proteínas foram altamente expressas nos tratamentos com sangue e hemoglobina em relação ao grupo controle, crescido em BHI não suplementado. A indução da expressão de heme-proteínas foi estudada, através da atividade heme-peroxidase em gel de poliacrilamida, sendo possível observar diferenças na expressão destas proteínas na maioria das bactérias com as exceções de *H. frisingense* e *P. putida*. Quatro bactérias se destacaram na expressão de heme-proteínas: *Burkholderia* sp., *C. kwangyangense*, *Pantoea* sp. e *S. plymuthica*. Em conjunto, esses resultados

sugerem que bactérias, presentes no intestino médio de *Ae. aegypti*, podem auxiliar no processo de detoxificação do grupo prostético heme.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, bactérias, heme, ZnPPiX.

Abstract

Aedes aegypti ingests a huge amount of blood in a single meal in order to obtain nutrients for egg maturation. The protein digestion in the mosquito midgut occurs in a coordinated way and involves the lysis of red blood cells and the gradual hydrolysis of the major blood protein, the hemoglobin. During this process, large amounts of heme are released into the midgut lumen. Free heme is toxic and is capable of promoting oxidation of biomolecules such as nucleic acids, proteins and lipids. Most heme, released during the blood digestion, binds to the peritrophic matrix. Also, during the blood digestion, occurs an exponential growth of the midgut bacteria which coincides with increasing concentrations of heme in the midgut lumen. This fact led us to the hypothesis that intestinal bacteria might have an auxiliary role in blocking the toxic activity of heme. Thus, this study aimed to analyze the incorporation of heme by bacteria isolated from *Ae. aegypti*. We used the following bacteria: *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia* sp., *Chryseobacterium kwangyangense*, *Enterobacter* sp., *Herbaspirillum frisingense*, *Pantoea* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas putida* and *Serratia plymuthica*. These bacteria were cultured in medium supplemented with three heme sources: human blood, hemin or bovine hemoglobin. As a result, all bacteria were able to incorporate the heme from medium supplemented with hemin and six bacteria incorporated the heme from medium supplemented with blood and hemoglobin, except *Burkholderia* sp., *H. frisingense* and *S. plymuthica*. The same six bacteria showed hemolytic activity while *C. kwangyangense*, *Pantoea* sp. and *Serratia* sp. possess the ability to hydrolyze hemoglobin. We also found that all bacteria were able to incorporate a fluorescent heme analog, zinc protoporphyrin. *P. putida* was the most efficient in the incorporation of this compound while *Serratia* sp. and *Enterobacter* sp. were less effective during the 30 minutes of incubation. Using the SDS-PAGE technique was possible to observe subtle differences in protein expression in seven of the nine bacteria maintained in culture medium added with blood, hemin and hemoglobin. *Serratia* sp. showed the most noticeable differences in their protein profiles. Three proteins were highly expressed in the treatments with blood and hemoglobin. The induction of heme proteins expression was studied through the peroxidase activity in gel, it being possible to observe differences in expression of these proteins in most bacteria excepting *H. frisingense* and *P. putida*. Four bacteria have excelled in expression of heme-proteins: *Burkholderia* sp., *C. kwangyangense*, *Pantoea* sp. and *S. plymuthica*. Together, these results suggest that *Ae. Aegypti* midgut bacteria can assist in the detoxification of heme.

Keywords: *Aedes aegypti*, bacteria, heme, ZnPPiX.

1. Introdução

1.1. *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) pertence ao Filo Arthropoda, Subfilo Hexapoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Família Culicidae, Grupo Scutellaris, Gênero *Aedes*, Subgênero *Stegomyia* (Consoli, 1994). *Ae. aegypti* é o principal vetor da dengue e da febre amarela devido à sua antropofilia, seus hábitos urbano-domésticos (domiciliares) e sua alta eficiência na transmissão do vírus. É uma espécie de atividade diurna, alimenta-se dentro e fora das casas (Gubler, 1998).

O mosquito *Ae. aegypti* tem preferência acentuada por sangue humano e o repasto sanguíneo está relacionado com o desenvolvimento de ovos que são ovipostos cerca de 3 a 5 dias após o repasto. O repasto sanguíneo pode também contribuir para aumentar a longevidade das fêmeas (Consoli, 1994; Tauil, 2001). O *Ae. aegypti*, como os demais Dípteros, são holometábolos, ou seja, apresentam em seu ciclo de vida quatro estádios de desenvolvimento distintos: ovo, larva, pupa e adulto (Matheson, 1932). Durante seu desenvolvimento o mosquito passa por quatro estádios larvais. No final de cada estádio, a larva troca seu exoesqueleto e aumenta em tamanho. Assim sendo, os mosquitos sofrem uma completa metamorfose, isto é, do ovo eclode uma larva que se alimenta e cresce; e a larva quando madura, transforma-se em pupa da qual irá emergir o adulto, como mostrado na figura 1.

Da mesma forma que como nos demais insetos, os mosquitos têm seu corpo segmentado e revestido pelo exoesqueleto ou cutícula, formado principalmente por quitina. Tais segmentos endurecidos e as membranas que os unem englobam em uma cavidade chamada hemocele, repleta de hemolinfa, líquido que banha os órgãos em geral (Consoli, 1994). O corpo do adulto é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdomen. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos e no tórax estão os apêndices especializados na locomoção (as patas e as asas). O abdomen inclui a maior parte dos órgãos internos, dos aparelhos reprodutor, digestivo e excretor (Consoli, 1994).

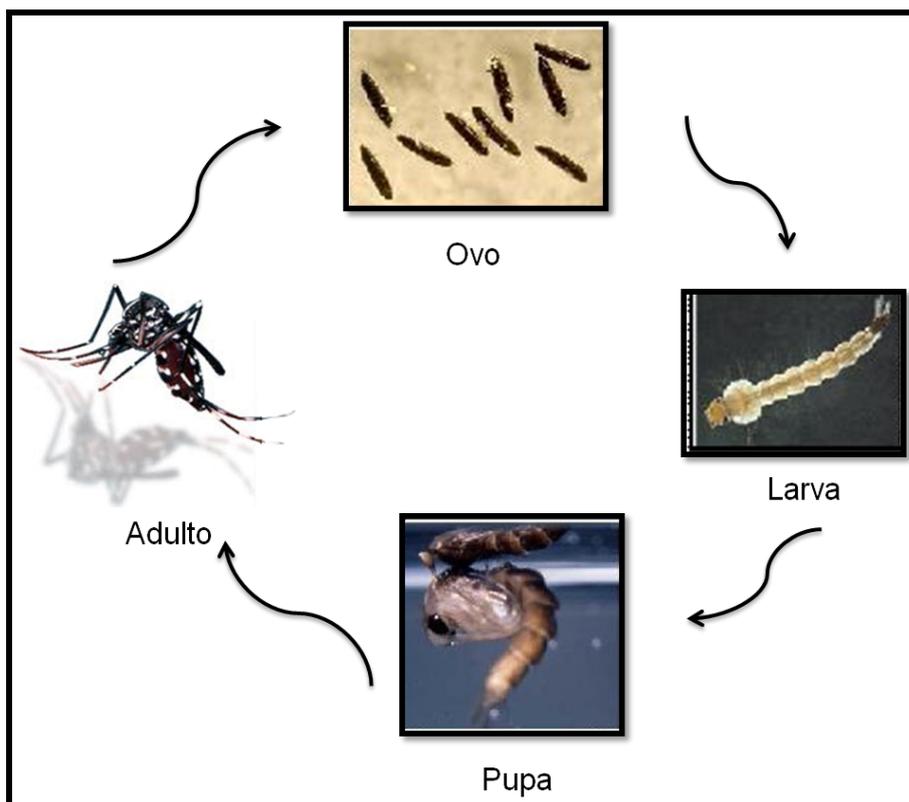


Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Ae. aegypti*. Adaptado de <http://www.arbovirus.health.gov.au/arbovirus.mosquiphos.html>.

1.2. Principais doenças transmitidas pelo mosquito *Ae. aegypti*

1.2.1. Dengue

A dengue é uma doença infecciosa que acomete o homem e, nas últimas décadas, voltou a ser um importante problema de saúde pública. A dengue ocorre em áreas tropicais e subtropicais cujas condições climáticas favorecem a proliferação do inseto vetor, o mosquito *Ae. aegypti* (Claro, 2004). A dengue é a doença viral transmitida por mosquito que mais rapidamente se espalha no mundo. Estima-se que nos últimos 50 anos, a incidência aumentou 30 vezes e que ocorra 50 milhões de casos de infecção por dengue por ano. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em países onde a dengue é endêmica (Portal da Saúde b).

Existe dois tipos de dengue, a forma clássica e a hemorrágica. As duas são causadas por um arbovírus (arthropode borne viruses) do gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae, e são conhecidos, atualmente, 4 sorotipos do vírus da dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). A transmissão da dengue ocorre por meio da interação “humano infectado - *Aedes sp.* - humano suscetível”.(Gubler e Clark, 1995).

Assim que o vírus penetra na corrente sanguínea do indivíduo sadio, ele passa a se multiplicar em órgãos específicos, como o baço, o fígado e os tecidos linfáticos. Esse período é conhecido como incubação e dura de quatro a sete dias. Logo após, o vírus volta à corrente sanguínea, gerando a viremia, que tem início ligeiramente antes do aparecimento dos primeiros sintomas (Schatzmayr *et al.*, 1986).

As manifestações da dengue variam de uma infecção assintomática até a uma doença severa, a dengue hemorrágica. Os sintomas da dengue são febre, dor de cabeça, cansaço, dor muscular, dor nas articulações, indisposição, vômito, manchas vermelhas na pele, dor abdominal, entre outros. Na dengue hemorrágica, os sintomas se assemelham aos da dengue clássica, e podem evoluir rapidamente para manifestações hemorrágicas. Os casos típicos da dengue hemorrágica são caracterizados por febre alta, fenômenos hemorrágicos, hepatomegalia (aumento no tamanho do fígado) e insuficiência circulatória. A síndrome do choque, a forma mais grave de dengue hemorrágica, ocorre entre o 3º e 7º dia da doença, onde a pessoa apresenta pulso quase imperceptível, inquietação, palidez e perda de consciência. Sua duração é curta, podendo levar ao óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida após terapia apropriada (Guzmán e Kourí, 2002).

Embora haja relatos de dengue desde meados do século XIX e início do século XX no Brasil, a circulação dos vírus dengue só foi constatado laboratorialmente em 1982, assim que foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista (RR) permanecendo o país sem notificação de casos por quatro anos. Foi em 1986, com a introdução do vírus DEN-1 no Estado do Rio de Janeiro, que a dengue tornou-se um problema de saúde pública nacional, tornando-se endêmica e apresentando surtos epidêmicos (Schatzmayr *et al.*, 1986 e Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro). Com a introdução do DENV-2, também no Estado do Rio de Janeiro, foi confirmado o primeiro caso de dengue hemorrágico por esse sorotipo, com o aparecimento de formas graves também em outras regiões (Dengue vírus e vetor – Instituto Oswaldo Cruz).

As campanhas sucessivas de controle do *Ae. aegypti* no Brasil, iniciadas por Oswaldo Cruz, a partir de 1906, promovidas com a colaboração da Divisão Sanitária da Fundação Rockefeller, terminaram por erradicar o vetor do país nos anos 50. O primeiro sinal de reinfestação foi detectado em Belém, Pará, em 1967 (Fonseca, 2002).

Entre os anos de 2008 a 2012 foram notificados pelo Ministério da Saúde 3.405.913 casos de dengue em todo o Brasil. Os maiores índices estão nas regiões sudeste, que apresenta 1.528.873 seguida da região nordeste com 929.875 casos. A figura 2 mostra o número de casos de dengue no Brasil entre os anos de 2008 a 2012 (Ministério da Saúde/SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação).

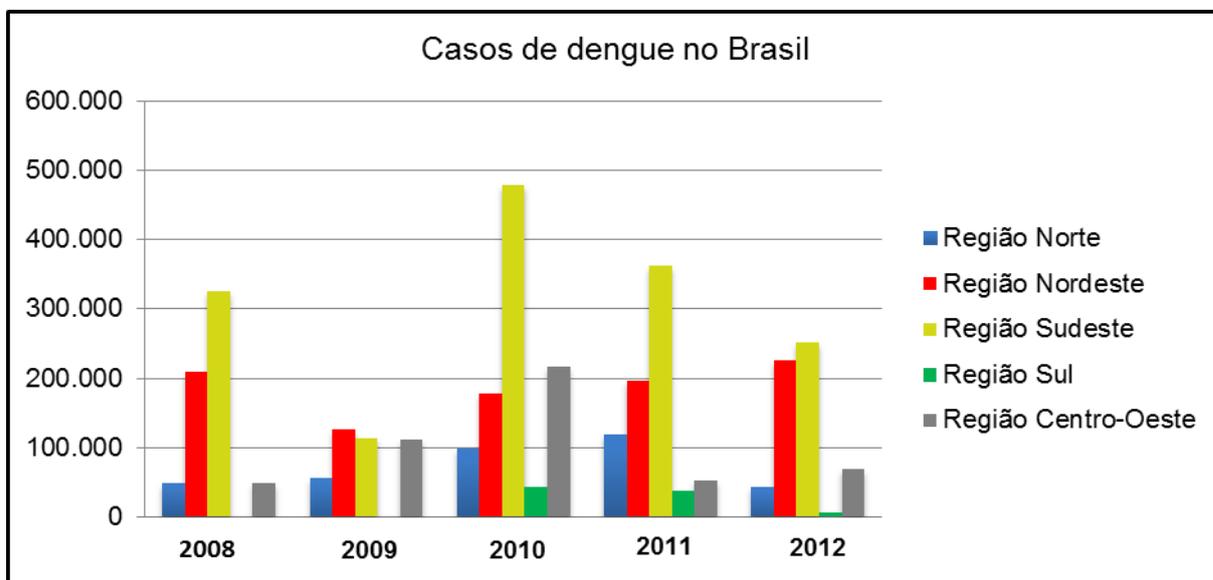


Figura 2. Casos de dengue no Brasil de 2008 a 2012. Casos de dengue por região entre os anos de 2008 a 2012. Fonte:Ministério da Saúde/SINAN - Sistema Nacional de Agravos de Notificação.

Entre os anos de 2008 a 2012 os maiores índices nos casos de dengue foram registrados na região sudeste, como já mostrado na figura 2. O estado do Rio de Janeiro aparece em primeiro lugar com 620.915 casos, logo em seguida o estado de Minas Gerais com 388.482. A figura 3 mostra os dados do caso de dengue nos estados na região sudeste durante este período (Ministério da Saúde/SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação).

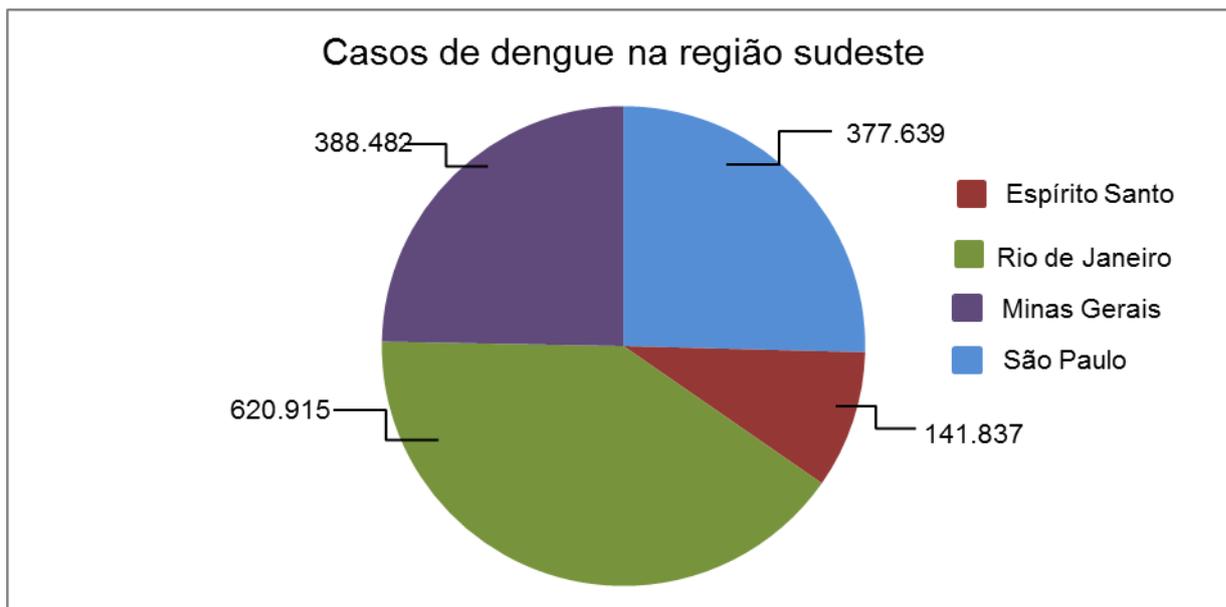


Figura 3. Casos de dengue na região sudeste de 2008 a 2012. Fonte: Ministério da Saúde/SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação.

No período de 1º de janeiro a 25 de maio de 2013 foram notificados 178.765 casos suspeitos de dengue no Estado do Rio de Janeiro com 28 óbitos. No mesmo período do ano de 2012 foram notificados 145.078 casos suspeitos de dengue no estado, com 34 óbitos. No decorrer de todo o ano de 2012 foram notificados 184.123 casos suspeitos de dengue no estado, com 42 óbitos. Em comparação entre 2012 e 2011, houve um aumento de 9,34% nas notificações por dengue, e a quantidade de óbitos caiu 70% no mesmo período (Governo do Rio de Janeiro).

Na cidade de Campos dos Goytacazes, até a primeira semana de maio deste ano, foram notificados 8.050 casos, 4.280 deles confirmados. Deste total, 4.190 casos são de dengue clássica e 90 são de dengue hemorrágica ou com complicações. A figura 4 mostra que a faixa etária mais atingida foi de 31 a 40 anos (Secretaria de Saúde de Campos/CRD – Centro de Referência da Dengue).

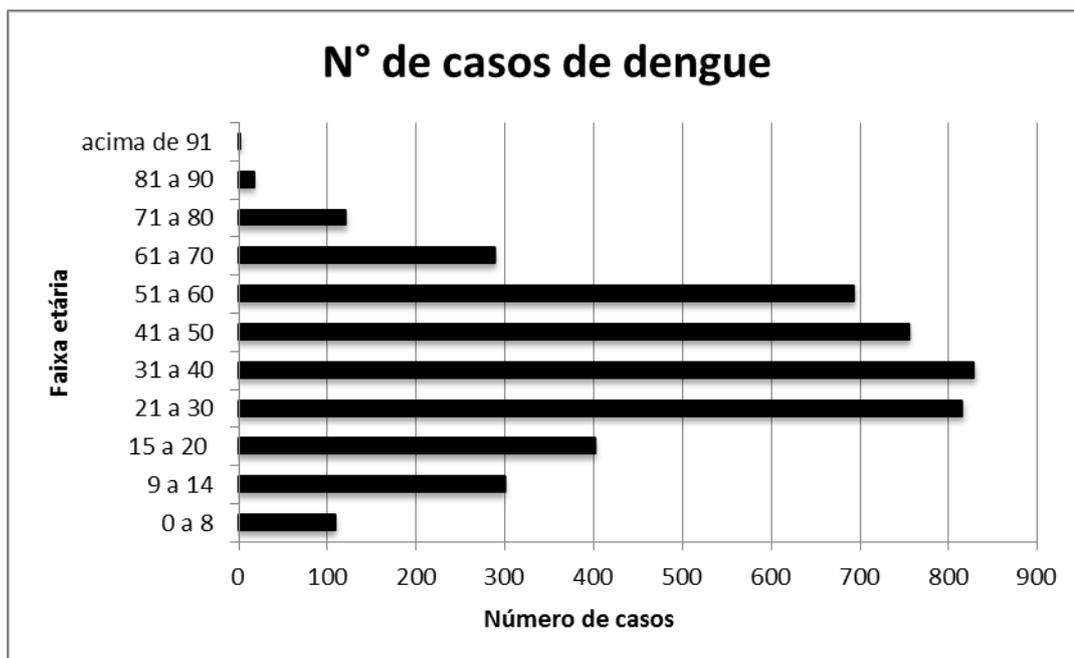


Figura 4. Número de casos de dengue por faixa etária. Casos de dengue por faixa etária no município de Campos dos Goytacazes no período de janeiro a maio de 2013. (Secretaria de Saúde de Campos/CRD – Centro de Referência da Dengue).

De acordo com o diretor do CRD de Campos, Luiz José de Souza, os bairros com maior número de casos até abril deste ano foram o Centro com 212 casos, Jockey com 114, seguido do Parque Aurora e Penha ambos com 104, Ururaí e Turf com 103 e Morro do Coco com 98 casos. Foi também confirmado pela Fiocruz um caso de dengue congênita na Cidade de Campos. Este foi o segundo caso deste tipo registrado no País. O primeiro ocorreu em 2008 em Angra dos Reis (Secretaria de Saúde de Campos/CRD – Centro de Referência da Dengue).

Entre os sorotipos da dengue, o sorotipo 3 predominou na grande maioria dos estados do Brasil entre 2002 e 2006. No período entre 2007 e 2009, observou-se uma alteração no sorotipo predominante, com a substituição do DENV-3 pelo DENV-2. Em 2010, as atividades de monitoramento demonstraram a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV- 2 e DENV- 3. Em 2012, o sorotipo DENV- 4 foi detectado nos estados da Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Pará e Roraima. A figura 5 apresenta o mapa que mostra os sorotipos de dengue identificados no Brasil em janeiro de 2012 (Informe do Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Informe Epidemiológico da Dengue Semanas de 1 a 52 de 2009).

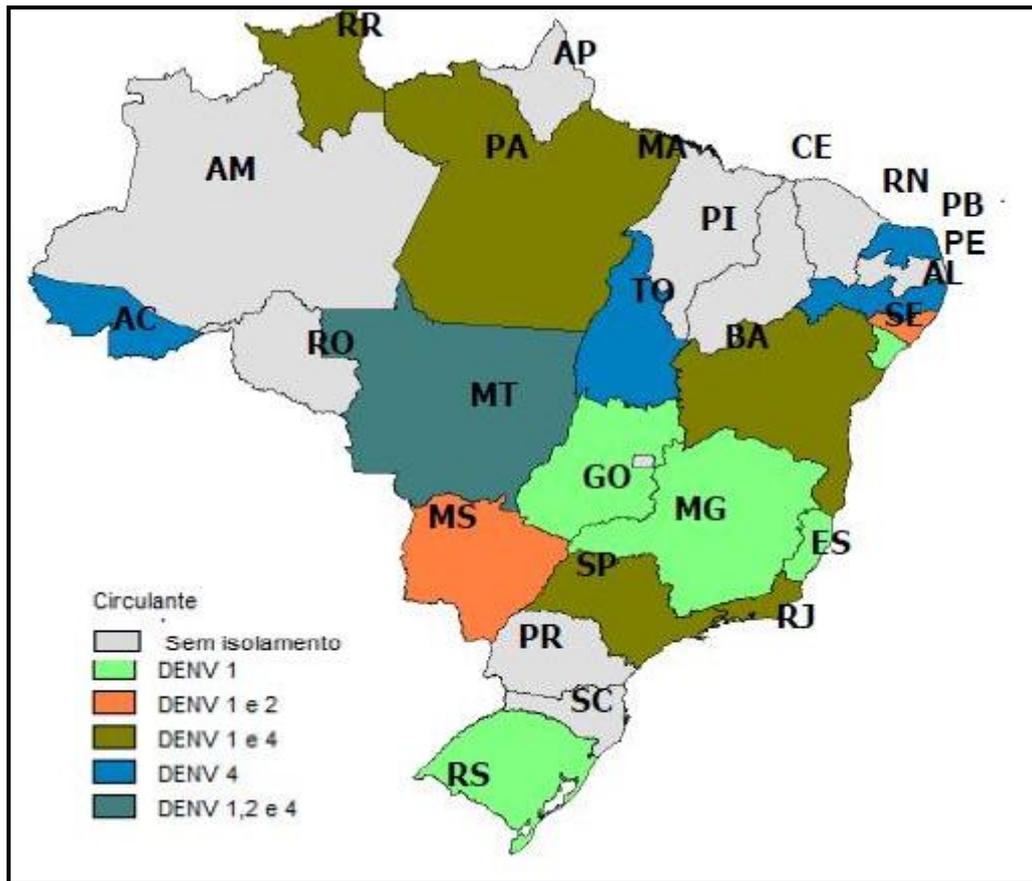


Figura 5. Sorotipos de dengue circulantes no Brasil. Sorotipos DENV circulantes no Brasil por estados em janeiro de 2012. (<http://www.defesacivil-ap.com.br/portal/noticias/16-defesadivulgainformacaodengue.html>, acesso em 16 de abril de 2012).

Como já dito anteriormente, a dengue está presente nos países com clima tropical e subtropical, nos quais a temperatura e a umidade favorecem a proliferação do inseto vetor. A figura 6, abaixo, mostra a distribuição mundial da dengue.



Figura 6. Distribuição mundial da dengue. As regiões em azul presente no mapa mostram as áreas onde há risco contínuo de transmissão da dengue. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Fonte: Site DengueMap).

1.2.1.1. Transmissão da dengue

O processo de transmissão do vírus se inicia com as fêmeas de *Ae. aegypti* picando um indivíduo infectado. Posteriormente o vírus se replica no epitélio intestinal do mosquito e atinge a hemocele e se dissemina por diferentes tecidos. Após um período que varia de 7 a 14 dias, o vírus chega às glândulas salivares e o inseto está apto a transmitir o vírus para um novo hospedeiro (Bielefeldt-Ohmann e McBride, 2000).

Quando o mosquito se alimenta de sangue de uma pessoa infetada, o vírus encontra algumas barreiras de infecção a qual ele precisa romper. A capacidade que o vírus tem de ultrapassar as barreiras imunofisiológicas, define a competência vetorial da espécie, que é a permissividade do vetor à infecção, replicação e transmissão do vírus (Black, *et al.*, 2002).

Existem 6 barreiras que um arbovírus enfrenta para ser transmitido eficientemente por um artrópode como mostrado na figura 7. Primeiramente o vírus tem que ser capaz de penetrar as células epiteliais e se replicar nelas e então atingir um alto título viral. Fatores que bloqueiam um desses dois eventos constituem uma barreira de infecção no intestino (MIB). Posteriormente, o vírus deve ser capaz de ultrapassar a lâmina basal que envolve o epitélio intestinal e, assim, infectar e se replicar nos tecidos vizinhos.

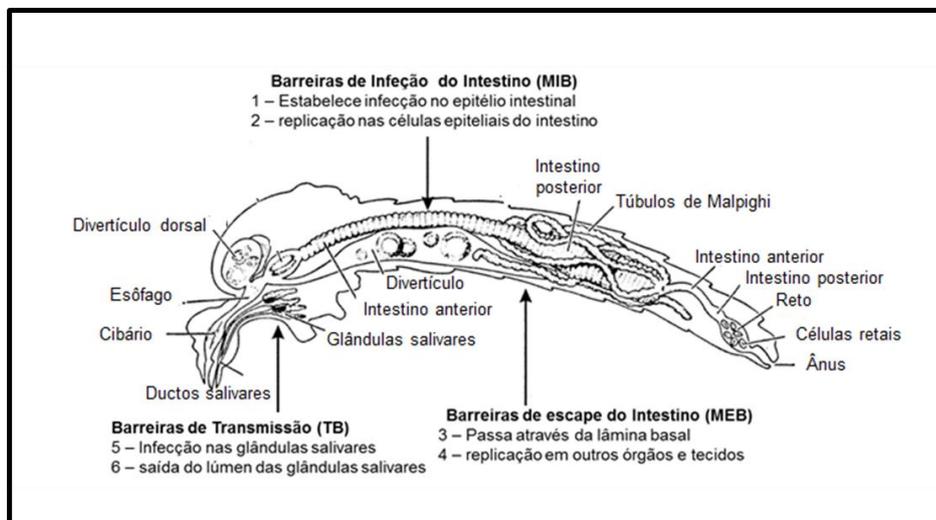


Figura 7. Barreiras enfrentadas por um arbovírus durante a infecção de mosquitos. MIB= barreira de infecção no intestino; MEB= barreira de escape do intestino; TB= barreira de transmissão. Adaptado de Black *et al.*; 2002.

Fatores que bloqueiam estes eventos impedem a disseminação da infecção nos tecidos, atuando como uma barreira de escape do intestino (MEB). Por último, o arbovírus deve infectar e se replicar nas glândulas salivares antes de invadir o lúmen da glândula salivar para a transmissão final na próxima picada. Fatores que

impedem esta etapa constituem a barreira de transmissão (TB). É importante que cada uma dessas barreiras possa ser compreendida para que seja possível entender os mecanismos que levam à infecção, replicação e transmissão do vírus no mosquito vetor, e conseqüentemente, sua competência vetorial (Bennett, *et al.*, 2002; Black *et al.*, 2002).

1.2.2. Febre amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda, febril, de curta duração e é causada por um arbovirus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. Ela é caracterizada por febre, icterícia, dor de cabeça, dores no corpo e prostração profunda. Existem dois tipos de transmissão da febre amarela: a urbana e a silvestre. A febre amarela urbana é transmitida pelo mosquito *Ae. aegypti*, enquanto que a silvestre é transmitida por mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*, que ocorrem nas matas infectando macacos, sendo o homem um hospedeiro acidental (Ministério da Saúde Fundação Nacional de Saúde). Na figura 8 pode ser visto um mapa do Brasil mostrando as áreas de risco de transmissão da febre amarela. No Brasil não ocorre transmissão da febre amarela nas cidades desde 1942, mas a possibilidade da transmissão em áreas urbanas existe desde a reintrodução do *Ae. aegypti* no país.



Figura 8. Distribuição da febre amarela no Brasil. O mapa mostra as áreas de risco de transmissão da febre amarela no Brasil. As regiões com risco de transmissão são: região Norte (Acre, Amapá, Pará, Amazonas, Rondônia, Roraima e Tocantins), na região Nordeste (Bahia, Maranhão e Piauí), centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), região Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo) e na região Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Fonte Cives - Centro de Informação em Saúde para Viajantes.

1.3. Canal alimentar e digestão nos mosquitos

O canal alimentar dos mosquitos, como nos insetos em geral, é um tubo que se estende da boca até o ânus e é formado por uma camada de células contendo uma lâmina basal acelular, voltada para a hemocele. As três regiões do canal são: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Romoser, 1996). Cada uma das regiões possui funções diferentes. O intestino anterior é responsável pela ingestão do alimento. O intestino médio é altamente elástico e está adaptado à secreção e absorção. O intestino médio é sítio da digestão do sangue em insetos hematófagos, um processo que dá início a eventos fisiológicos importantes, tais como a vitelogênese e a reprodução, e é também considerado o principal sítio de interação entre o inseto e os patógenos que ele transmite. É longitudinalmente dividido em uma região anterior, em forma de tubo, e uma região posterior, em forma de saco (Billingsley e Lehane, 1996). O intestino posterior está envolvido na excreção de materiais vindos do intestino médio e dos túbulos de Malpighi (Consoli e Oliveira, 1994).

Na alimentação com carboidratos os açúcares ingeridos são armazenados no divertículo ventral, de onde passam lentamente para o intestino médio, onde são progressivamente digeridos. Este mecanismo permite à fêmea manter o intestino médio vazio, pronto para receber o repasto sanguíneo (Consoli e Oliveira, 1994). A digestão sanguínea ocorre de forma bastante rápida. Após a ingestão, forma-se uma camada de material quitinoso, secretado pelas células do intestino médio, que separa a sua superfície interna do sangue ingerido e que constitui a matriz peritrófica (MP). A MP é permeável a algumas enzimas proteolíticas secretadas pelas células intestinais e também aos produtos da digestão que são aí absorvidos. Quando a digestão se aproxima do seu final, esta matriz é degradada (Consoli, 1994).

1.4. Matriz peritrófica

Matriz peritrófica, é camada de material acelular que separa o alimento das células epiteliais do intestino (Peters, 1992; Richards e Richards 1977). A MP é

constituída principalmente, por uma malha de fibrilas de quitina que interage com glicoproteínas e proteoglicanos (Peters, 1992). Uma importante função da MP é a dessa estrutura representar uma barreira contra patógenos (Shen e Jacobs-Lorena, 1997; Lehane, 1997; Langer e Vinetz 2001). A MP está presente na maior parte dos insetos, pelo menos em uma determinada fase de sua vida (Tellam, 1996; Lehane, 1997; Terra, 2001). Existem dois tipos fundamentais de MP que são definidos pelo seu sítio de síntese. A MP tipo I é produzida a partir de secreções do epitélio do intestino médio em resposta à alimentação. A MP tipo II geralmente é constitutiva, sendo sintetizada por um pequeno grupo de células altamente especializadas da cárdia, localizada na região anterior do IM (Tellam, 1996; Wijffels *et al.*, 2001; Gusmão *et al.*, 2002). Os mosquitos e muitos insetos hematófagos produzem a PM tipo II durante a fase larval e a MP tipo I durante a vida adulta (Shen e Jacobs-Lorena, 1997).

1.5. Heme

O heme é o grupo prostético da hemoglobina e é constituído por uma parte orgânica e um átomo de ferro como mostrado na figura 9. É uma molécula biologicamente importante e amplamente relacionada aos processos de captura e utilização da energia (Moore, 1990).

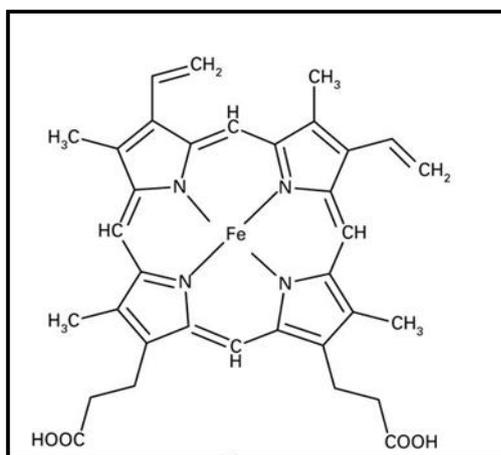


Figura 9. Estrutura molecular do heme.

A molécula de heme está envolvida em processos importantes, como a cadeia transportadora de elétrons (citocromos), detoxificação (citocromo P450) e o transporte de oxigênio (hemoglobina e hemocianina) em um grande número de organismos vivos. A utilização deste heme ingerido pelo inseto poderia ser uma

grande economia em termos metabólicos, pois poderia minimizar a utilização da via metabólica de biossíntese de heme, presente na maior parte dos seres vivos.

O sangue é constituído por duas proteínas majoritárias a albumina e a hemoglobina que, juntas, correspondem a mais de 90% do seu total de proteínas. A albumina apresenta-se solúvel no plasma e a hemoglobina compartimentalizada no interior nas hemácias. A hemoglobina é uma hemeproteína que contém em torno de 5% de ferroprotoporfirina IX em sua composição. A concentração de heme no sangue de vertebrados chega a aproximadamente 10 mM. No intestino dos insetos hematófagos este valor pode ser ainda maior devido à acentuada diurese que ocorre logo após a alimentação (Stobbart, 1977). Quando as hemácias são rompidas e a hemoglobina é digerida, grandes quantidades de heme são liberadas na luz intestinal dos hematófagos (Pereira *et al.* 2007).

O heme na sua forma livre é tóxico e é capaz de promover a oxidação de biomoléculas tais como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Halliwell e Gutteridge, 1990). Alguns artrópodes possuem mecanismos de detoxificação de heme. No hemíptero *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas, foi demonstrado que a detoxificação do heme ocorre basicamente por três mecanismos distintos: através de uma proteína capaz de ligar o heme denominada RHBP (Oliveira *et al.*, 1995; Dansa-Petretski *et al.*, 1995), através de uma enzima que degrada o heme, denominada heme oxigenase (Paiva-Silva *et al.*, 2006) e principalmente através de um agregado cristalino de heme conhecido como hemozoína (Oliveira *et al.*, 1999).

O nosso grupo mostrou que grande parte do heme gerado durante a digestão sanguínea em *Ae. aegypti* liga-se fortemente à matriz peritrófica, que é capaz de reter, no lúmen intestinal, praticamente todo o heme gerado na digestão da hemoglobina. Este resultado sugere que a matriz peritrófica pode funcionar como uma eficiente barreira contra o heme (Pascoa *et al.*, 2002).

1.5.1. Captação de heme por bactérias

Algumas bactérias, em geral bactérias patogênicas, usam heme como fonte de ferro (Lee, 1995; Ratliff *et al.*, 2001). Alguns mecanismos sofisticados foram desenvolvidos por algumas bactérias para absorção de ferro do ambiente. O mecanismo mais observado nas bactérias é a secreção de sideróforos para quelação do ferro do ambiente (Raymond *et al.* 2003). Um segundo mecanismo encontrado somente em bactérias patogênicas é a captura de ferro do hospedeiro,

através da captura do ferro presente na ferritina e lactoferrina, por exemplo, (Braun, 2001). O terceiro mecanismo também identificado na sua maior parte em bactérias patogênicas, é a assimilação de ferro através de heme e do heme ligado a proteínas, como hemoglobina e hemopexina (Tong e Guo,2009).

Alguns autores acreditam que a incorporação de heme por bactérias esteja ligada a sua virulência (Olczak *et al.*, 2001; Litwin e Calderwood, 1993). Acredita-se que o heme pode fornecer as quantidades de ferro necessários para que fatores de virulência possam se expressar, como citotoxinas (Litwin e Calderwood, 1993).

Embora o heme tenha sido reconhecido como um “marcador” de virulência (Perry e Brubaker, 1979; Stugard *et al.*, 1989; Kay *et al.*, 1985; Daskaleros e Payane, 1987; Perry *et al.*, 1993) a base molecular para esta característica ainda é desconhecida.

Na maior parte das bactérias Gram-negativas a utilização de heme é mediada por receptores de membrana específicos, que hospedam proteínas que são capazes de sequestrar o heme. Algumas bactérias Gram-negativas produzem proteínas extracelulares que ligam heme. Essas proteínas conseguem “extrair” o heme da hemoglobina, por exemplo, passam para uma outra proteína que transporta o heme para dentro da célula. O sistema que é melhor caracterizado é o de *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* secreta a proteína Hasa que capta heme da hemoglobina e entrega a HasR (receptor de membrana externa) (Ghigo *et al.* 1997 e Letoffe *et al.* 1999). Uma vez dentro da célula o heme é apresentado a heme oxigenase, o anel tetrapirrólico é clivado a fim de liberar o ferro (Tong e Guo, 2009).

O sistema Hasa (sistema de aquisição de heme) já foi encontrado em *Serratia marcescens* (Letoffe, 1994; Arnoux, 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (Letoffe, 2000; Letoffe 1998), *Pseudomonas fluorescens* (Letoffe, 2000, Idei *et al.*, 1999), *Yersinia enterocolitica* (Rossignol *et al.*, 2001).

Em relação à captação de heme por bactérias Gram-positivas pouco se sabe. Sabe-se que a bactéria *Staphylococcus aureus* possui um sistema de aquisição de heme, para adquirir ferro durante o processo de infecção, através da secreção de hemolisina (moléculas que são capazes de formar poros na membrana do eritrócito, causando lise) para liberação da hemoglobina (Mazmanian *et al.* 2003). Após a liberação da hemoglobina o transporte do heme e do ferro é feito por proteínas de membrana e proteínas citoplasmáticas.

Em *Staphylococcus aureus* o transporte de heme é mediado por seis proteínas, três delas de superfície exposta. IsdA, IsdB e IsdC estão ancoradas as mureínas presentes na parede celular, as proteínas IsdE, são lipoproteínas, IsdD são permeases e IsdF que são ATPases, juntas elas formam um complexo transportador citoplasma-membrana (Marraffini *et al.*, 2006). A IsdB se liga a hemoglobina, libera o heme e entrega-o ao IsdA que está mais interna à parede celular. A partir daí o heme é transportado para IsdC que está dentro da parede celular, posteriormente passa para IsdE que está ancorada à membrana e a partir daí passa para IsdD e IsdF que disponibilizam o ferro para a célula (Marraffini *et al.*, 2006). Estudos mostram que é possível que outras bactérias Gram-positivas, como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus halodurans*, e *Bacillus anthracis*, também possuam genes que codifiquem para heme-proteínas de ligação (Cabanés, *et al.*, 2002).

Como já se sabe parte do heme gerado durante a digestão sanguínea, liga-se a matriz peritrófica (Pascoa *et al.*, 2002). O nosso grupo observou que durante o processo digestivo em mosquitos alimentados com sangue, as bactérias predominam na região posterior do intestino médio (Gusmão 2007). DeMaio *et al.* (1996), mostrou que bactérias residentes em intestino de mosquitos também crescem em velocidade exponencial após a alimentação com sangue. Como alguns estudos mostram que bactérias são capazes de adquirir ferro a partir da hemoglobina, isso nos leva a sugerir que a microbiota intestinal de *Ae. aegypti* pode desempenhar um papel auxiliar no processo de detoxificação do heme.

1.6. Bactérias utilizadas

As bactérias, isoladas de intestino médio de *Ae. aegypti*, utilizadas neste trabalho, são classificadas conforme descrito abaixo:

- *S. plymuthica*, *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.* e *Pantoea sp.* pertencem ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales e família Enterobacteriaceae.

- *A. hydrophila* pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Aeromonadales e família Aeromonadaceae.

- *P. putida* pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Pseudomonadales e família Pseudomonadaceae.

- *Burkholderia sp.* pertence ao filo Proteobacteria, classe Betaproteobacteria, ordem Burkholderiales e família Burkholderiaceae.

- *H. frisingense* pertence ao filo Proteobacteria, classe Betaproteobacteria, ordem Burkholderiales e família Oxalobacteraceae.

- *C. kwangyangense* pertence ao filo Bacteroidetes, classe Flavobacteriaceae, ordem Flavobacteriaceae e família Flavobacteriaceae.

Bactérias do gênero *Serratia* são bacilos Gram-negativos considerados como patógenos oportunistas de humanos, plantas e insetos (Harris *et al.*, 2004). Espécies de *Serratia* já foram isoladas de solo, água, plantas e ar (Grimont e Grimont, 2006). A capacidade de algumas cepas de *S. marcescens* de colonizar uma vasta gama de nichos ecológicos foi associada à produção de uma série de moléculas que são secretadas por esta bactéria, incluindo quitinases, proteases, lipases, nucleases, bacteriocinas e surfactantes (Braun e Schmitz, 1980; Clegg e Allen, 1985; Hines *et al.*, 1988.; Matsuyama *et al.*, 1995, Yanagida *et al.*, 1986). Espécies de *Serratia* já foram isoladas de intestino de espécies de insetos hematófagos, tais como flebotomíneos e triatomíneos (Moraes *et al.*, 2008). Espécies deste gênero também já foram identificadas em mosquitos anofelinos (Rani 2009; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2003) e foi a bactéria predominante do intestino médio de *Ae. aegypti*, (Gusmão *et al.*, 2007).

Enterobacter são bacilos Gram-negativos e estão amplamente distribuídas na natureza (Morand *et al.*, 2009). Estes microrganismos são saprofíticos no ambiente e comensal na flora intestinal. Eles são encontrados no solo e esgotos, como também no trato gastrointestinal humano (Tortora, 2005). *Enterobacter sp* podem ser benéficos ao crescimento vegetal de forma indireta, pois acredita-se que esta bactéria pode proteger as plantas de infecção por fungos e bactérias patogênicas através de mecanismos como produção de sideróforos, antibioticos, quitina e outros (Whipps, 2001). *Enterobacter sp.* foi isolado de intestino de larvas de *Anopheles stephensi* (Chavshin *et al.*, 2012), de fezes de *P. saucia* (Armstrong *et al.*, 1990), *Culex quinquefasciatus* (Alves *et al.*, 2010), *Ae. albopictus* (Moro *et al.*, 2013) e de intestino médio de *Ae. aegypti* (Gusmão *et al.*, 2007).

Bactérias do gênero *Pantoea* são bacilos aeróbicos Gram-negativos e inclui várias espécies que são geralmente associados com plantas, seja como endofíticas ou como patógenos, e algumas espécies podem causar doenças em seres humanos (Asis e Adachi 2004; Delétoile *et al.*, 2009; Quecine *et al.*, 2012). Alguns estudos têm mostrado o potencial de *Pantoea spp.* na indução de resistência sistêmica

(Jeun, 2004 ; Liu, 1995; Ongena, 2000), proteção contra pragas de plantas e microrganismos patogênicos (Bardin *et al.*, 2003; Bonaterr *et al.*, 2003), indução de crescimento de plantas e solubilização de fósforo (Malboobi *et al.*, 2009), e estimulação na produção de fitohormônio (Tsavkelova *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 1994). *Pantoea sp.* foi isolado de *Coquillettidia venezuelensis*, *Trichoprosopon spp.*, *Culex quinquefasciatus* (Alves *et al.*, 2010), *Ae. albopictus* (Moro *et al.*, 2013) e em *Ae. aegypti* (Gusmão *et al.*, 2010).

O gênero *Aeromonas* é formado por bacilos Gram-negativos que possuem uma ampla distribuição em variados tipos de ambientes hídricos, podendo ser encontrados em água doce, salgada e salobra. *A. hydrophila* tem sido amplamente estudada por causar patogenicidade a plantas aquáticas e animais terrestres. A patogenicidade em humanos tem sido estudada há muito tempo (Daskalov, 2006; Li J, *et al.* 2011). *A. hydrophila* já foi isolada do mosquito *An. gambiae* (Lindh, 2005).

P. putida são bacilos Gram-negativos que são encontrados em vários ambientes. Possuem capacidade de utilizar diferentes compostos como fonte de energia e tem capacidade excepcional para se adaptar e colonizar uma grande variedade de nichos ecológicos, incluindo água, solo e rizosfera (Ruiz, 2004; Igbinosa, 2012). *P. putida* foi isolada de fêmeas de *Anopheles stephensi* (Rani, 2009) e intestino de *Ae. aegypti* (Apte-Deshpande *et al.*, 2012).

Burkholderia sp. são bactérias Gram-negativas que podem ser encontradas em diferentes nichos ecológicos, mas principalmente em solo e rizosfera (Coenye e Vandamme 2003). Espécies deste gênero têm sido relatadas como patógenos oportunistas em pacientes com fibrose cística (Darling *et al.*, 1998; Coenye e Vandamme, 2003). Também tem sido relatado que espécies desse gênero têm alta potencialidade em disponibilizar nutrientes para plantas e isto parece estar relacionado a versatilidade nutricional deste gênero que permite esta bactéria crescer em mais de 200 compostos orgânicos. *Burkholderia sp.* tem sido descrita como simbiote de *Riptortus clavatus* e *Leptocorisa chinensis* que são pragas de cultura de arroz e soja na Ásia (Kikuchi *et al.*, 2005).

H. frisingense são bactérias Gram-negativas, com forma geralmente viriódica e algumas vezes helicoidal. São bactérias diazotróficas e amplamente conhecidas por colonizar gramíneas (Monteiro *et al.*, 2012). *H. frisingense* já foi isolado do intestino

da larva *Diabrotica virgifera virgifera* (Dematheis *et al.*, 2012) e no intestino de adultos de *Anopheles stephensi* (Rani *et al.*, 2009).

O gênero *Chryseobacterium* foi descrito por Vandamme *et al.* (1994). Espécies de *Chryseobacterium* apresentam-se como bastonetes Gram-negativos, não móveis de pigmentação amarelada. *Chryseobacterium sp.* tem sido isoladas de diferentes ambientes, como solo (Shen *et al.* 2005), bebidas lácteas (Shimura *et al.* 2005) e tem sido associada a atividade proteolítica (Venter *et al.*, 1999; Yamaguchi e Yokoe, 2000; Lijnen *et al.*, 2000). Espécies de *Chryseobacterium* já foi isolada do intestino de larvas de *Anopheles stephensi* (Chavshin *et al.*, 2012) e do intestino médio de adultos de *Culex quinquefasciatus* (Kampfer *et al.*, 2010).

2. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo analisar a incorporação de heme por bactérias isoladas do intestino médio do mosquito *Ae. aegypti*.

2.1. Objetivos específicos

- Verificar a atividade hemolítica dos isolados bacterianos utilizando-se meio de cultivo suplementado com sangue;
- Verificar a atividade hemoglobínica dos isolados bacterianos utilizando-se meio de cultivo suplementado com hemoglobina;
- Estudar a capacidade de incorporação de heme das bactérias intestinais crescidas em meio de cultura suplementado com hemina;
- Estudar a capacidade de incorporação de heme das bactérias intestinais utilizando o análogo Zn protoporfirina por microscopia de fluorescência;
- Verificar a expressão diferencial de proteínas de bactérias crescidas em meio de cultura contendo sangue, hemoglobina ou hemina;
- Verificar a presença de peroxidases em bactérias crescidas em meio de cultura contendo sangue, hemoglobina ou hemina.

3. Metodologia

3.1. Bactérias utilizadas

As bactérias de intestino médio de *Ae. aegypti* utilizadas neste trabalho (tabela 1) foram isoladas e identificadas por Gaio 2011a, e por Rodrigues 2008.

Tabela 1. Bactérias de intestino médio de *Aedes aegypti* utilizadas neste trabalho.

Isolado	Número de acesso no GenBank	Espécie relacionada de acordo com o Blast	Identidade (%)
17	AM992185.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	98%
8	FJ823011.1	<i>Burkholderia sp.</i>	100%
6	EU169201.1	<i>Chryseobacterium kwangyangense</i>	99%
20	AJ 506159	<i>Enterobacter sp.</i>	88%
2	EU244768.1	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	100%
4	FJ799754.1	<i>Pantoea sp.</i>	98%
3	FJ405892.1	<i>Pseudomonas putida</i>	99%
21	EU 344964.1	<i>Serratia plymuthica</i>	94%
19	AY859721.1	<i>Serratia sp.</i>	97%

3.2. Esterilização e preparo dos materiais

Os materiais utilizados durante os experimentos, tais como placas de Petri, pinças, ponteiros, pistilos, palitos, tubos do tipo Eppendorf, foram previamente autoclavados a 121°C por 20 min, assim como, a solução de PBS [NaH₂PO₄ 0,5 M, Na₂HPO₄ 0,5 M, NaCl] utilizada para o enxágue. Todo o procedimento foi realizado no fluxo laminar. Outros materiais, incluindo pipetas automáticas, isqueiro, lamparina e recipientes contendo as soluções de hipoclorito de sódio e álcool 70%, foram sanitizados com álcool 70%.

3.3. Atividade hemolítica

Os isolados bacterianos foram inoculados em meio de cultura BHI sólido suplementado com 4% de sangue humano. O sangue foi adicionado quando o meio de cultura, previamente esterilizado, atingiu a temperatura de 55-60 °C. Em seguida, o meio de cultura foi assepticamente distribuído em placas de Petri que foram deixadas em repouso por trinta minutos. Após o meio ter atingido a temperatura ambiente, alíquotas de 10 µL das culturas bacterianas (D.O._{600nm} igual a 1) foram inoculadas no centro das placas de Petri. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 28 °C entre 72 h e 96 h. Ao final do período, foi feita observação para verificação da formação de zona de hemólise em torno das colônias.

3.4. Atividade hemoglobínica

Para verificação da atividade hemoglobínica, os experimentos foram conduzidos utilizando o meio BHI sólido acrescido de 4 mg/mL de hemoglobina bovina (Sigma). O meio BHI foi autoclavado por 15 min a 120 °C. A hemoglobina foi solubilizada em água destilada esterilizada e adicionada ao meio BHI quando este atingiu a temperatura entre 55-60 °C. Alíquotas de 10 µL cultura bacteriana (D.O._{600nm} igual a 1) foram colocadas no centro da placa, e as placas foram colocadas na estufa a 28°C por 24 h a 48 h. Ao término deste período, foi observada a formação do halo de atividade ao redor das colônias.

3.5. Incorporação de heme

Para atividade de incorporação de heme o meio de cultura BHI foi acrescido de hemina (Sigma) 5,0 mM. O meio foi autoclavado por 15 min a 121 °C. Após a autoclavação, o meio foi distribuído em placas de Petri. Alíquotas de 10 µL cultura bacteriana (D.O._{600nm} igual a 1) foram colocados no centro da placa, e as placas foram colocadas na estufa a 28°C por 24 h a 48 h. Após este período, foi observada a coloração das colônias.

3.6. Incorporação de ZN-protoporfirina IX.

Os isolados bacterianos foram colocados para se multiplicar em meio BHI por 16h na estufa a 28°C. Após esse período, as culturas foram centrifugadas e ressuspensas em 500 µL de PBS. Um análogo do heme, a Zn protoporfirina IX (Sigma), na concentração de 30 µM, foi adicionado às suspensões bacterianas que

foram mantidas, à temperatura ambiente, por 10, 30, 45, e 60 min, na ausência de luz. Decorrido estes tempos, as culturas foram lavadas por três sucessivas centrifugações e ressuspensa utilizando-se, em cada etapa, 1mL de PBS.

As lâminas e lamínulas utilizadas na microscopia foram previamente lavadas com detergente e água corrente, enxaguadas com água destilada e submersas em álcool 70% e posteriormente colocadas sob papel filtro para secar. Para uso, as lamínulas foram adsorvidas com 30µL de poli-L-lisina overnight a temperatura ambiente. Após o tratamento, foi retirado o excesso de poli-L-lisina e as lamínulas foram colocadas para secar a temperatura ambiente.

Após a última centrifugação, o pellet foi ressuspendido em 200 µL de PBS e 20 µL foram aderidas à lamínulas por 15 min. Na sequência, as lamínulas foram então cuidadosamente lavadas em PBS e montadas em lâminas histológicas com N-propil-galato. As lâminas foram observadas ao microscópio Zeiss Imager A2 na objetiva de 100X e as imagens foram adquiridas com o *software* Axiovision.

Cento e oitenta microlitros das amostras processadas acima foram utilizadas nos ensaios de quantificação de Zn protoporfirina IX. A curva padrão da ZnPPIX foi feita com concentrações de 0,01µM; 0,02µM; 0,04µM; 0,08µM; 0,1µM; 0,14µM; 0,16µM; 0,2µM no Espectrofluorímetro HIDEX PLATE CHAMELEON™V. A excitação ocorreu em 405/10 nm e a emissão em 590/20 nm. Os valores obtidos nas leituras foram utilizados para construção da curva padrão, como mostrado na figura 10. Com o auxílio do *software* EXCEL foi feita uma regressão linear e obteve-se uma equação da reta que foi utilizada para a quantificação da ZnPPIX incorporada pelas bactérias. Como controle negativo nos experimentos foram utilizadas duas cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolada de cana de açúcar. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* PqqC que não solubiliza zinco, não fixa nitrogênio e é sensível a estresse por metais como, cobalto, zinco e cádmio (Mota Filho, 2012).

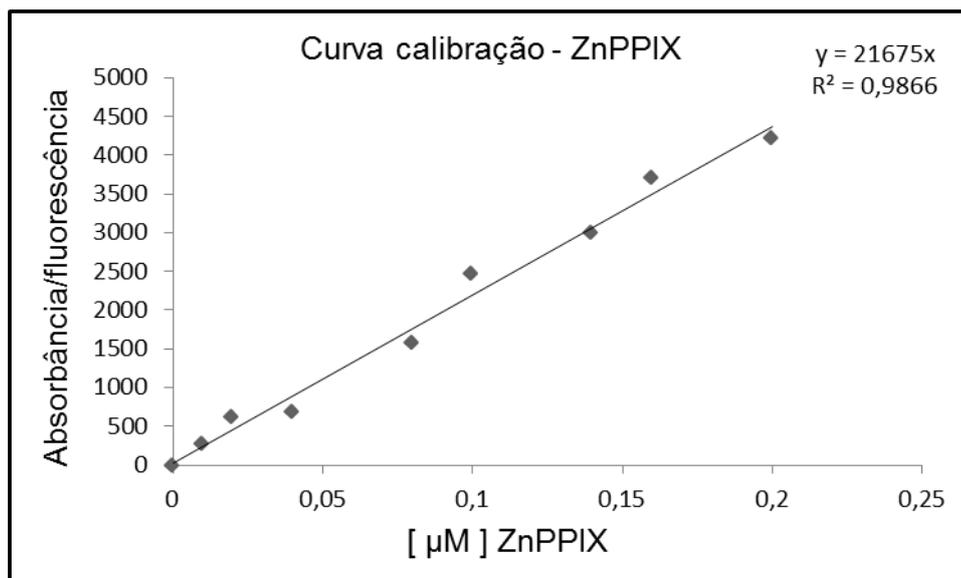


Figura 10. Curva padrão ZnPPiX.

3.7. Análise do perfil proteico

3.7.1 Extração das proteínas bacterianas

As culturas bacterianas crescidas como descrito nos itens 3.3, 3.4 e 3.5 foram retiradas das placas com auxílio de palitos esterilizados e passadas para tubos e lavadas com água Milli-Q autoclavada e centrifugadas a 5.000 rpm por 15 min. Por duas vezes. Após a lavagem as bactérias foram ressuspensas em Tris-HCl 20mM pH 7,5 e sonicadas no Sonic Dismembrator (Fisher Scientific) com 8 ciclos de 7 segundos de ultrassom. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 9.000rpm por 20 min, e o sobrenadante foi retirado para um novo tubo e congelado.

3.7.2. Quantificação protéica

A quantificação proteica dos extratos bacterianos foi feita utilizando-se do método de Lowry e colaboradores (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 750 nm.

A curva padrão de albumina foi feita com as concentrações de 2,5μg/ml, 10μg/ml, 25μg/ml e 50μg/ml. A curva padrão, mostrada na Figura 10, relaciona a concentração protéica das soluções com a leitura de absorbância no Espectrofotômetro Shimadzu no comprimento de onda igual a 750 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.

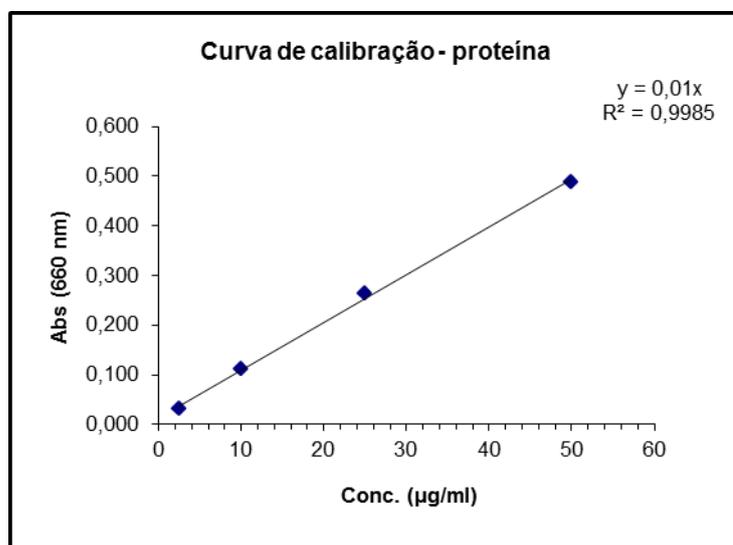


Figura 11. Curva padrão de albumina.

3.7.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As eletroforeses desnaturantes foram feitas em gel de poliacrilamida a 12,5% e 0,75 mm de espessura. Foram aplicadas 15µg de proteínas dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625M, 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 120V por aproximadamente 1h15min 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%.

3.8. Atividade peroxidásica em gel de poliacrilamida

A atividade peroxidásica dos extratos bacterianos foi realizada após eletroforese não desnaturante. As eletroforeses não desnaturantes, feitas na ausência de SDS, foram realizadas em gel de poliacrilamida 12,5%, e 0,75 mm de espessura. Foram aplicadas 60 µg de proteínas dissolvidas em tampão de amostra

(Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8 contendo glicerol 10% e azul de bromofenol 0,0005%). As corridas eletroforéticas foram feitas a 120 V por aproximadamente 1h30min, em tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM). O gel foi fixado com TCA 12,5% por 30 minutos e lavado, em água destilada, por 30 min. Para revelação da atividade, os géis foram submersos em 20 mL de tampão citrato de sódio 0,05M, 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.

3.9. Western blotting

Quinze microgramas de proteínas bacterianas foram submetidas a uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12,5%. Após a corrida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 19,2 mM, 200 mL de metanol) a 100 V por 1h. A membrana foi bloqueada com PBS Tween 0,3% por 1h a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida a membrana foi lavada com PBS Tween 0,05% 3 vezes por 5 min e em seguida incubada com anticorpo policlonal anti-hemoglobina humana (Sigma) na diluição 1:5000 por 1h à 37°C sob leve agitação. Decorrido o tempo de incubação, a membrana foi lavada por 2 vezes com PBS Tween 0,05% por 5 min e em seguida incubada com anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Sigma) na diluição 1:5000 por 1h à temperatura ambiente sob leve agitação. Após a incubação a membrana foi lavada com PBS Tween 0,05% por 2 vezes por 5 min e em seguida com PBS por 5 min 3 vezes. No experimento foi utilizada albumina como controle negativo e hemoglobina como controle positivo.

Após a lavagem, os sinais da membrana foram detectados por quimioluminescência usando o ECLTM Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, UK) da seguinte forma. O excesso do tampão de lavagem foi drenado e a membrana foi colocada em um cassete de autorradiografia. Sobre a membrana foi colocada o reagente de detecção e um plástico fino, e exposta ao filme ECL Hyperfilm-MP (GE Healthcare, UK) durante 1 min. Para revelação o filme foi colocado por 30 seg no revelador (Kodak), lavado em água e em seguida no fixador (Kodak) por 30 seg. Os filmes foram digitalizados e analisados.

4. Resultados

4.1. Atividade hemolítica dos isolados bacterianos

Os 9 isolados bacterianos (tabela 1) foram inoculados em meio de cultura BHI suplementado com sangue (figura 12, colunas B, D e F). Destes, *A. hydrophila*, *C. kwangyangense*, *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *Serratia* sp. e *P. putida* apresentaram atividade hemolítica. Em *C. kwangyangense*, *Pantoea* sp. e *Serratia* sp. pode-se observar claramente a formação de zona transparente (zona de lise total) ao redor das colônias. Já em outras, mesmo não sendo possível a visualização clara do halo verifica-se que essas colônias mudaram de cor, indicando que houve lise de hemácias, hidrólise de hemoglobina e incorporação de heme (ver resultados das próximas figuras).

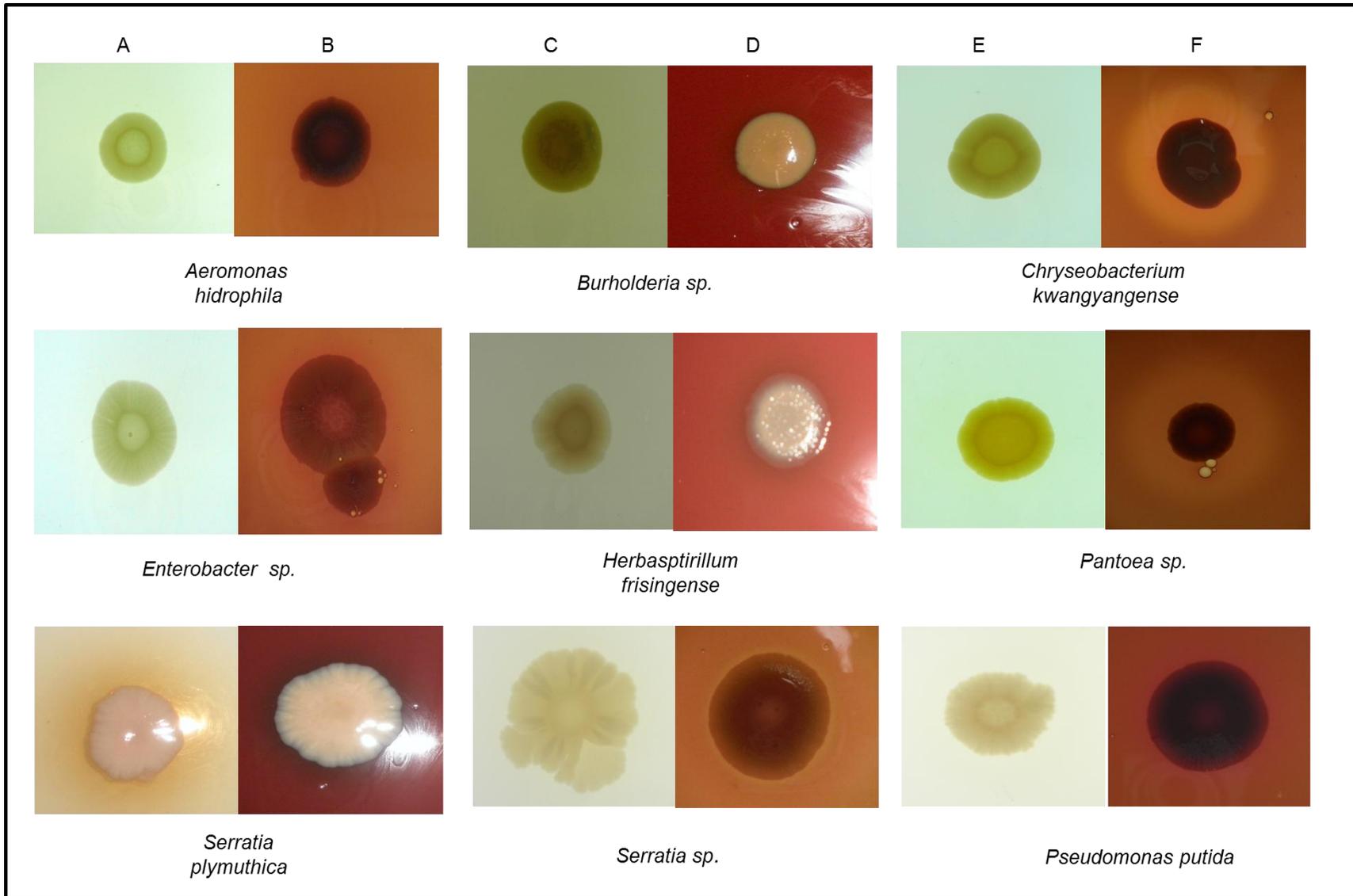


Figura 12. Atividade hemolítica dos isolados bacterianos. Cultivo dos isolados bacterianos em meio BHI (colunas A, C e E) e BHI suplementado com 4% sangue (colunas B, D e F).

4.2. Atividade hemoglobínásica

A atividade hemoglobínásica dos isolados bacterianos foi verificada adicionando-se hemoglobina bovina ao meio de cultura (colunas B, D e F). Observou-se que *C. kwangyangense*, *Pantoea sp* e *Serratia sp* possuem a capacidade de hidrolisar a hemoglobina, já que apresentaram a formação de halo marcante ao redor das colônias além de escurecimento das mesmas (figura 13). Já em *P. putida* é possível verificar apenas o escurecimento da colônia evidenciando a incorporação do heme adquirido a partir da hemoglobina.

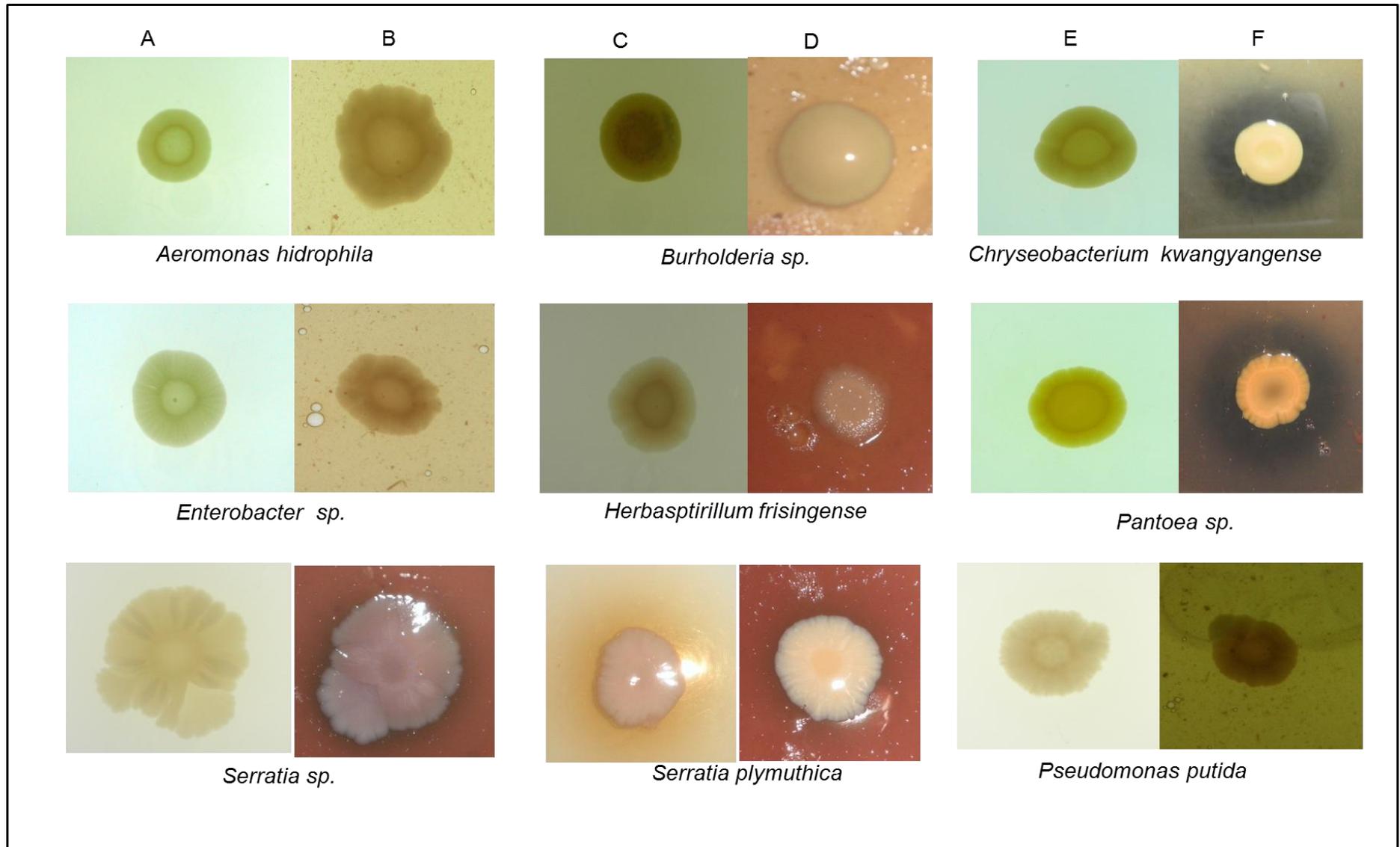


Figura 13. Atividade hemoglobínica dos isolados bacterianos. Cultivo dos isolados bacterianos em meio BHI (colunas A,C e E) e BHI suplementado com 4mg/mL de hemoglobina (colunas B,D e F).

4.3. Incorporação de heme

Observou-se a capacidade de incorporação de heme pelos isolados bacterianos por meio de seu cultivo em meio BHI suplementado com hemina (colunas B, D e F). Todos os isolados testados foram capazes de crescer neste meio, porém *Serratia sp.*, *S. plymuthica* e *P. putida* apresentaram uma coloração marrom escura, sugerindo uma maior capacidade de incorporação de heme (figura 14).

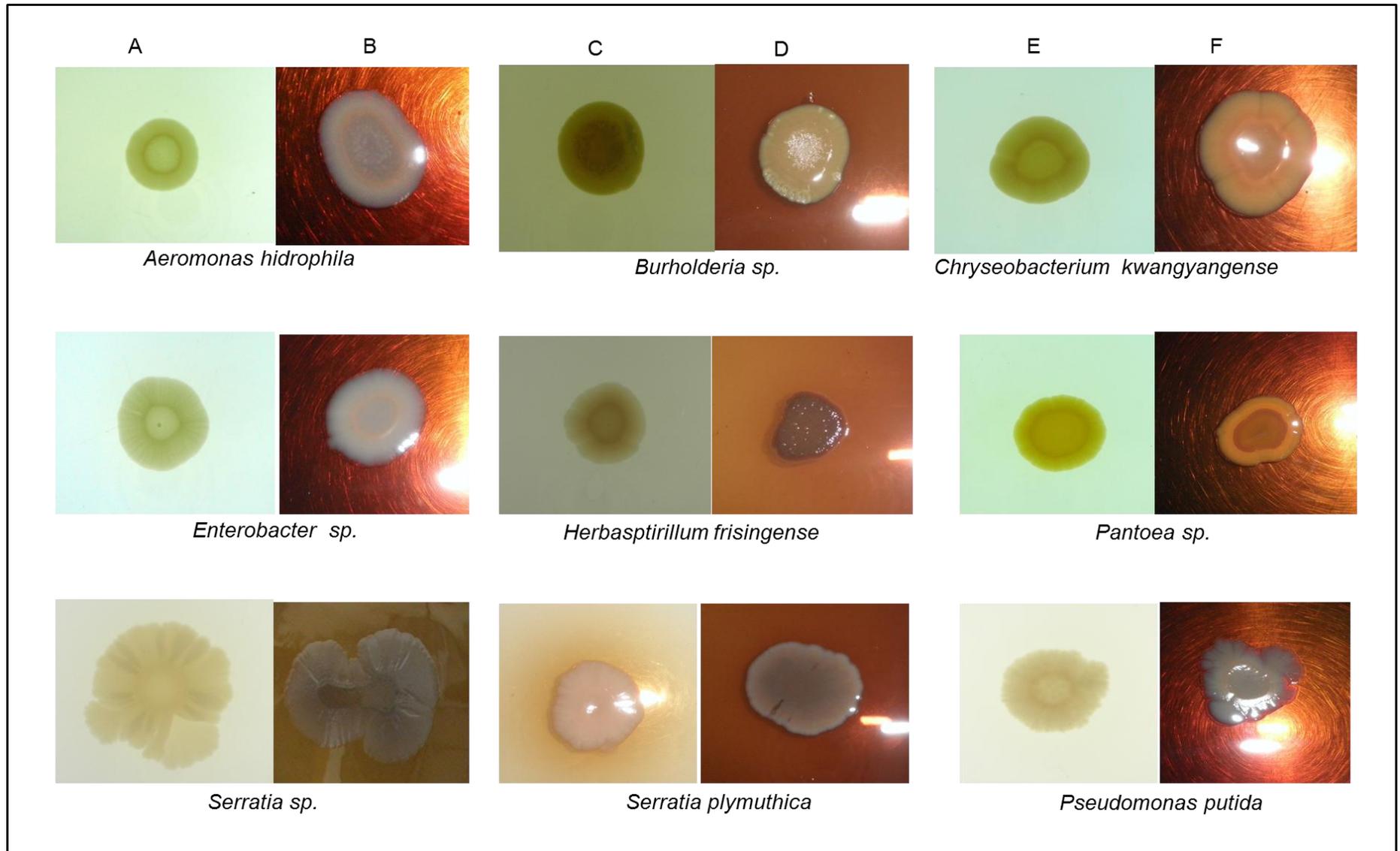


Figura 14. Incorporação de heme. Cultivo dos isolados bacterianos em meio BHI (colunas A, C e E) e BHI suplementado com 5mM de hemina (colunas B, D e F).

4.4. Microscopia de fluorescência e espectrofluometria

Para acompanhar a captação de ZnPPIX, um análogo fluorescente do heme, as bactérias isoladas de intestino médio de *Ae. aegypti*, foram incubadas em 30 μM de ZnPPIX. As imagens foram captadas após 10, 30, 45 e 60 minutos de incubação. Todas as bactérias foram capazes de incorporar ZnPPIX. A espectrofluometria foi realizada em paralelo à microscopia com as mesmas amostras e em três tempos incubação diferente.

4.4.1 *Aeromonas hydrophila*

Na figura 15, verificou-se por microscopia de fluorescência (coluna à direita), que *A. hydrophila* foi capaz de incorporar ZnPPIX. Após 10 min de incubação com o análogo de heme observou-se baixa emissão de fluorescência pelas células bacterianas, que se intensificou nos tempos seguintes. Na figura 16, constatou-se que *A. hydrophila* incorporou ZnPPIX em concentrações que variaram de 0,37 a 0,55 μM .

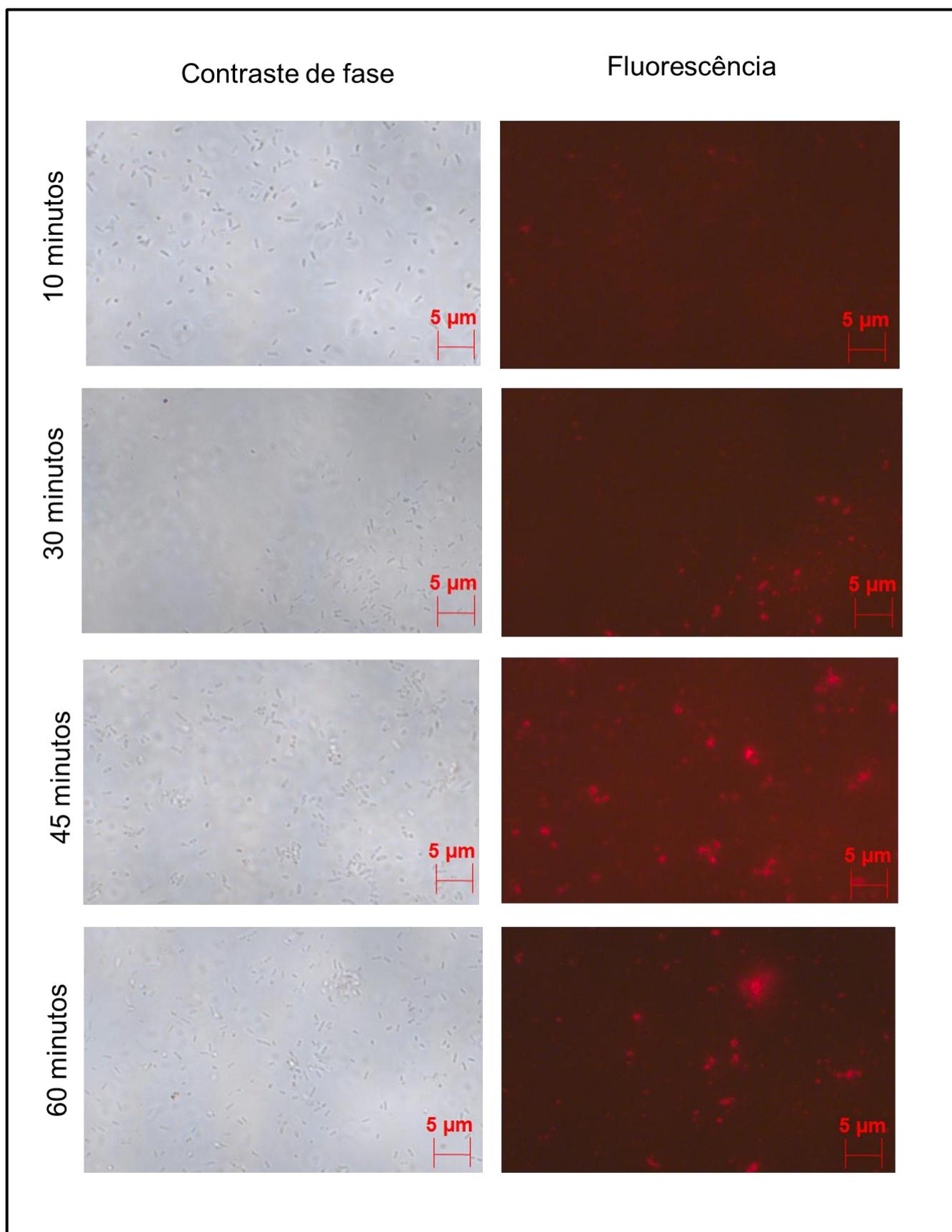


Figura 15. Microscopia de fluorescência de *Aeromonas hydrophila* incubada com 30 μ M de ZnPPIX.

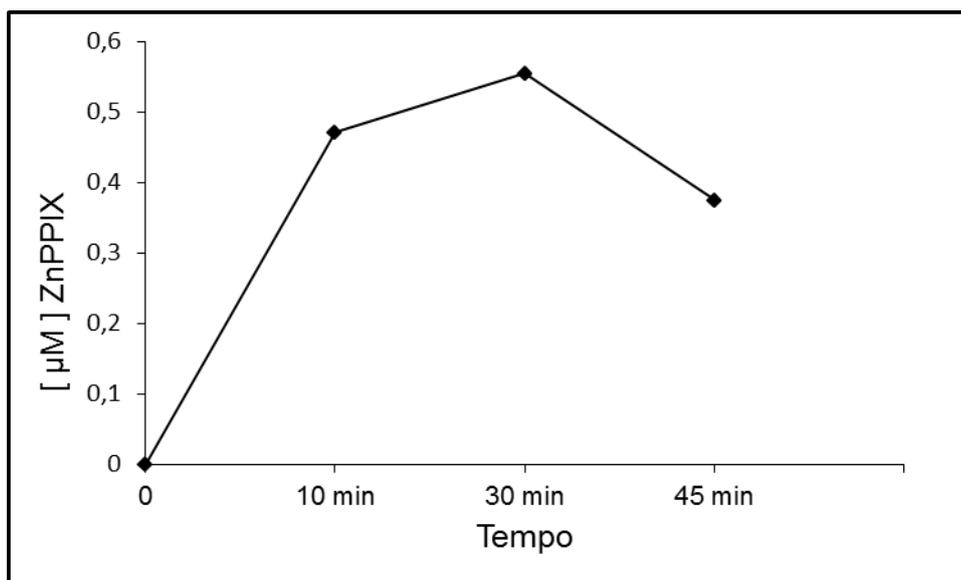


Figura 16. Espectrofluometria de *Aeromonas hydrophila* incubada com 30 µM de ZnPPIX. Em 10 min *Aeromonas hydrophila* incorporou 0,47 µM; em 30 min 0,55 µM; em 45 min 0,37 µM.

4.4.2. *Burkholderia sp.*

Foi possível observar que *Burkholderia sp.* também incorporou ZnPPIX em todos os tempos testados (figura 17). É importante salientar que nos tempos 30 e 60 min houve redução do número de bactérias no campo analisado, como consequência, também se verificou redução, nestes tempos, na emissão de fluorescência. Com base no perfil das leituras geradas na espectrofluometria pode-se verificar variação na incorporação ZnPPIX de 1,27 a 2,88 µM (figura 18).

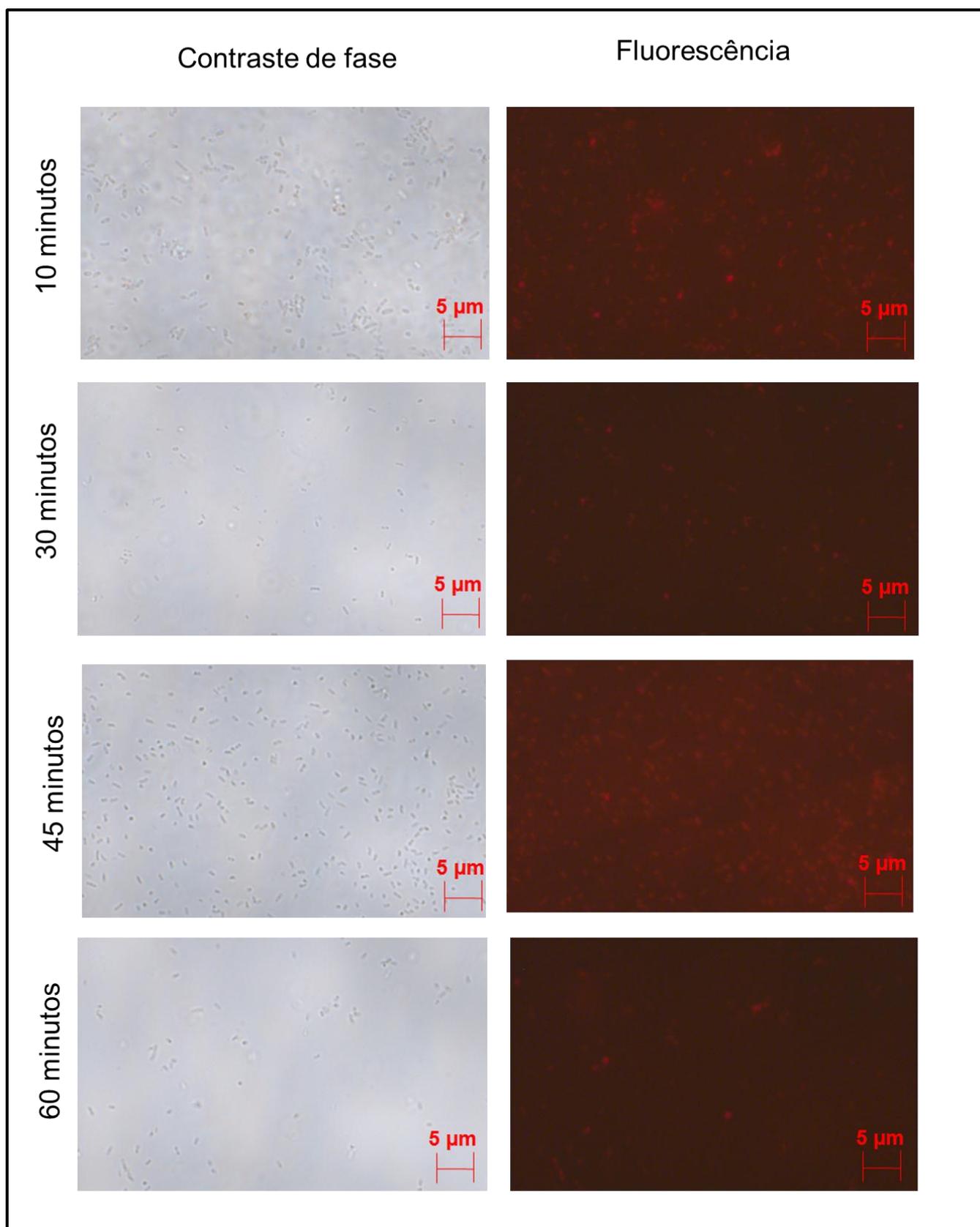


Figura 17. Microscopia de fluorescência de *Burkholderia sp* incubada com 30 μM de ZnPPIX.

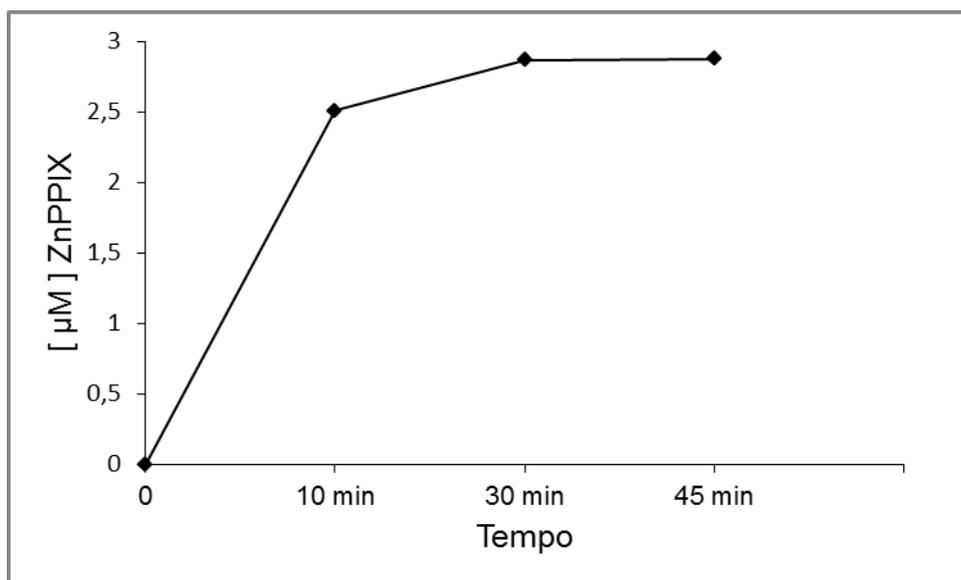


Figura 18. Espectrofluometria de *Burkholderia sp* incubada com 30 μM de ZnPPIX. Em 10 min *Burkholderia sp.* incorporou 2,51 μM ; em 30 min 2,87 μM ; em 45 min 2,88 μM .

4.4.3. *Chryseobacterium kwangyangense*

C. kwangyangense foi capaz de incorporar ZnPPIX nos tempos testados. Verificou-se melhor visualização das células bacterianas por contraste de fase e fluorescência nos tempos 10 e 30 min (figura 19). Na figura 20 constatou-se que *C. kwangyangense* incorporou ZnPPIX em concentrações que variaram de 1,79 a 1,84 μM .

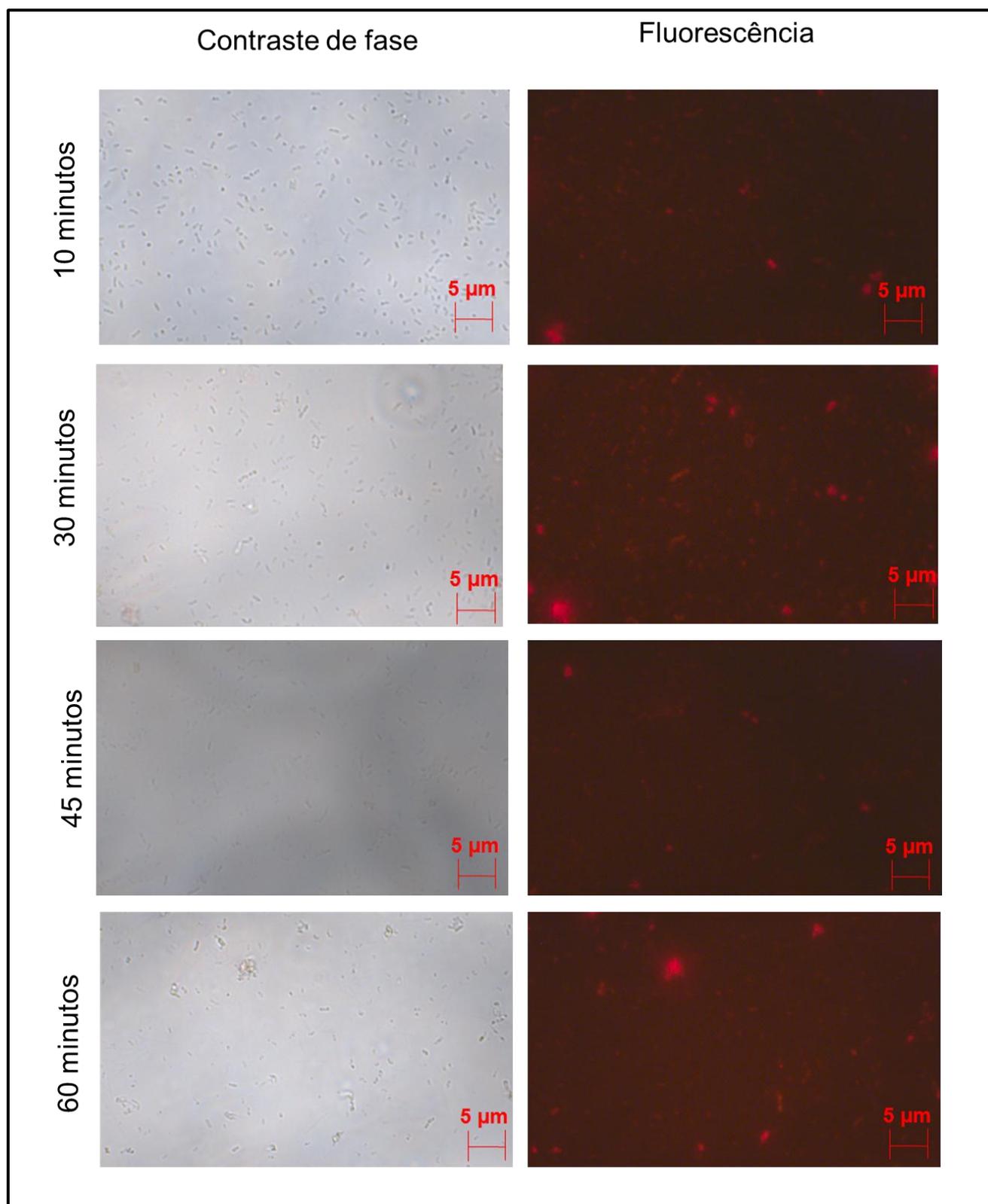


Figura 19. Microscopia de fluorescência de *Chryseobacterium kwangyangense* incubada com 30 μM de ZnPIX.

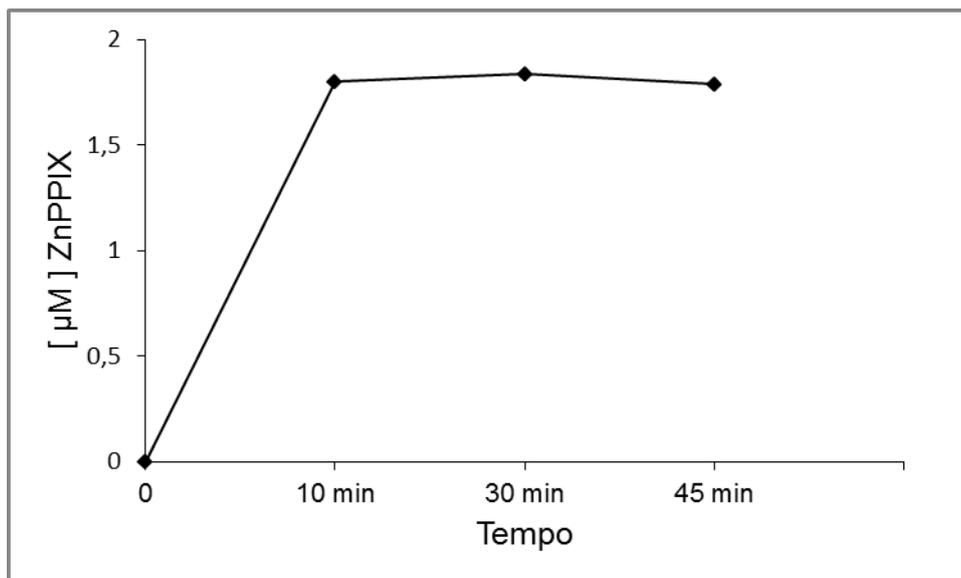


Figura 20. Espectrofluometria de *Chryseobacterium kwangyangense* incubada com 30 µM de ZnPPiX. Em 10 min *Chryseobacterium kwangyangense* incorporou 1,80 µM; em 30 min 1,84 µM; em 45 min 1,79 µM.

4.4.4. *Enterobacter sp.*

Na figura 21, pode-se observar que *Enterobacter sp* foi capaz de incorporar ZnPPiX em baixas concentrações, pois verifica-se pouca emissão de fluorescência pelas células bacterianas principalmente 45 e 60 min após a incubação com ZnPPiX. Segundo dados da espectrofluometria *Enterobacter sp.* assimilou o análogo do heme em concentrações que variaram de 0,09 – 0,2 µM. A assimilação foi linear até 45 min de incubação (figura 22).

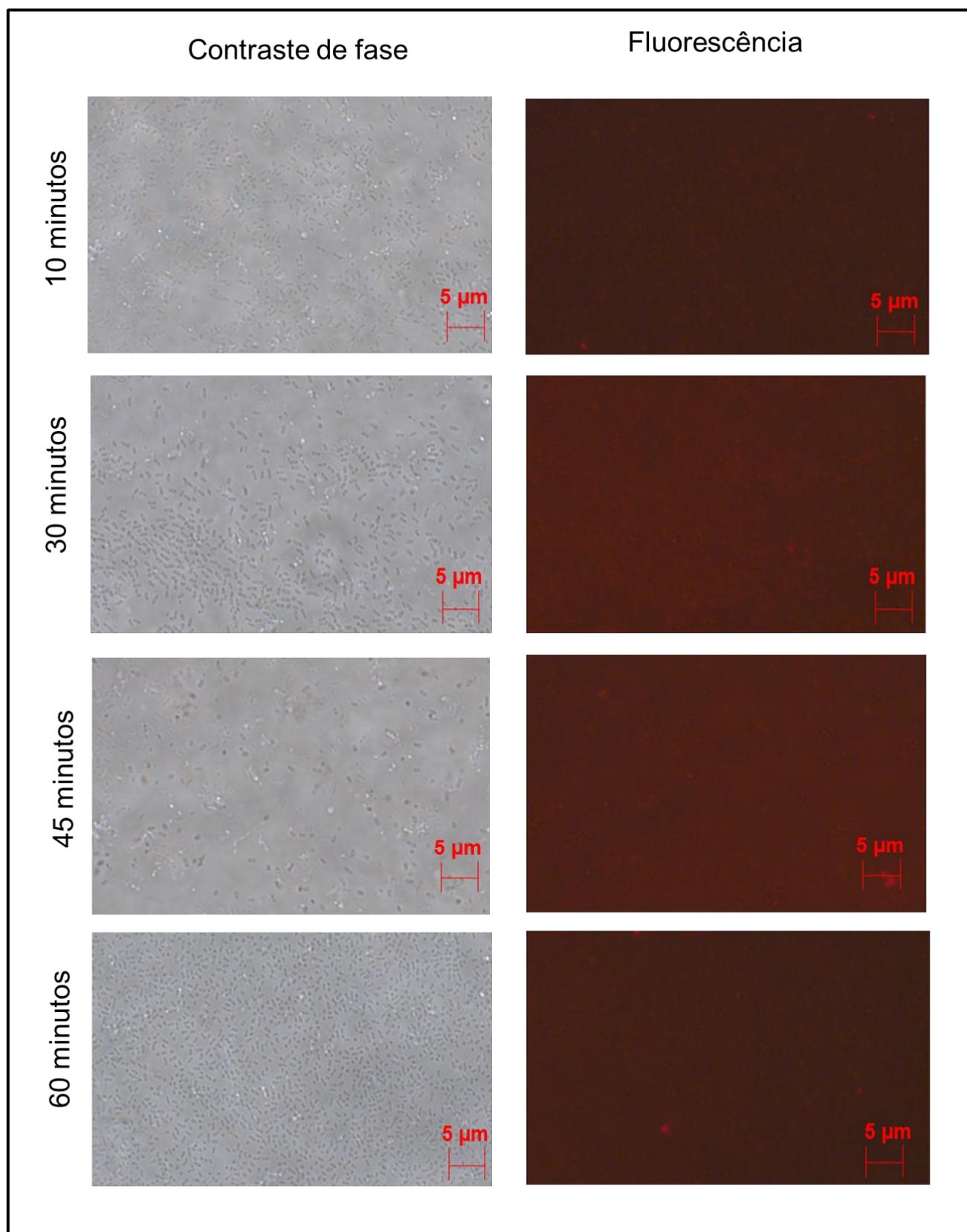


Figura 21. Microscopia de fluorescência de *Enterobacter sp.* incubada com 30 µM de ZnPIX.

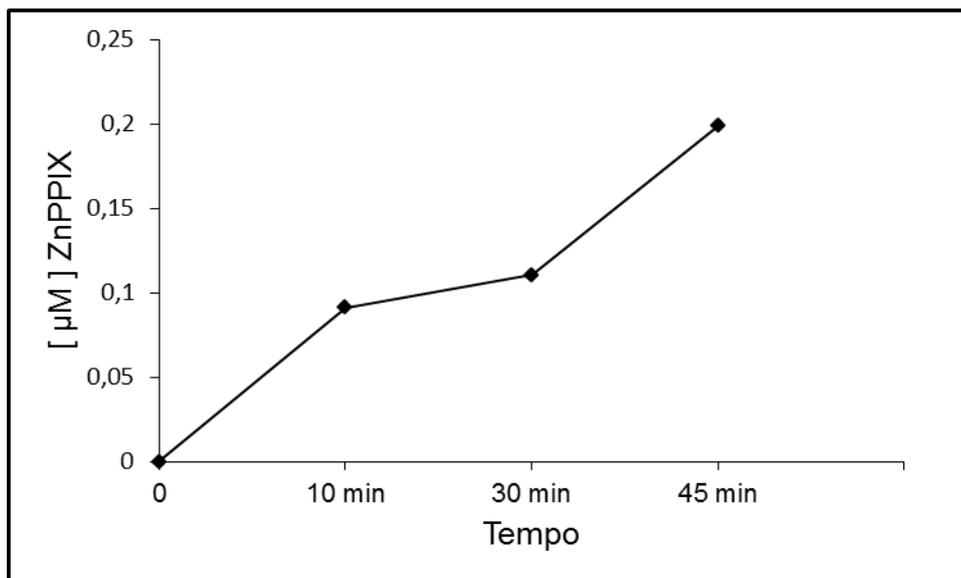


Figura 22. Espectrofluometria de *Enterobacter sp.* incubada com 30 µM de ZnPPIX. Em 10 min *Enterobacter sp.* incorporou 0,09 µM; em 30 min 0,11 µM; em 45 min 0,20 µM.

4.4.5. *Herbaspirillum frisingense*

Na figura 23 a microscopia revelou um aumento gradual na emissão de fluorescência nos tempos de 10, 30, 45 e 60 min. *H. frisingense* apresenta o perfil de incorporação de ZnPPIX variando de 1,82 – 3,43 µM. Houve aumento linear da incorporação de ZnPPIX pelo microrganismo nos tempos de 10, 30, e 45 min, como mostrado na figura 24.

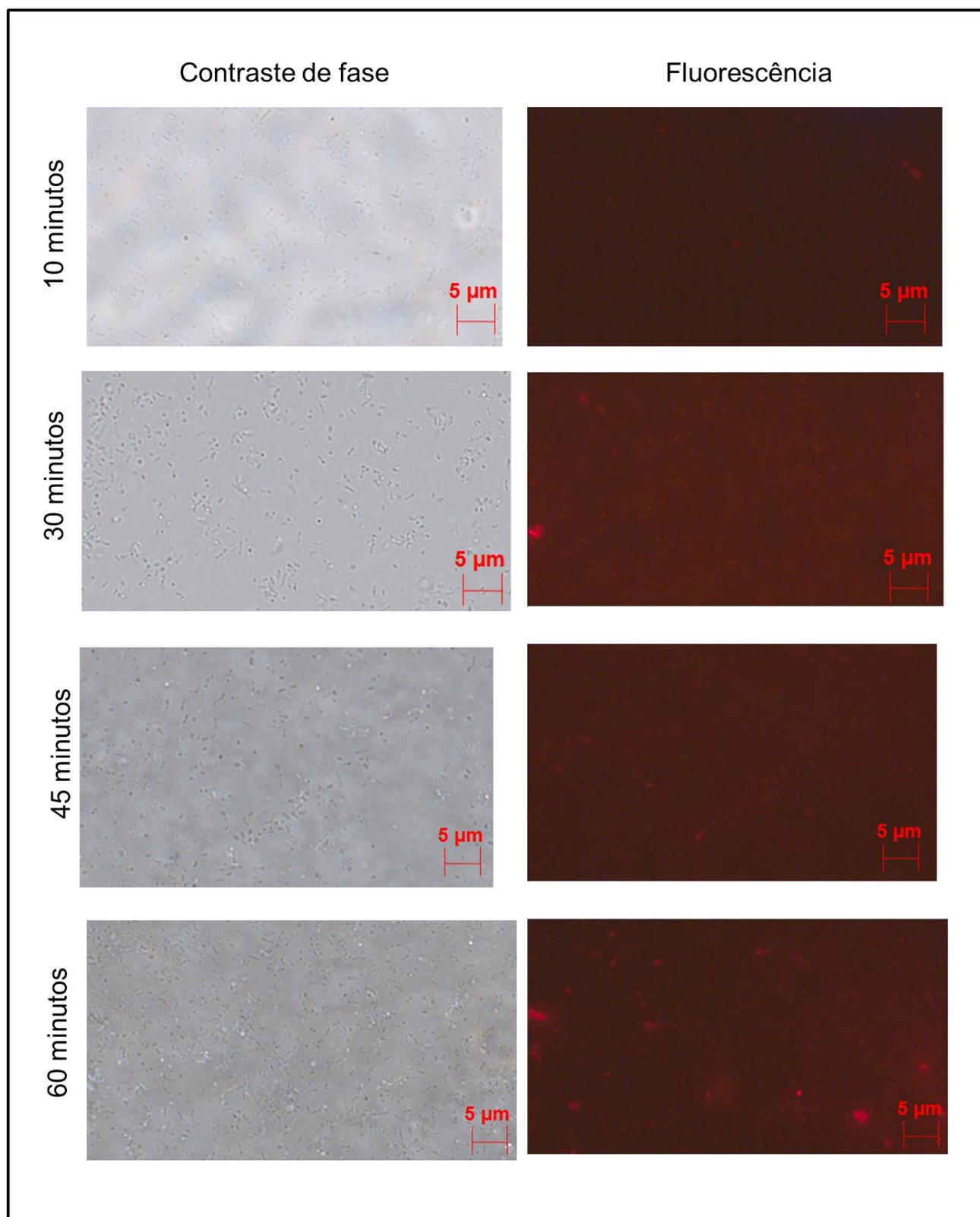


Figura 23. Microscopia de fluorescência de *Herbaspirillum frisingense* incubada com 30 μM de ZnPPIX.

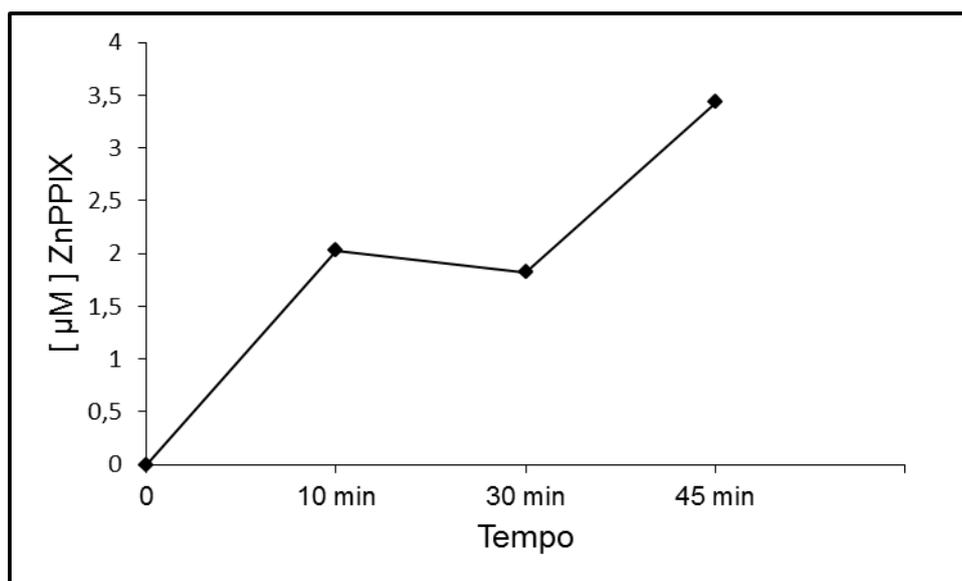


Figura 24. Espectrofluometria de *Herbaspirillum frisingense* incubada com 30 µM de ZnPPiX. Em 10 min *herbaspirillum frisingense* incorporou 2,03 µM; em 30 min 1,82 µM; em 45 min 3,43 µM.

4.4.6. *Pantoea sp.*

Na figura 25 verifica-se que *Pantoea sp.* foi capaz de incorporar ZnPPiX principalmente 10 e 60 min após a incubação. O perfil de incorporação de ZnPPiX por *Pantoea sp.* (figura 26) variou de 1,06 a 2,23 µM. Houve incorporação máxima em 10 min e queda nos demais tempos.

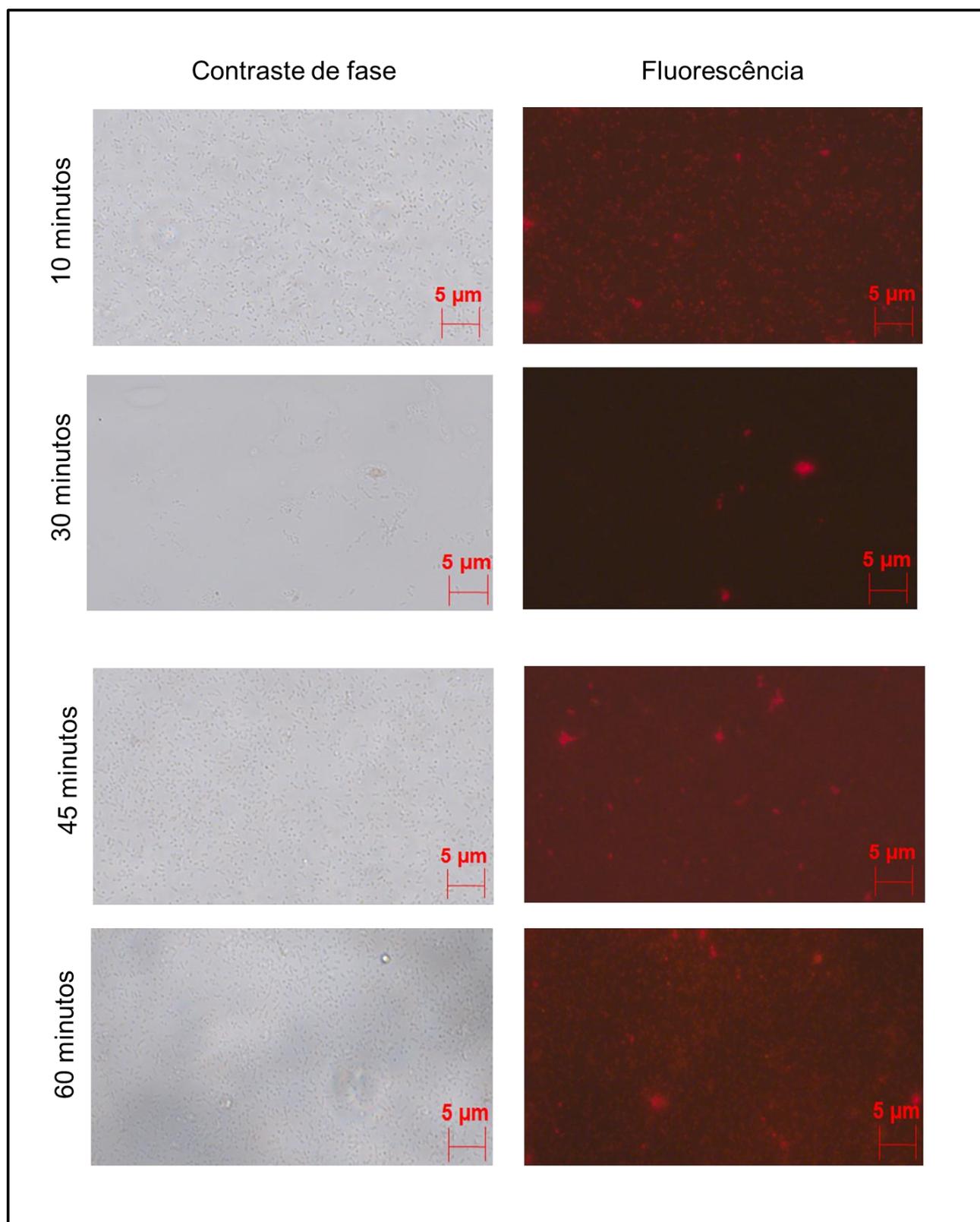


Figura 25. Microscopia de fluorescência de *Pantoea sp.* incubada com 30 µM de ZnPPiX.

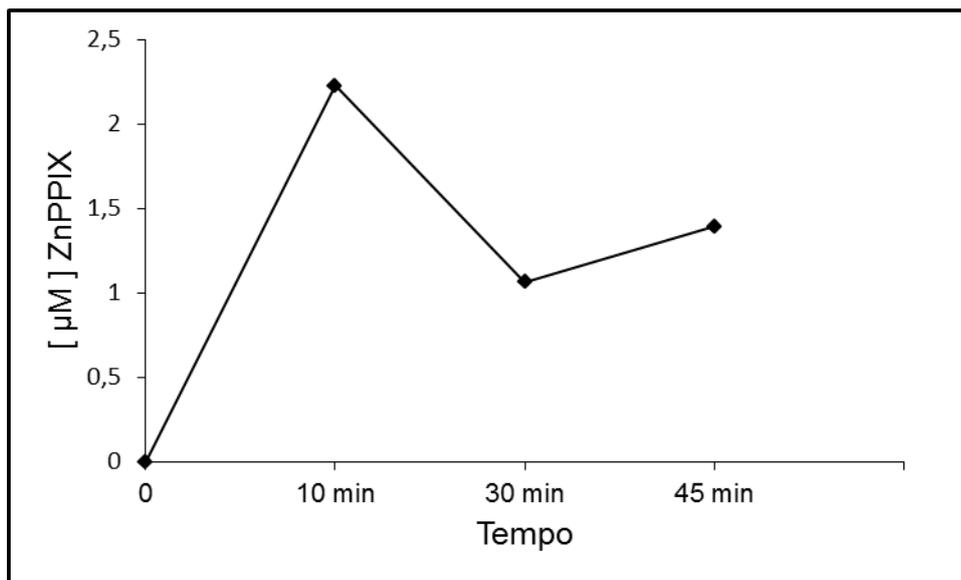


Figura 26. Espectrofluometria de *Pantoea sp.* incubada com 30 µM de ZnPPIX. Em 10 min *Pantoea sp.* incorporou 2,23 µM; em 30 min 1,06 µM; em 45 min 1,39 µM.

4.4.7. *Pseudomonas putida*

Foi possível observar que *P. putida* incorporou ZnPPIX em todos os tempos testados (figura 27). O perfil de emissão de fluorescência foi bastante similar em todos os tempos analisados. Com base no perfil das leituras geradas na espectrofluometria verificou-se que *P. putida* apresentou os maiores valores de incorporação de ZnPPIX (de 3,67 a 4,29 µM) entre as bactérias testadas (figura 28).

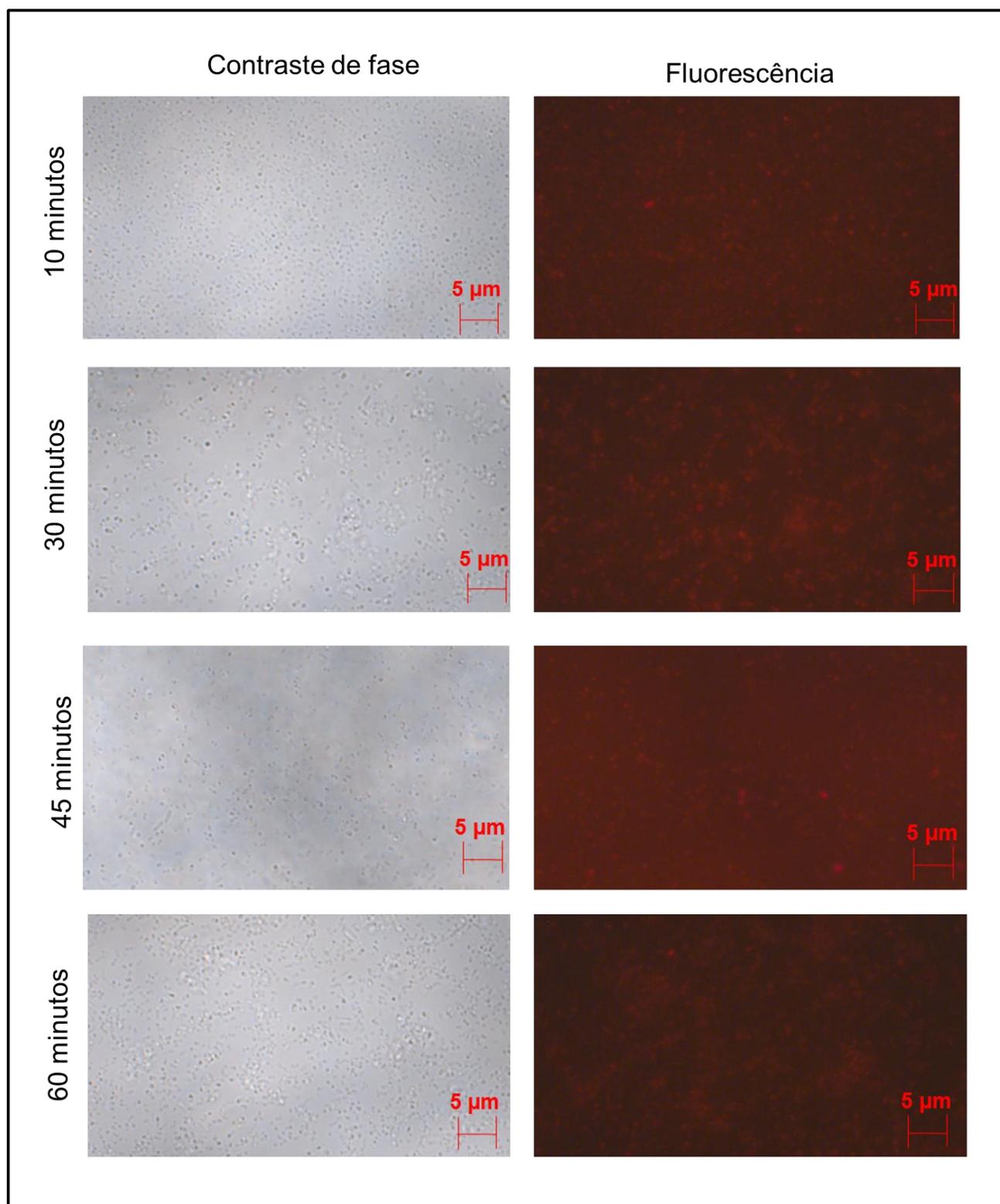


Figura 27. Microscopia de fluorescência de *Pseudomonas putida* incubada com 30 µM de ZnPPIX.

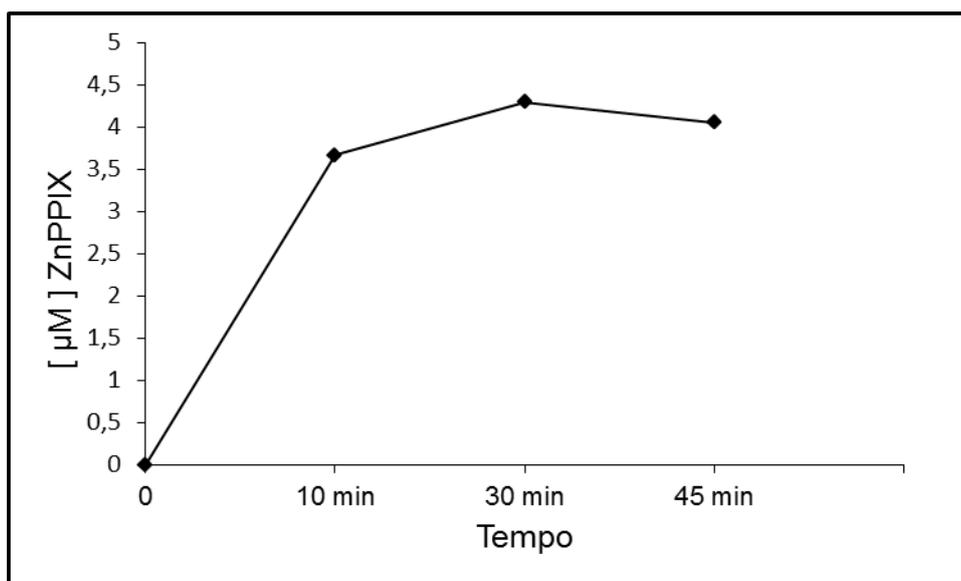


Figura 28. Espectrofluometria de *Pseudomonas putida* incubada com 30 μM de ZnPPIX. Em 10 min *Pseudomonas putida* incorporou 3,67 μM ; em 30 min 4,29 μM ; em 45 min 4,05 μM .

4.4.8. *Serratia plymuthica*

S. plymuthica foi capaz de incorporar ZnPPIX nos tempos testados, entretanto verifica-se melhor visualização de fluorescência nas células bacterianas nos tempos 10 e 60 min devido a um maior número de bactéria no campo analisado (figura 29). Por espectrofluometria observa-se variação da incorporação de 1,83 a 3,83 μM (figura 30).

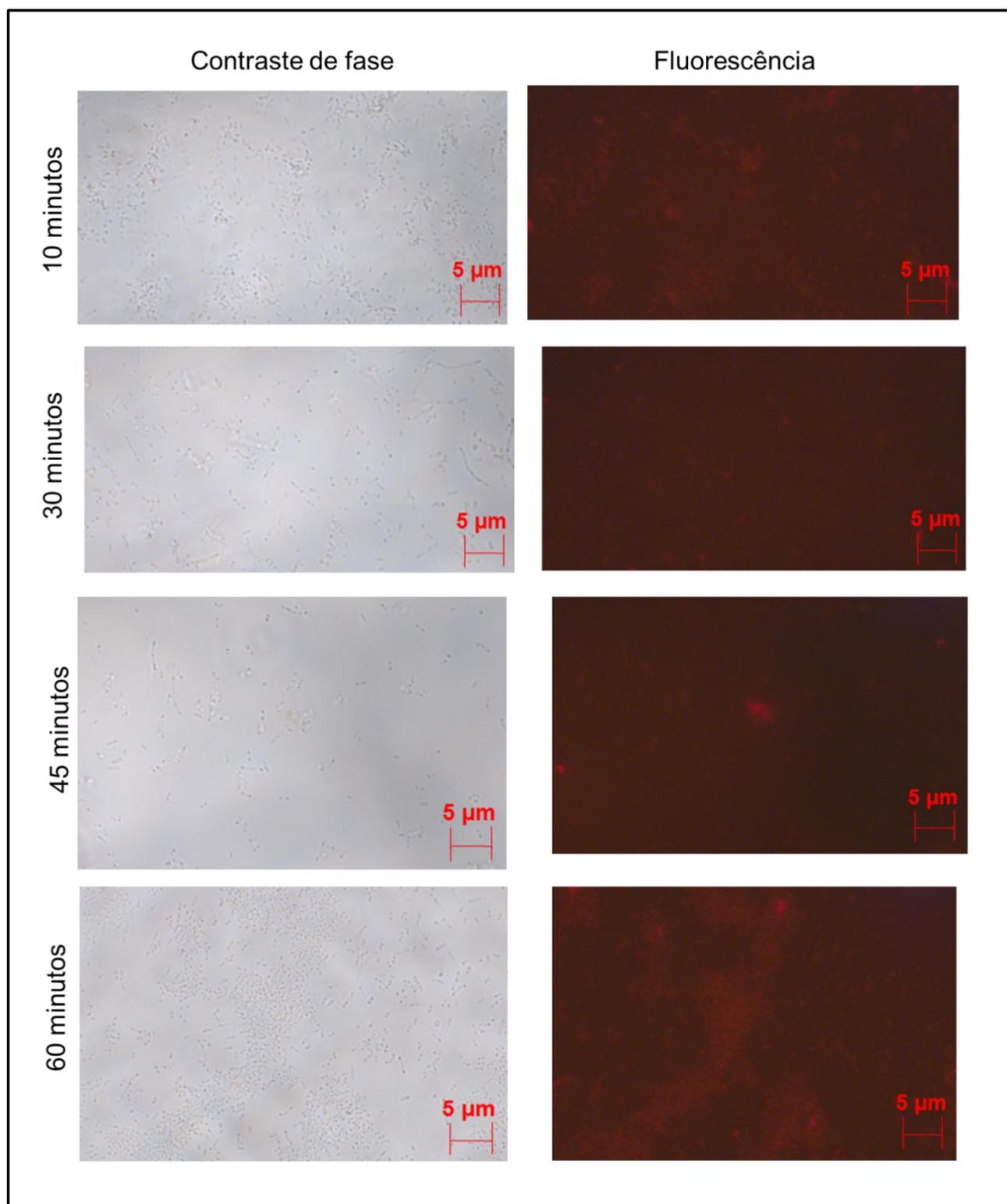


Figura 29. Microscopia de fluorescência de *Serratia plymuthica* incubada com 30 μM de ZnPPiX.

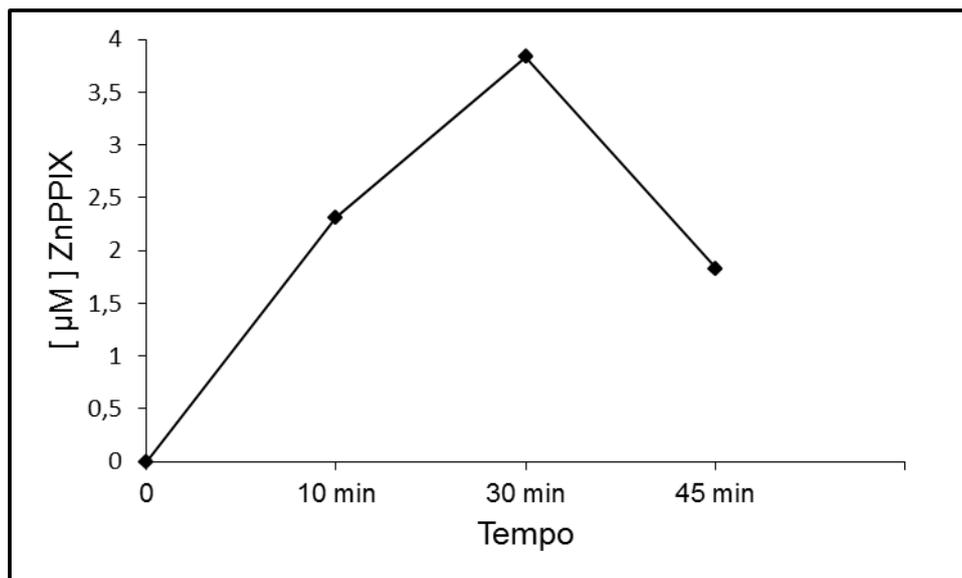


Figura 30. Espectrofluometria de *S. plymultica* incubada com 30 μM de ZnPPIX. *S. plymultica* incorporou 2,32 μM em 10 min, 3,83 μM em 30 min e 1,83 μM em 45 min.

4.4.9. *Serratia sp.*

Por microscopia de fluorescência observou-se baixa emissão de fluorescência por *Serratia sp.*, apesar de se verificar por contraste de fase um grande número de bactérias nos campos analisados (figura 31). Na figura 32 constata-se que a incorporação de ZnPPIX foi baixa e constante ao longo do tempo, permanecendo entre 0,11 – 0,16 μM .

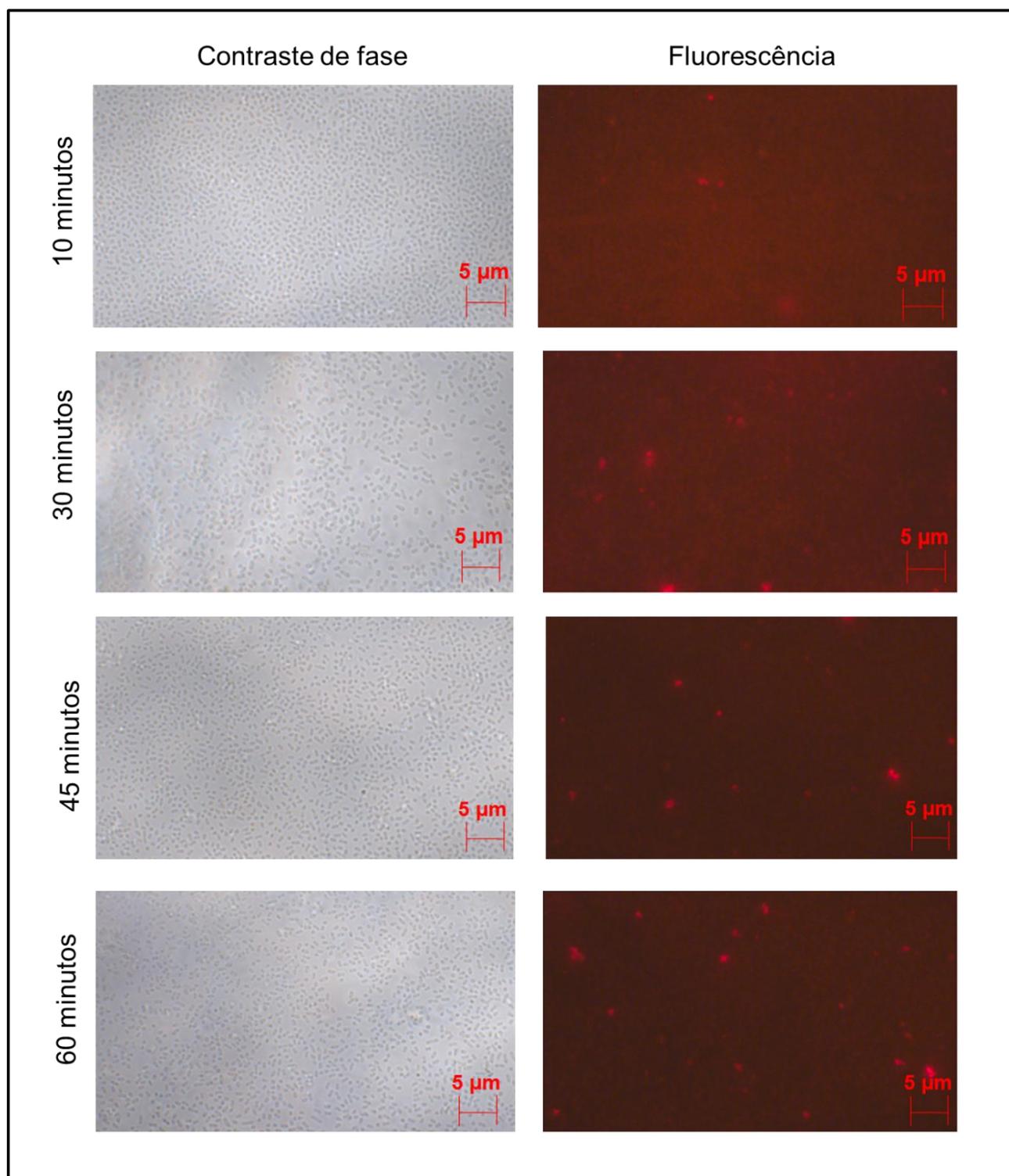


Figura 31. Microscopia de fluorescência de *Serratia* sp. incubada com 30 μ M de ZnPPIX.

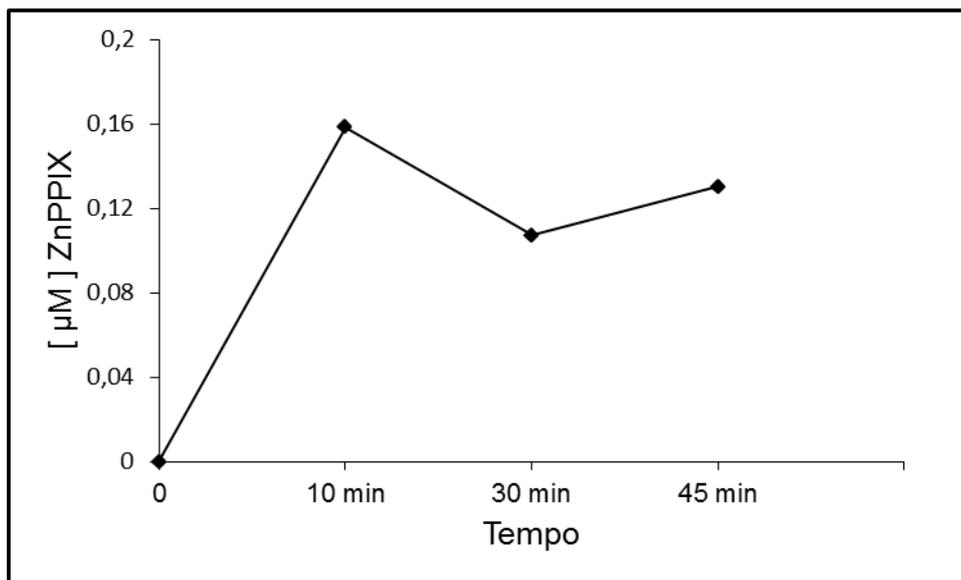


Figura 32. Espectrofluometria de *Serratia sp.* incubada com 30 µM de ZnPPIX. Em 10 min *Serratia sp.* incorporou 0,16 µM; em 30 min 0,11 µM; em 45 min 0,13 µM.

Na figura 33 foram reunidas todas as cinéticas de incorporação de ZnPPIX de todas as bactérias utilizadas neste estudo. Vê-se que a bactéria *P. putida* incorpora cerca de 39 vezes mais ZnPPIX do que *Serratia sp.* e *Enterobacter sp.*, bactérias que tiveram a menor incorporação durante o tempo de ensaio.

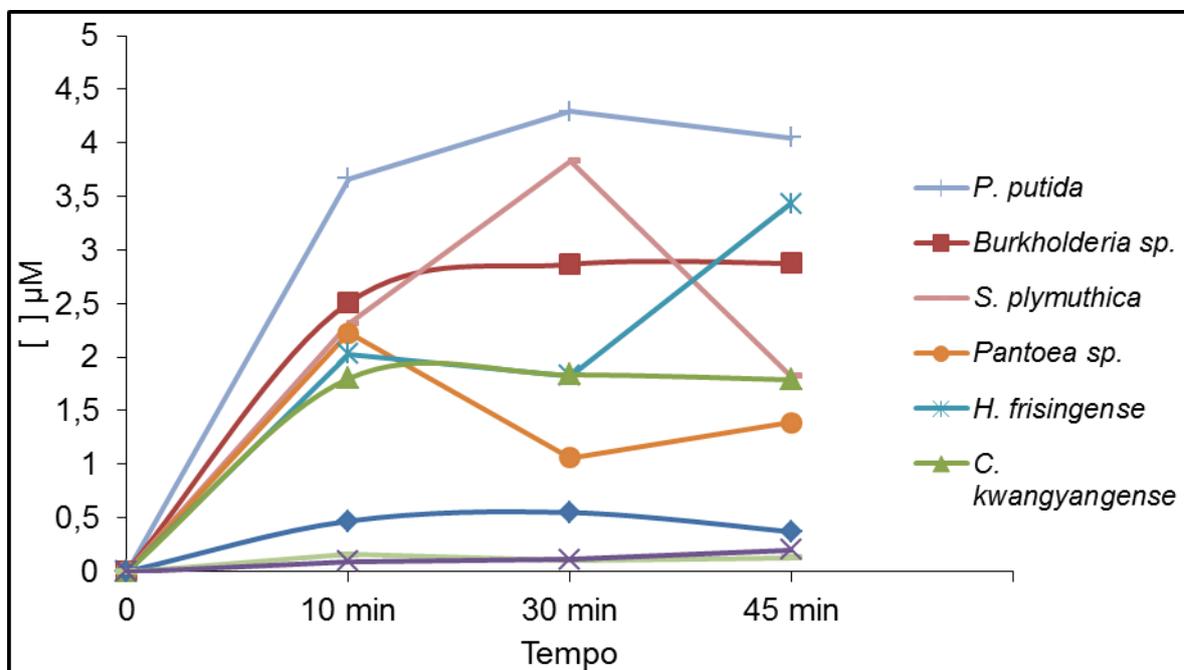


Figura 33. Captação de ZnPPIX pelos isolados bacterianos.

4.4.10. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e *Gluconacetobacter diazotrophicus pqqC*

Na microscopia de fluorescência realizada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e *Gluconacetobacter diazotrophicus pqqC*, não se observou incorporação de ZnPPIX pelas células bacterianas (figura 34 e 35). As leituras feitas no espectrofluorímetro confirmam o resultado da microscopia de fluorescência já que apresentaram em ambos os casos valores negativos (dados não mostrados).

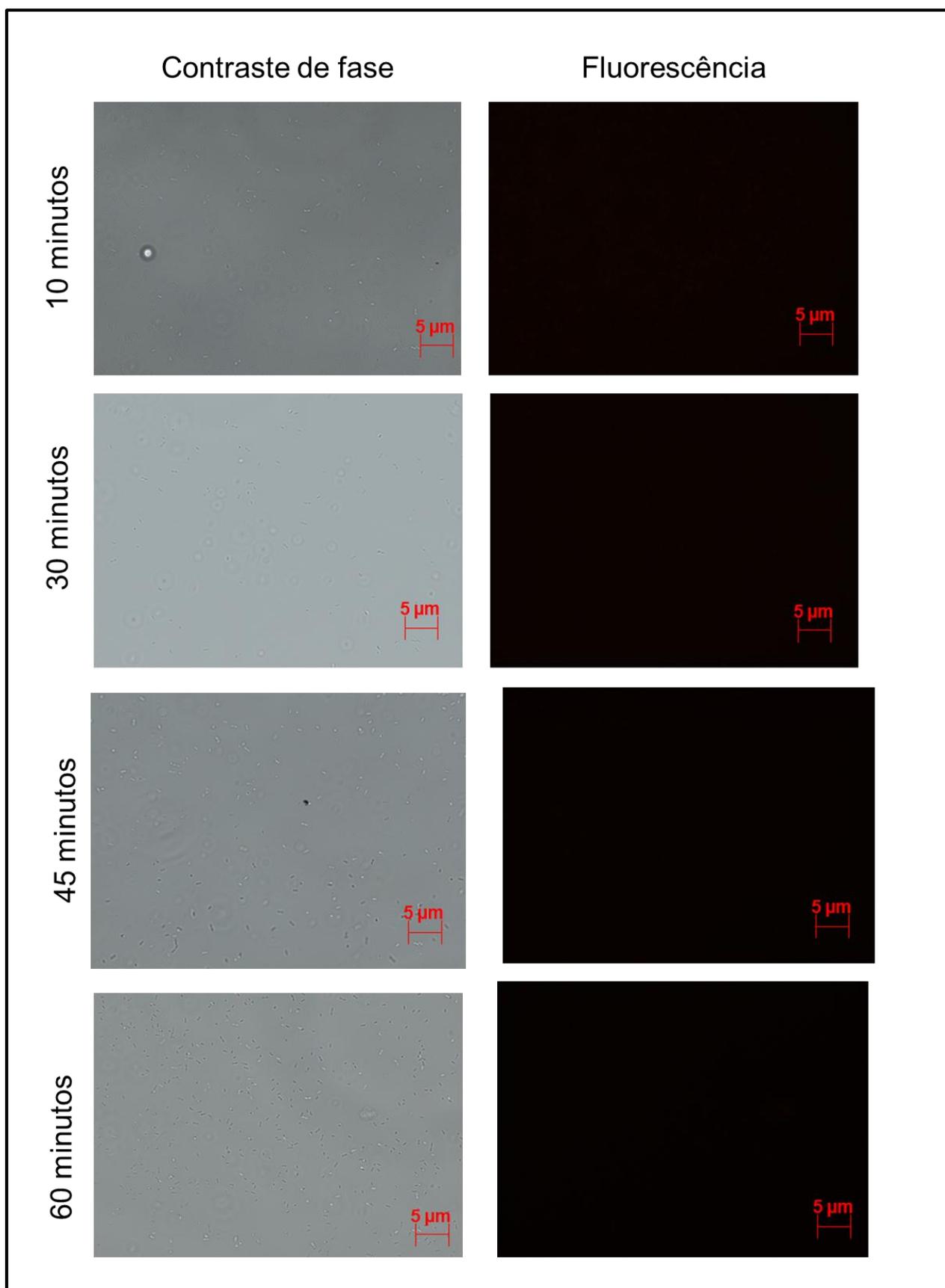


Figura 34. Microscopia de fluorescência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

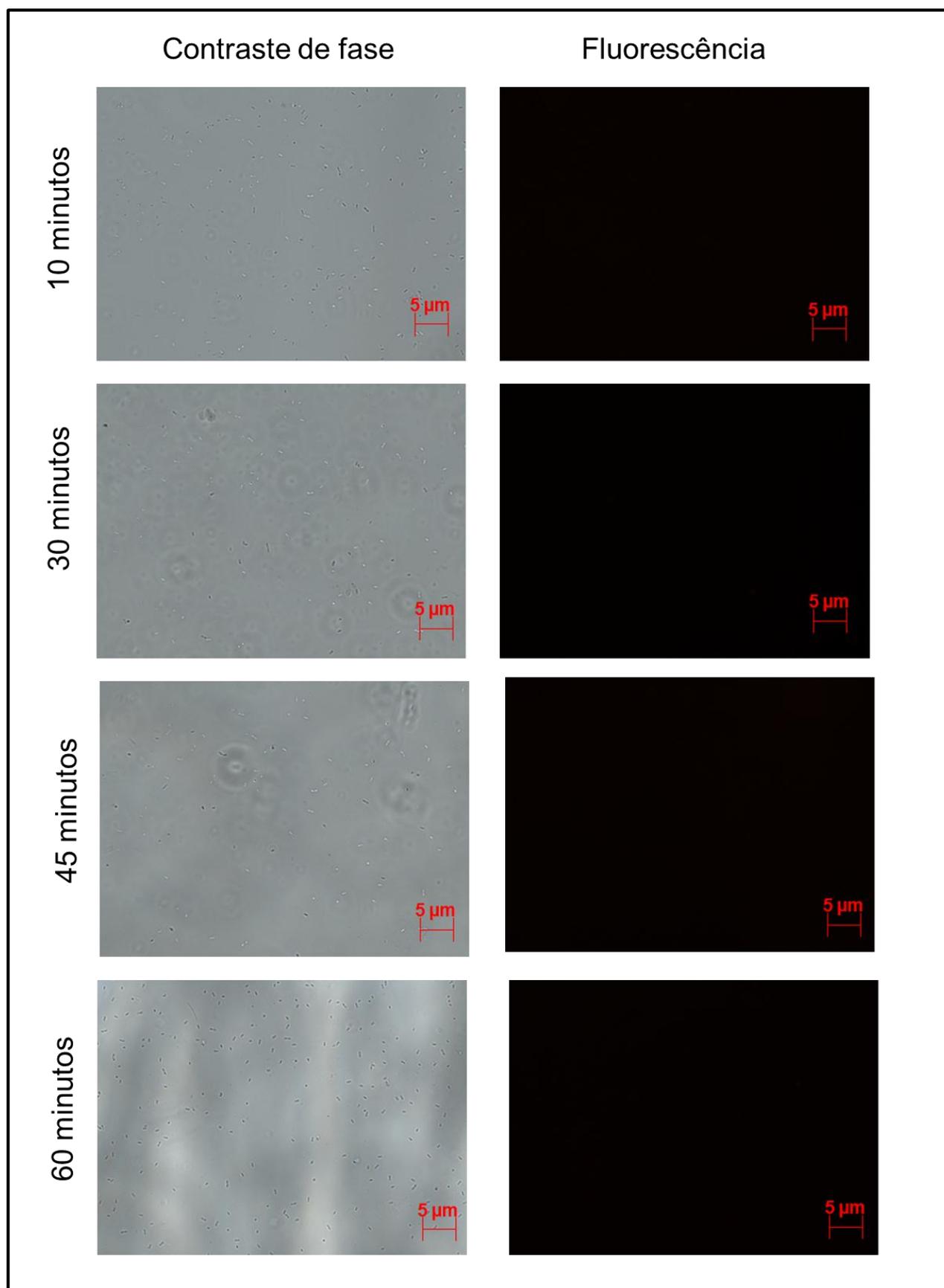


Figura 35. Microscopia de fluorescência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PqqC.

4.5. Análise do perfil proteico de bactérias crescidas em meio BHI contendo sangue, hemina e hemoglobina

As figuras 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 apresentam perfil proteico em gel desnaturante (painel A) e atividade peroxidásica (painel B) das bactérias *A. hydrophila*, *Burkholderia sp*, *C. kwangyangense*, *Enterobacter sp*, *H. frisingense*, *Pantoea sp*, *P. putida*, *S. plymuthica* e *Serratia sp*. respectivamente, cultivadas em BHI (raia 1) e BHI suplementado com sangue (raia 2) heme (raia 3) ou hemoglobina (raia 4) .

4.5.1. *Aeromonas hydrophila*

Podem-se verificar algumas alterações nos perfis proteicos de acordo com a suplementação utilizada no meio de cultivo. Observaram-se proteínas com peso molecular variando de a 45 kDa a 66,2 kDa (seta **a**), nas bactérias que cresceram na presença de hemoglobina, e aparecimento de bandas abaixo de 21.5 kDa (seta **b**) nas bactérias cultivadas na presença de sangue, heme ou hemoglobina, respectivamente. Verificou a presença de, pelo menos, uma proteína com atividade heme-peroxidásica quando esta bactéria foi cultivada em meio suplementado com sangue (figura 36).

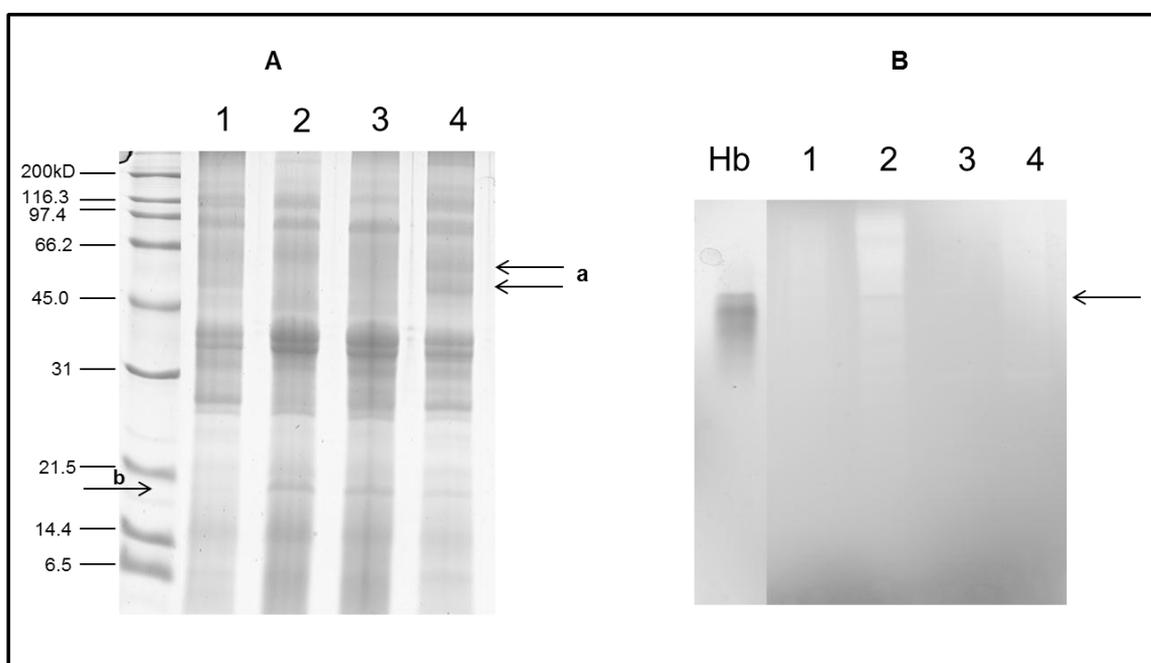


Figura 36. Perfil proteico e atividade peroxidásica de *Aeromonas hydrophila*. Em A, perfil de proteínas em eletroforese desnaturante de *A. hydrophila*, cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) hemina (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia. Em B, atividade peroxidásica de proteínas de *A. hydrophila* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2)

heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 60 µg de proteína por raia. Hb, 40µg de µg hemoglobina bovina (controle positivo).

4.5.2. *Burkholderia sp.*

No perfil proteico de *Burkholderia sp.* cultivada em meio suplementado com hemoglobina observa-se ausência de bandas entre 66,2 e 45 kDa (setas **a**). A seta **b** aponta uma diferença de migração de duas bandas de proteínas no meio suplementado com sangue. Verificou-se a presença de proteínas, de massas moleculares diferentes, com atividade peroxidásica em bactérias cultivadas na presença de sangue (setas **d** e **e**) e heme (seta **c**), figura 37.

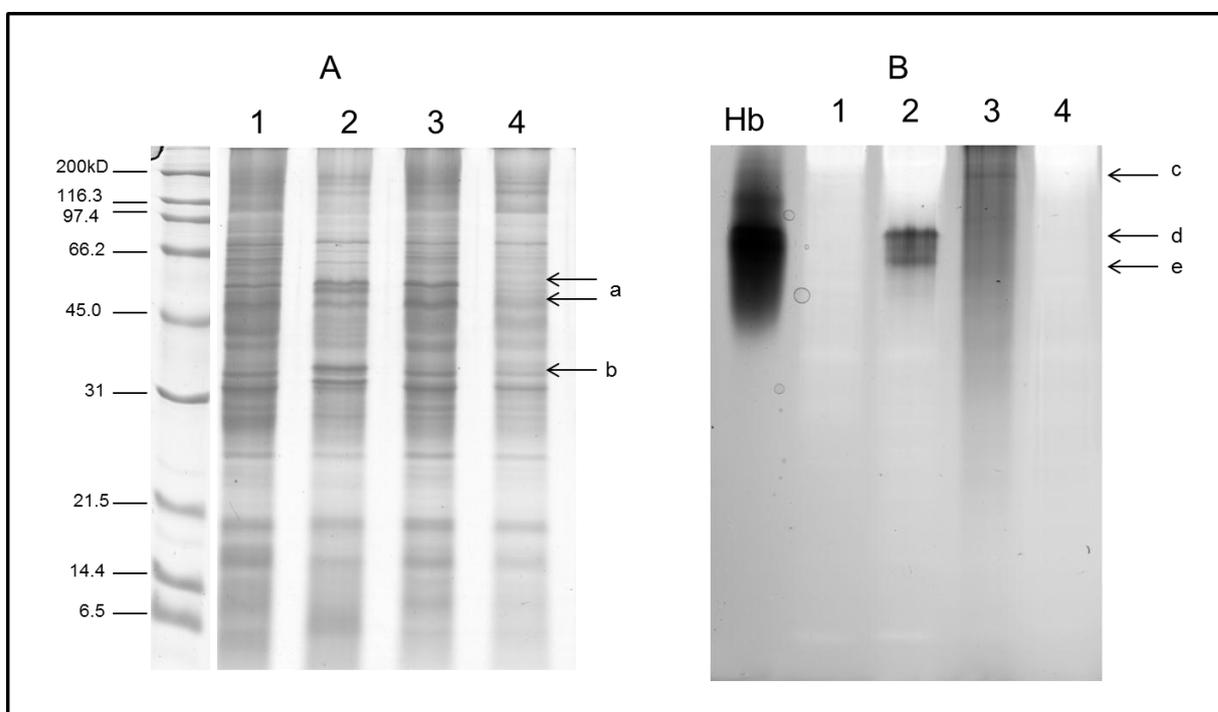


Figura 37. Perfil proteico e atividade peroxidásica de *Burkholderia sp.* Em A, perfil de proteínas em eletroforese desnaturante de *Burkholderia sp.*, cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia. Em B, atividade peroxidásica de proteínas de *Burkholderia sp.* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 60 µg de proteína por raia. Hb, 40µg de hemoglobina bovina (controle positivo).

4.5.3. *Chryseobacterium kwangyangense*

C. kwangyangense apresenta um perfil proteico bem similar em todos os tratamentos utilizados. A única diferença mais visível é aquela na faixa de massa molecular apontada pela seta **a**. Proteínas de *C. kwangyangense* apresentaram

atividade peroxidásica quando esta bactéria foi cultivada em meio suplementado com sangue (3 bandas, setas **b** e **c**) ou hemina (2 bandas, setas **b** e **d**), figura 38.

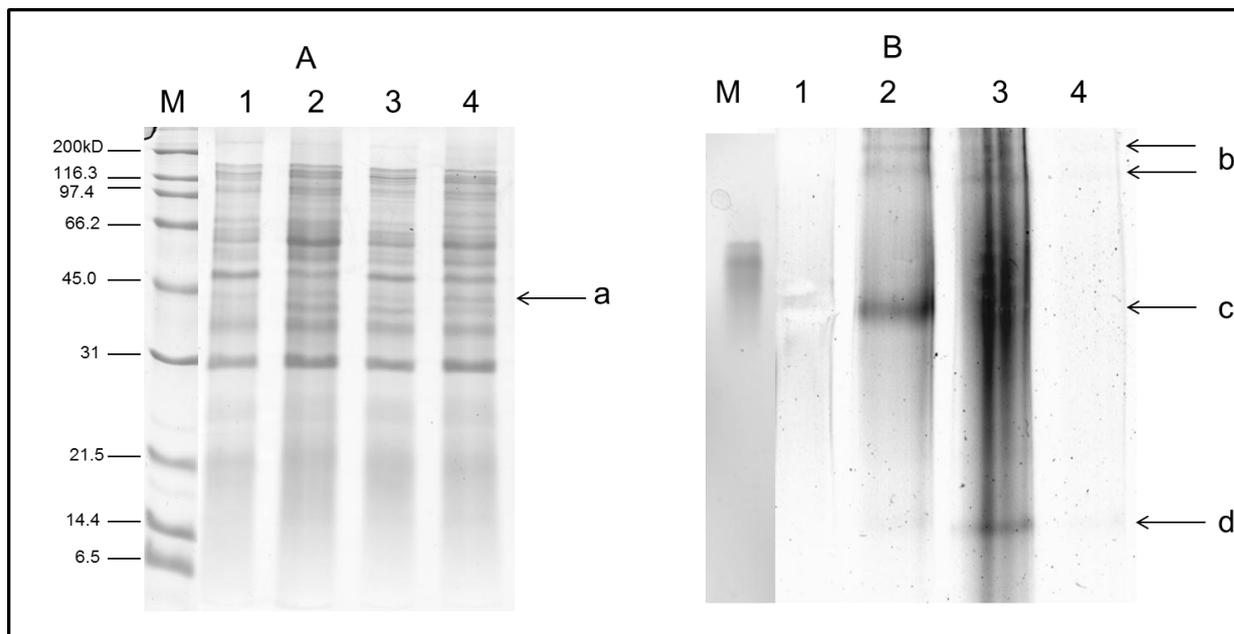


Figura 38. Perfil proteico e atividade peroxidásica de *Chryseobacterium kwangyangense*. Em A, perfil de proteínas em eletroforese desnaturante de *C. kwangyangense*, cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) hemina (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia. Em B, atividade peroxidásica de proteínas de *C. kwangyangense* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 60 µg de proteína por raia. Hb, 40µg de hemoglobina bovina (controle positivo).

4.5.4. *Enterobacter* sp.

O gel desnaturante de *Enterobacter* sp. apresenta perfis proteicos bem similares em todos os tratamentos utilizados não sendo possível apontar diferenças entre eles. Não se verificou a presença de proteínas com atividade hemeperoxidásica em *Enterobacter* sp. cultivada nas condições utilizadas neste trabalho, figura 39.

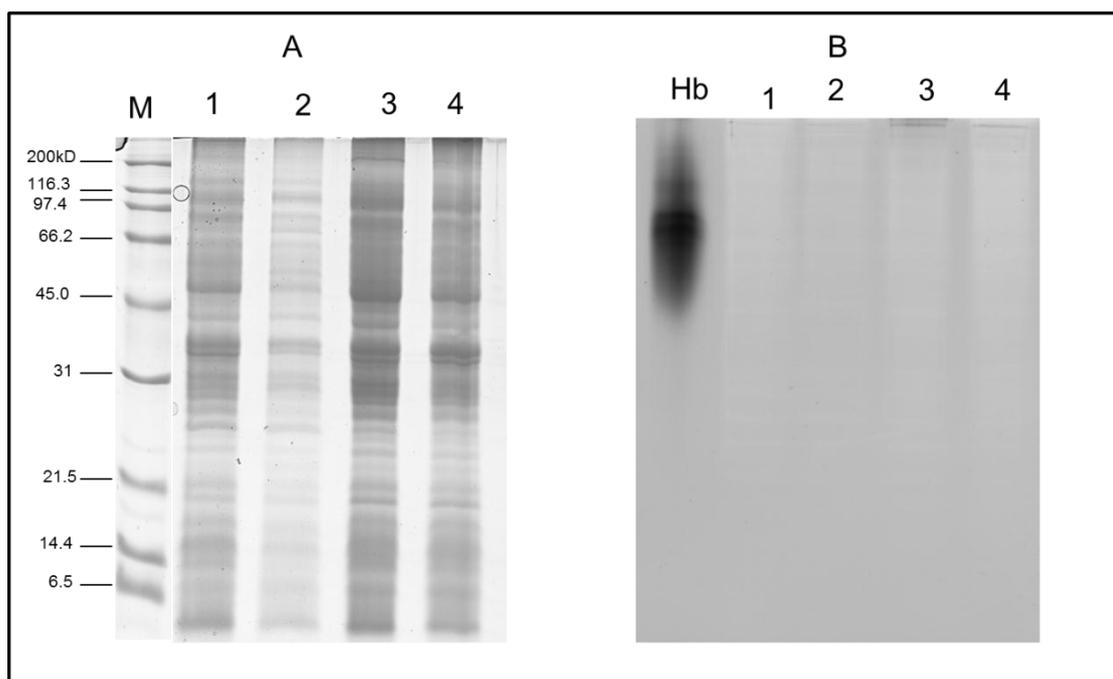


Figura 39. Perfil proteico e atividade peroxidásica de *Enterobacter* sp. Em A, perfil de proteínas em eletroforese desnaturante de *Enterobacter* sp, cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) hemina (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia. Em B, atividade peroxidásica de proteínas de *Enterobacter* sp, cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 60 µg de proteína por raia. Hb, 40µg de hemoglobina bovina (controle positivo).

4.5.5. *Herbaspirillum frisingense*

O perfil proteico de *H. frisingense* apresenta-se muito parecido para todos os tratamentos. As proteínas das bactérias cultivadas em meio de cultura contendo sangue apresentaram-se menos abundante. *H. frisingense* não apresenta proteína com atividade heme-peroxidásica nas condições utilizadas neste trabalho, figura 40.

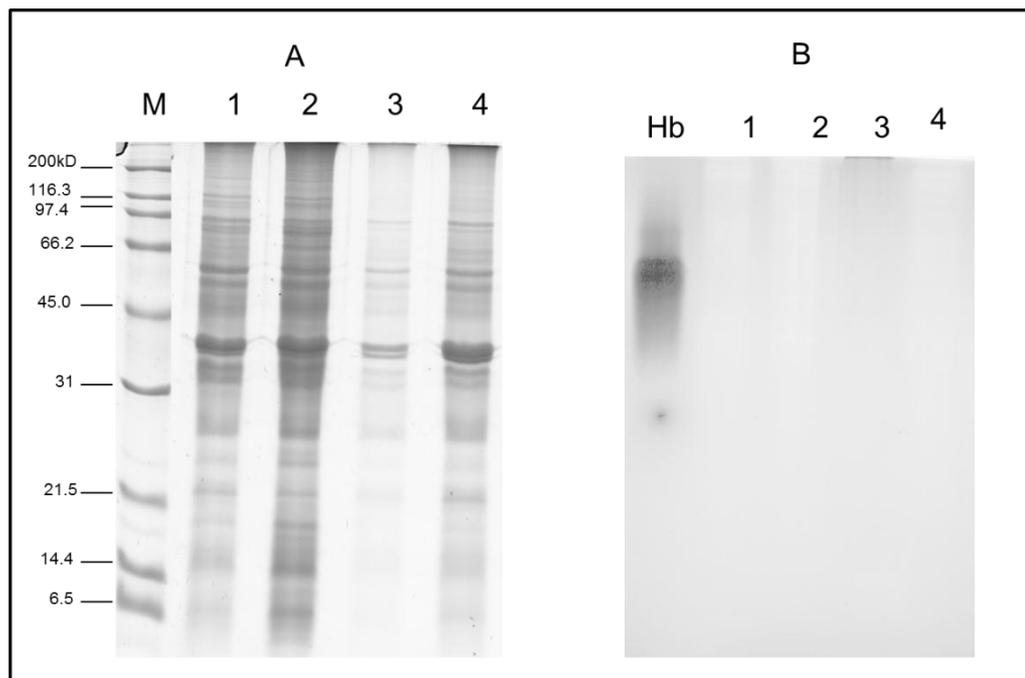


Figura 40. Perfil proteico e atividade peroxidásica de *Herbaspirillum frisingense*. Em A, perfil de proteínas em eletroforese desnaturante de *H. frisingense*, cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) hemina (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia. Em B, atividade peroxidásica de proteínas de *H. frisingense* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 60 µg de proteína por raia. Hb, 40µg de hemoglobina bovina (controle positivo).

4.5.6. *Pantoea sp.*

O perfil proteico de *Pantoea sp.* apresenta-se bastante complexo e algumas pequenas diferenças na intensidade de algumas bandas de proteínas são observadas. A seta **a** mostra bandas mais intensas nos perfis proteicos de amostras de bactérias cultivadas em meio contendo hemina ou hemoglobina. As setas **b** apontam para proteínas mais intensas extraídas de bactérias mantidas em meio de cultivo suplementados com sangue, hemina ou hemoglobina. Por sua vez, as setas **c** e **d** indicam bandas mais intensas na presença de hemoglobina.

Diversas proteínas de *Pantoea sp.* apresentaram atividade peroxidásica. Entre elas, destaca-se presença de duas bandas de atividade bem finas (seta **e**) nos tratamentos com sangue ou hemina, e outra banda mais abaixo (seta **f**) no tratamento com sangue. Observa-se também a presença de banda com atividade peroxidásica nas quatro situações de cultivo (seta **g**), entretanto há um aumento de intensidade das proteínas das bactérias que sofreram o tratamento com sangue, hemina ou hemoglobina, figura 41.

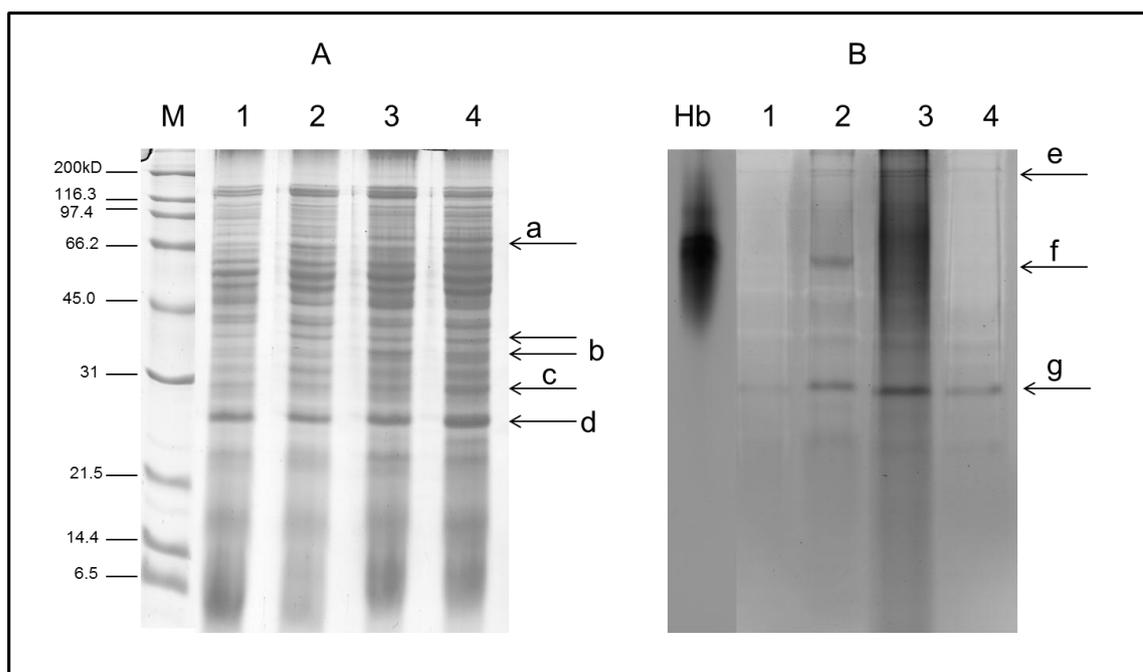


Figura 41. Perfil proteico e atividade peroxidásica de *Pantoea sp.* Em A, perfil de proteínas em eletroforese desnaturante de *Pantoea sp.*, cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia. Em B, atividade peroxidásica de proteínas de *Pantoea sp.* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 60 µg de proteína por raia. Hb, 40µg de hemoglobina bovina (controle positivo).

4.5.7. *Pseudomonas putida*

Os perfis proteicos de *P. putida* apresentam diferenças sutis entre eles. A seta **a** aponta para uma aparente ausência de uma banda proteica de massa molecular em torno de 97,4 kDa nos tratamentos com heme ou hemoglobina. As setas **b** e **c** indicam que houve um aumento na intensidade das bandas de proteínas na faixa de massa molecular em torno de 45 kDa e 21,5 kDa, respectivamente, nos três tratamentos realizados.

P. putida não apresenta nenhuma proteína com atividade peroxidásica nas condições utilizadas neste trabalho, figura 42.

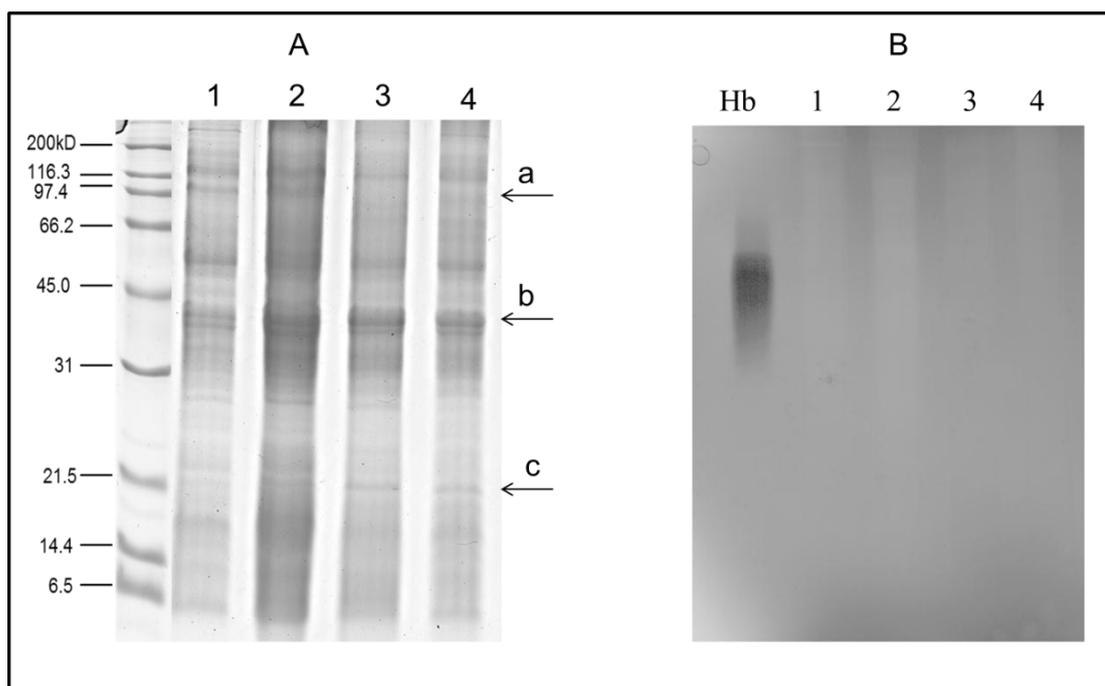


Figura 42. Perfil proteico e atividade peroxidásica de *Pseudomonas putida*. Em A, perfil de proteínas em eletroforese desnaturante de *P. putida* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 15 μg de proteína por raia. Em B, atividade peroxidásica de proteínas de *P. putida* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 60 μg de proteína por raia. Hb, 40 μg de hemoglobina bovina (controle positivo).

4.5.8. *Serratia plymuthica*

Os perfis proteicos são bastante semelhantes entre si. Apesar do perfil proteico de *S. plymuthica* cultivada somente em meio de BHI se apresentar com bandas protéicas menos intensas, foi possível observar algumas pequenas diferenças. Observa-se a ausência de uma banda de massa molecular em torno de 200 kDa no tratamento com hemoglobina (seta **a**). A seta **b** aponta para duas proteínas, de massa molecular em torno de 97,4 kDa, mais fracas no tratamento com heme. As setas **c**, **d** e **e** mostram bandas que aparecem mais intensas após as bactérias sofrerem tratamento com sangue, heme ou hemoglobina, figura 43.

Verificam-se presença de varias bandas de proteínas com atividade heme-peroxidásica unicamente de *S. plymuthica* cultivada em meio contendo heme (seta **f**).

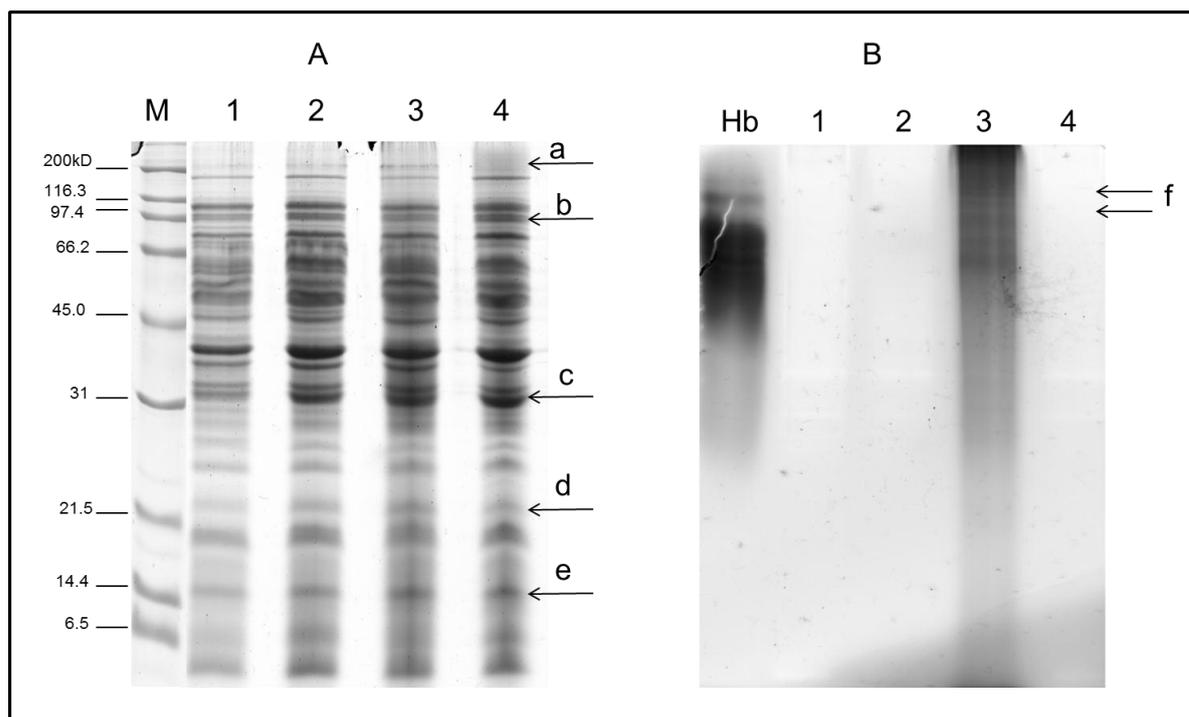


Figura 43. Perfil proteico e atividade peroxidásica de *Serratia plymuthica*. Em A, perfil de proteínas em eletroforese desnaturante de *S. plymuthica* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia. Em B, atividade peroxidásica de proteínas de *S. plymuthica*, cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 60 µg de proteína por raia. Hb, 40µg de hemoglobina bovina (controle positivo).

4.5.9. *Serratia* sp.

Esta bactéria foi a que apresentou os perfis proteicos mais diferentes entre os tratamentos. Entre estas diferenças pode-se apontar uma banda protéica mais intensa, em torno de 116,3 kDa, nos tratamentos com sangue e hemoglobina (seta **a**). O mesmo fenômeno ocorre, de forma mais intensa, com a banda de proteína apontada pela seta **b**. No tratamento com hemoglobina uma banda de proteína de 45 kDa, predominante nesta bactéria, se apresenta de forma bem mais intensa (seta **c**), como também 3 bandas proteicas na faixa de massa molecular em torno 21,5 kDa (seta **d**). No gel de atividade heme-peroxidásica de *Serratia* sp., pode ser vista uma banda de atividade bem definida (seta **e**). A única diferença observada foi o aparecimento de uma segunda banda de atividade no tratamento com hemina (seta **f**), figura 44.

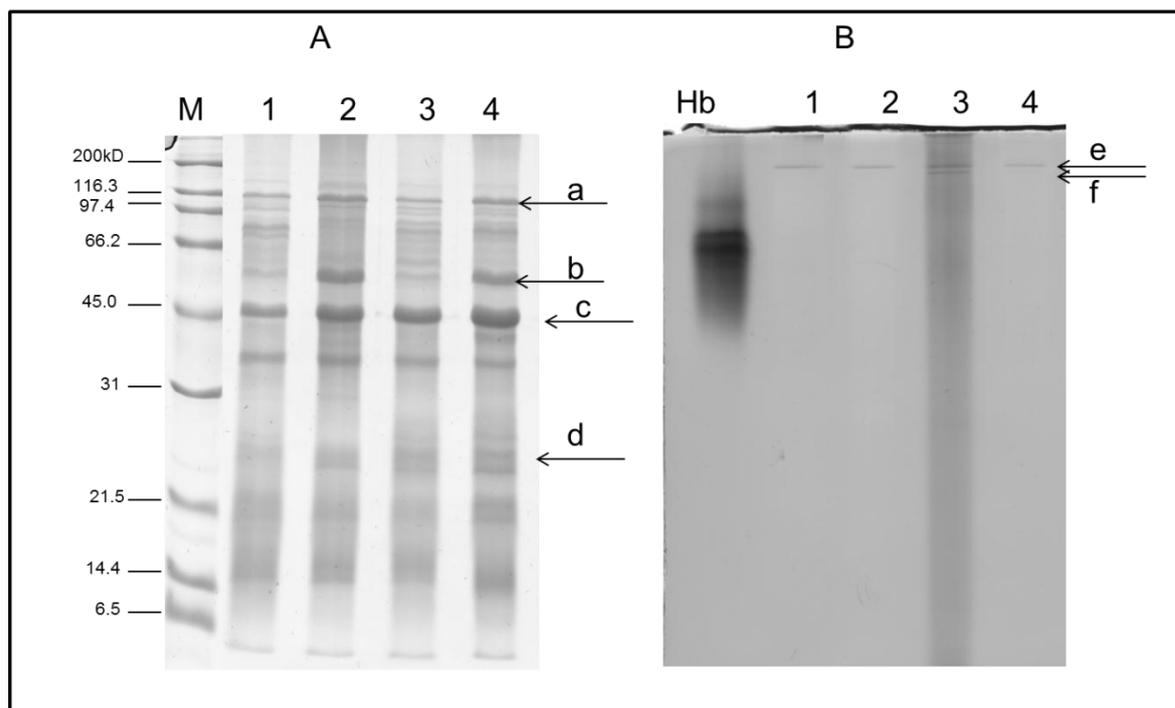


Figura 44. Perfil proteico e atividade peroxidásica de *Serratia sp.* Em A, perfil de proteínas em eletroforese desnaturante de *Serratia sp* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 15 µg de proteína por raia. Em B, atividade peroxidásica de proteínas de *Serratia sp.* cultivada em BHI (1) e BHI suplementado com sangue (2) heme (3) e hemoglobina (4). Utilizou-se 60 µg de proteína por raia. Hb, 40µg de hemoglobina bovina (controle positivo).

4.6. Western blotting

A figura 45 apresenta o resultado dos Western blots para, a princípio, detectar proteínas do tipo hemoglobina nas bactérias *C. kwangyangense*, *Enterobacter sp.*, *Pantoea sp.*, *P. putida* e *Serratia sp.*, cultivadas em BHI (raia1) e BHI suplementado com sangue (raia 2), heme (raia 3) e hemoglobina (raia 4).

De forma surpreendente, o anticorpo primário utilizado (anticorpo anti-hemoglobina humana produzido em coelho) apresentou uma alta reatividade com as proteínas das bactérias usadas neste estudo. Essa reatividade inespecífica pode ser explicada pelo fato de que o antissoro comercial utilizado possa conter, além de anticorpos contra hemoglobina, anticorpos contra proteínas de bactérias presentes nos tecidos do animal em que foi produzido este antissoro que, neste caso específico, foi o coelho. Apesar desta inespecificidade, esta técnica possibilitou a visualização de algumas diferenças nos perfis proteicos das bactérias intestinais do mosquito.

Em geral *C. kwangyangense* apresenta mais bandas reativas quando cultivado em BHI acrescido de sangue ou hemoglobina. A seta **a** aponta para uma banda bem intensa no tratamento com sangue. Com as setas **b** e **c** são indicadas duas bandas de proteínas altamente reativas, oriundas de bactérias cultivadas em meio contendo sangue ou hemoglobina. Pode-se também visualizar a presença de uma banda mais nítida no tratamento com sangue (seta **c**) e duas bandas menos intensas quando *C. kwangyangense* foi crescida em meio contendo sangue ou hemoglobina (seta **d** e **e**).

No caso de *Enterobacter sp.* o perfil proteico do tratamento com sangue mostra-se bem diferente em relação aos outros. Como exemplo, verificamos a ausência de uma banda de proteína, neste tratamento, que se mostrou altamente reativa nos outros tratamentos (seta **f**).

Pantoea sp. apresenta uma banda de proteína (seta **g**), somente quando foi cultivada em meio BHI suplementado com sangue. A seta **h** aponta para a ausência de uma banda reativa quando a bactéria foi cultivada em BHI suplementado com hemina.

As setas **i** e **j** apontam para ausências de bandas proteicas em *P. putida* cultivada em meio BHI suplementado com hemina ou sangue, respectivamente.

Nos perfis de *Serratia sp.*, observa-se a presença de uma banda altamente reativa oriunda de bactérias que foram cultivadas somente em meio BHI (seta **l**). Esta banda está presente de forma bem menos intensa nos tratamentos com sangue, hemina e hemoglobina. Outra diferença foi o desaparecimento de uma banda no tratamento com hemoglobina (seta **m**).

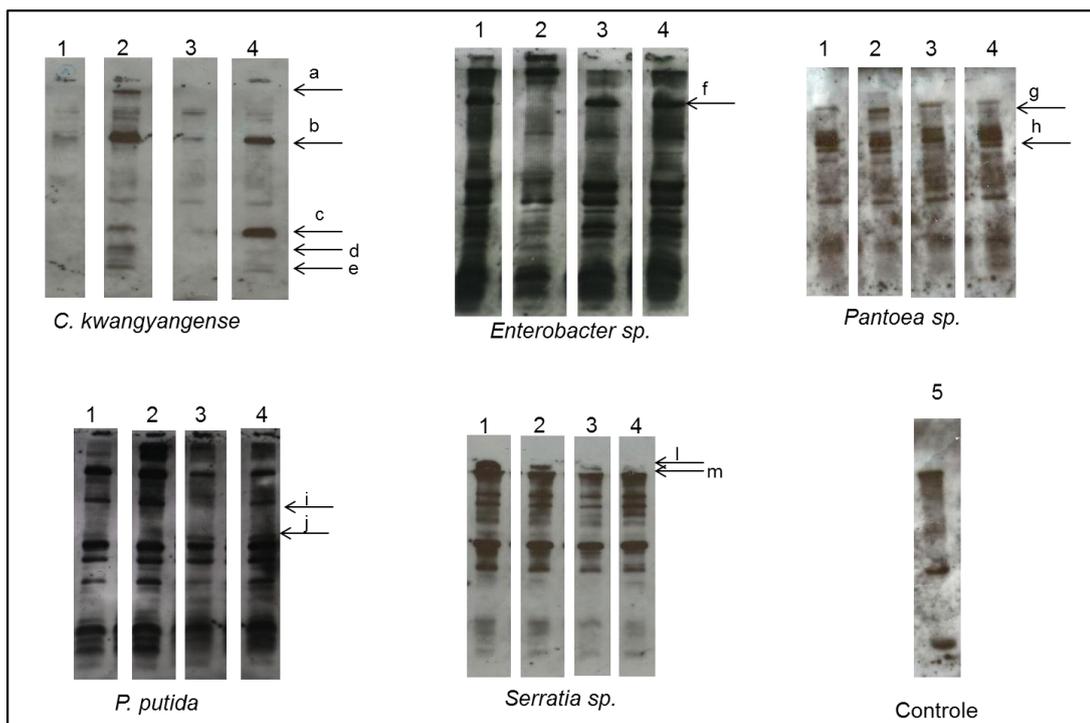


Figura 45. Western blotting dos isolados bacterianos. Raia 1, BHI; raia 2, BHI acrescido de sangue; raia 3, BHI acrescido de heme e raia 4, BHI acrescido de hemoglobina. Raia 5, hemoglobina bovina.

5. Discussão

A digestão do sangue no intestino médio *Ae. aegypti* ocorre de forma coordenada ao longo de cerca de 48 h e envolve a remoção do excesso de água ingerido, o rompimento dos eritrócitos, a degradação hidrolítica de macromoléculas e a absorção de pequenas moléculas pelas células epiteliais (Romoser, 1996). Ao longo deste período, observa-se um aumento exponencial da população bacteriana intestinal que predomina, inicialmente, na região posterior do intestino, onde a atividade proteolítica é mais alta. No final da digestão, o lúmen intestinal torna-se completamente preenchido por bactérias (Gusmão *et al.*, 2010). Desta forma, as bactérias intestinais utilizam o sangue ingerido, pelo mosquito, como meio de cultura para a sua multiplicação. Como o mosquito "permite" que haja esta proliferação bacteriana, pode-se deduzir que as bactérias intestinais possam ter papel relevante no processo digestivo. Por exemplo, as bactérias intestinais poderiam estar envolvidas na lise das hemácias e na degradação da hemoglobina.

Neste trabalho, mostramos que, com exceção de *H. frisingense*, *S. plymuthica* e *Burkholderia sp.*, todas as outras seis bactérias estudadas foram capazes de lisar hemácias em meio de cultura contendo sangue humano. Gusmão *et al.* (2010) já haviam mostrado que bactérias isoladas de intestino de *Ae. aegypti*, tais como *Enterobacter sp.* e *Serratia sp.*, apresentaram expressiva atividade hemolítica. Já foi relatado na literatura que estas duas bactérias são capazes de produzir moléculas com atividade hemolítica (Miyazaki *et al.*, 1992; Azambuja *et al.*, 2004). *Aeromonas*, por sua vez, sintetiza uma β -hemolisina, a aerolisina (Nam e Joh, 2007). Estes dados vêm de encontro aos resultados obtidos por Gaio *et al.* (2011b). Estes autores mostraram que a redução da população bacteriana intestinal de *Ae. aegypti*, pelo tratamento dos mosquitos com antibióticos, reduziu significativamente a velocidade de lise das hemácias.

Considerando que a hemoglobina é a proteína majoritária do sangue, a sua liberação das hemácias e a sua consequente degradação é um passo importante para a digestão. A fim de verificarmos se as bactérias intestinais seriam capazes de secretar hemoglobinase, cultivamos estes microrganismos em meio BHI suplementado com hemoglobina. Como resultado, observamos que, pelo menos, as bactérias *Serratia sp.*, *Pantoea sp.* e *C. kwangyangense* apresentaram atividade hemoglobinásica bem visível. Apesar de não ter apresentado uma atividade

hidrolítica, sobre a hemoglobina, de forma inequívoca, é provável que *A. hydrophila* tenha um papel na digestão do sangue. Relatos na literatura mostram que espécies de *Aeromonas* secretam muitas proteínas extracelulares, incluindo amilase, quitinase, elastase, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e protease (Nam e Joh, 2007). Uma hemoglobinaase, que atua no processo de captação de heme, foi previamente caracterizada na bactéria *Porphyromonas gingivalis* (Lewis *et al.*, 1999).

A maioria dos animais sugadores de sangue ingere enormes quantidades de sangue em uma única refeição. Mosquitos e triatomíneos podem ingerir cerca de três a dez vezes seu peso corporal em cada refeição (Friend *et al.*, 1965). A hemoglobina responde por cerca de 60% de teor de proteína no sangue que corresponde a uma concentração de 150 mg/mL (Graça-Souza *et al.*, 2006). Sua degradação resulta na liberação de concentrações muito elevadas de heme, cerca de 10 mM (Pascoa *et al.*, 2002). O heme, na sua forma livre, é um poderoso gerador de espécies reativas de oxigênio que podem reagir e danificar muitas biomoléculas (Graça-Souza *et al.*, 2006). As bactérias intestinais, tal como os mosquitos, tem que lidar com o este excesso de estresse oxidativo. Diversos estudos, mostrando mecanismos de detoxificação de heme por parte de insetos hematófagos já foram descritos (Graça-Souza *et al.*, 2006). Desta forma, pode-se inferir que as bactérias intestinais de mosquitos tenham os seus próprios mecanismos de detoxificação e sequestro deste excesso de heme. Estes microrganismos poderiam, assim, auxiliar os mosquitos neste processo de inativação do heme. Os isolados obtidos de *Ae. aegypti* foram cultivados em meio BHI contendo hemina. Observamos que todos os microrganismos foram capazes de incorporar heme, em maior ou menor grau, a partir do meio de cultivo. Estes dados vêm confirmar os resultados obtidos por Gusmão (2007) que utilizou outros isolados bacterianos obtidos de *Ae. aegypti*. Vale ressaltar que estes microrganismos, como seria esperado, foram extremamente resistentes à presença de heme, visto que foram capazes de se multiplicar na presença de 5 mM de hemina. Na literatura, relata-se que concentrações de hemina na faixa de 25-40 μ M são bastante tóxicas para bactérias (Wyckoff *et al.*, 2005; Stauff *et al.*, 2008). Em geral, bactérias Gram-negativas são mais resistentes à toxicidade do heme do que bactérias Gram-positivas (Nitzan *et al.*, 1994). Desta forma, é importante ressaltar que todas as bactérias utilizadas neste trabalho são Gram-negativas e que, no intestino médio de

mosquitos, predominam bactérias bacilares da família Enterobacteriaceae (Gusmão *et al.*, 2010).

Quando utilizamos o análogo fluorescente do heme, ZnPPIX, para estudar a cinética de incorporação de heme, observamos que as bactérias intestinais incorporam este análogo de heme de forma bem rápida. Após 10 min de exposição, em geral, as bactérias já emitem uma boa fluorescência com tendência a aumentar ou de se manter constante até aos 30 min de incubação. Após este tempo, a incorporação é mantida estável. Os resultados obtidos mostram que, dependendo da bactéria, a incorporação ZnPPIX atinge o seu máximo após 10 ou 30 min de incubação. Bramant e colaboradores (1993) obtiveram resultados similares ao estudar a incorporação de 30 μ M de hemina radioativa por parte da bactéria *Porphyromonas gingivalis*. Esta bactéria foi capaz de incorporar cerca de 70% da hemina nos primeiros 3 min, atingindo a completa incorporação por volta dos 45 min de exposição. Entre as bactérias estudadas, *P. putida* foi a mais eficiente na incorporação de ZnPPIX, após 30 min de incubação, o que representa uma eficiência 39 vezes maior do que as bactérias *Serratia sp.* e *Enterobacter sp.*

Páscoa e colaboradores (2002) mostraram que, em *Ae. aegypti*, parte do heme gerado do catabolismo da hemoglobina se associa à matriz peritrófica, sugerindo que essa estrutura desempenha um importante papel na detoxificação de heme neste inseto (Pascoa *et al.*, 2002). Podemos concluir, a partir dos nossos dados e de Gusmão (2007), que as bactérias de mosquitos podem desempenhar papel cooperativo no processo de detoxificação deste grupo prostético.

Em mosquitos anautógenos, tais como *Ae. aegypti* e *Anopheles gambiae*, a fêmea precisa se alimentar de sangue para obter os nutrientes necessários para a maturação de seus ovos. A ingestão de sangue estimula uma série de mudanças fisiológicas no mosquito com um todo e, em especial, no intestino médio. Sanders e cols. (2003) analisaram a expressão gênica do intestino médio de *Ae. aegypti*, em resposta a alimentação sanguínea, e observaram a modulação de diversos genes como, por exemplo, aqueles envolvidos no metabolismo e absorção de nutrientes, degradação de proteínas e aminoácidos, coagulação do sangue, formação da matriz peritrófica e estresse oxidativo. Entre as proteínas intestinais mais estudadas e que são induzidas pela alimentação sanguínea destacam-se as enzimas digestivas

(Billingsley e Hecker, 1991; Noriega, *et al.*, 1997; Isoe *et al.*, 2009) e as proteínas constituintes da matriz peritrófica (Dinglasana *et al.*, 2009).

As bactérias intestinais de mosquitos precisam enfrentar os mesmos desafios metabólicos de seus hospedeiros para a utilização do sangue como fonte nutricional para a sua multiplicação. Estes microrganismos são muito bem sucedidos neste processo, visto que eles colonizam completamente o lúmen intestinal ao final da digestão do sangue. Desta forma, tal qual o mosquito, espera-se que genes e proteínas das bactérias intestinais sejam também modulados pelo sangue para que estes microrganismos não dependam exclusivamente do metabolismo de seu hospedeiro para que possam se proliferar. Neste trabalho, utilizamos a técnica eletroforética unidimensional, em uma análise preliminar, para verificar possíveis diferenças no perfil proteico de bactérias intestinais de *Ae. aegypti*, quando mantidas em meio de cultura rico em nutrientes, suplementado com sangue, hemina e hemoglobina. Nestas condições, foi possível observar diferenças sutis na expressão de proteínas em sete das nove bactérias estudadas. A bactéria *Serratia sp.* foi a que apresentou diferenças mais visíveis nos seus perfis proteicos. Três proteínas foram altamente expressas nos tratamentos com sangue e hemoglobina em relação ao grupo controle, crescido em BHI não suplementado. Assim, técnicas proteômicas mais modernas terão que ser utilizadas para a identificação de proteínas bacterianas intestinais que são moduladas pelos constituintes do sangue.

Neste estudo, utilizamos duas outras metodologias para verificar se o heme seria capaz de induzir/aumentar a expressão de heme-proteínas em bactérias de *Ae. aegypti*, visto que todas as bactérias estudadas foram capazes de incorporar este grupo prostético. Neste caso, estas proteínas seriam proteínas especializadas para a mobilização de heme e para manter os reservatórios intracelulares deste composto (Anzaldi e Skaar, 2010).

Na primeira técnica, a atividade heme-peroxidásica em gel de poliacrilamida, foi possível observar diferenças na expressão de proteínas com atividade peroxidásica na maioria das bactérias com as exceções de *H. frisingense* e *P. putida*. Dentre todas, quatro bactérias se destacaram na expressão de heme-proteínas: *Burkholderia sp* que apresentou varias bandas com atividade peroxidásica no tratamento com hemina e duas bandas bem expressivas, no tratamento com sangue; *C. kwangyangense* apresentou, nos tratamentos com sangue e hemina,

uma proteína com atividade peroxidásica alta; *Pantoea sp.* aumentou a expressão de, pelo menos duas heme-proteínas, nas três condições experimentais e apresentou uma nova proteína no tratamento com sangue e *S. plymuthica* expressou uma série de heme-proteínas unicamente no tratamento com hemina. A síntese de heme-proteínas por bactérias se faz necessária para internalizar o heme e manter a homeostase celular, prevenindo a toxicidade desta molécula, como foi observado na bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* (Skaar *et al.*, 2004). Estudando esta mesma bactéria por eletroforese em duas dimensões associada a espectrometria de massas, Friedman e colaboradores (2006) identificaram cinco proteínas que aumentam sua expressão exclusivamente em resposta a 10 μ M de hemina.

Na segunda série de experimentos, para a identificação de heme-proteínas, utilizou-se a técnica "immunoblot" na qual foi usada, como anticorpo primário, um anticorpo policlonal anti-hemoglobina humana comercial. O objetivo de utilizar esta metodologia foi a de verificar se as bactérias intestinais de *Ae. aegypti* estariam incluídas no pequeno grupo de bactérias que expressam hemoglobina (Frey e Kallio, 2003). Infelizmente, os resultados obtidos, neste trabalho, foram inespecíficos em vista do grande número de bandas que foram reveladas. De qualquer forma, foi possível visualizar algumas importantes alterações nos perfis proteicos obtidos. Além das diferenças pontuais na expressão de proteínas entre os tratamentos, podem-se destacar diferenças marcantes nos perfis proteicos de *C. kwangyangense* e *Enterobacter sp* quando estas bactérias foram cultivadas em meio suplementado com sangue humano.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho vêm de encontro aos trabalhos anteriores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, confirmando a capacidade das bactérias intestinais de lisar hemácias, degradar hemoglobina e incorporar heme. Mostramos também que estes microrganismos são altamente resistentes ao stress oxidativo provocado pela presença de heme além de serem capazes de expressar heme-proteínas induzidas por este grupo prostético.

6. Conclusões

- Com exceção de *H. frisingense*, *S. plymuthica* e *Burkholderia sp.*, todas as outras seis bactérias estudadas foram capazes de lisar hemácias em meio de cultura contendo sangue humano.
- *Serratia sp.*, *Pantoea sp.* e *C. kwangyangense* apresentaram atividade hemoglobínica bem visível.
- Todos os microrganismos foram capazes de incorporar heme, em maior ou menor grau, a partir do meio de cultivo.
- Todas as bactérias intestinais incorporam Zn protoporfirina de forma bem rápida.
- *Enterobacter sp.* foi o isolado que incorporou a menor quantidade de ZnPPIX, ficando em torno de 0,09 μM em 10 min.
- *P. putida* incorporou a maior quantidade ZnPPIX, ficando em torno de 4,29 μM em 30 min.
- Nas condições testadas foi possível observar diferenças sutis na expressão de proteínas em sete das nove bactérias estudadas.
- Foi possível observar diferenças na expressão de proteínas com atividade peroxidásica na maioria das bactérias com as exceções de *H. frisingense* e *P. putida*.

7. Referências bibliográficas

- Alves, W. C. I.; Gorayeb, I. S.; Loureiro e. C. B. (2010) Isolated bacteria from hematophagous *Culicidae* (Diptera: Nematocera) in Belém, Pará State, Brazil. *Rev. Pan-Amaz Saude* 1:131-141.
- Anzaldi, L.L., Skaar, E.P. (2010) Overcoming the Heme Paradox: Heme Toxicity and Tolerance in Bacterial Pathogens. *Infect. Immun.* 78:4977-4989.
- Apte-Deshpande, A.; Paingankar, M.; Gokhale, M.D.; Deobagkar, D.N. (2012) *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. *PLoS ONE* 7: e40401.

Armstrong J.L., Wood N.D., Porteous L.A. (1990) Transconjugation between bacteria in the digestive-tract of the cutworm *Peridroma saucia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1492–1493.

Arnoux P., Haser R., Izadi-pruneyre N., Lecroisey A., Czjzek M. (2000) Functional aspects of the heme bound hemophore HasA by structural analysis of various crystal forms. *Proteins* 41:202-210.

Asis C.A.; Adachi C.A. (2004). Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:19 –23.

Azambuja, P.; Feder, D.; Garcia, E.S. (2004). Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp. Parasit.* 107:89-96.

Bardin S.D.; Huang H.C.; Liu L.; Yanke L.J. (2003) Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. on canola, safflower, dry pea, and sugar beet. *Can. J. Plant Pathol.* 25:268 –275.

Bennett, K. E.; Olson, K. E.; Muñoz, M. de L.; Fernandez-salas, I.; Farfan-ale, J. A.; Higgs, S.; Black IV, W. C. e Beaty, B. J. (2002) Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67:85-92.

Bielefeldt-Ohmann, H; McBride, J. L. (2000) Dengue Viral Infections, pathogenesis and epidemiology. *Microbes and infections.* 2:1041-1050.

Billingsley, P.F., Hecker, H. (1991) Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): activity and distribution of trypsin, aminopeptidase, and alpha-glucosidase in the midgut. *J. Med. Entomol.* 28:865–871.

Billingsley, P.F., Lehane, M.J. (1996) Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Lehane, M.J., Billingsley, P.F., *Biology of the insect midgut*. 1st edition. London: Chapman & Hall, 86-114.

Black, W. C.; Bennett, K. E.; Gorrochotegui-Escalante, N.; Barillas-Mury, C. V.; Fernandez-Salas, I.; De Lourdes Munoz, M.; Farfan-Ale, J. A.; Olson, K. E.; Beaty, B. J. (2002) Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch. Med. Res.* 33:379-88.

Bramant, T. E., Holt, S. C. (1993) Hemin Uptake in *Porphyromonas gingivalis*: Omp26 Is a Hemin-Binding Surface Protein. *J. Bacteriol.* 22: 7413-7420.

Braun, V. (2001) Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:67-79.

Braun, V., Schmitz, G. (1980) Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* 124:55–61.

Cabanes D., Dehoux P., Dussurget O., Frangeul L., Cossart P. (2002) Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 10:238-45.

Chavshin A.R., Oshaghi M.A., Vatandoost H., Pourmand M.R., Raeisi A., Enayati A.A., Mardani N., Ghoorchian S.(2012) Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Trop.* 121:129-134.

Cives - Centro de Informação em Saúde para Viajantes. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/fam/fam-br.html>. Acessado em de julho de 2013.

Claro, L. B. L., Tomassini, H. C. B., Rosa, M. L.G. (2004). Prevenção e Controle do Dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. *Cad. de Saúde Públ.* 20: 1447-1457.

Clegg, S., Allen, B. L. (1985) Molecular cloning and expression of an extracellular nuclease of *Serratia marcescens* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 27:257–262.

Coenye T, Vandamme P.(2003) Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 9 :719-729.

Consoli, R. A. G. B., Oliveira, R.L. (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 228p.

Dansa-Petretski, M., Ribeiro, J.M., Atella, G.C., Masuda, H., Oliveira, P.L. (1995). Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 270:10893–10896.

Darling P., Chan M., Cox A.D., Sokol P.A.(1998) Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*. *Infect. Immun.* 66:874-877.

Daskaleros, P.A., Payne, S.M. (1987) Congo Red Binding Phenotype Is Associated with Hemin Binding and Increased Infectivity of *Shigella flexneri* in the HeLa Cell Model. *Infect. Immun.* 55:1393-1398.

Daskalov, H.(2006) The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control.* 17:474-483.

Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., Arlet, G., Brisse, S. (2009) Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea agglomerans* Strains by Multilocus Gene Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2: 300–310.

DeMaio J, Pumpuni CB, Kent M, Beier JC. (1996) The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens* and *Psorophora columbiae* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54:219-223.

Dematheis, F.; Kurtz B.; Vidal S., Smalla, K.(2012) Microbial Communities Associated with the Larval Gut and Eggs of the Western Corn Rootworm *PLos one.* 7: e44685

Dengue Map Disponível em: <http://www.healthmap.org/dengue/pt/> Acessado em junho de 2013.

Dengue vírus e vetor – Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/index.html>. Acessado em junho de 2013.

Dinglasan, R.R., Devenporta, M., Florensb, L., Johnsonb, J.R., Mchugha, C.A., Donnelly-Domand, M., Caruccic, D.J., Yates, J.R. III, Jacobs-Lorena, M. (2009) The *Anopheles gambiae* adult midgut peritrophic matrix proteome. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 39:125–134.

Fonseca, B.A.L. da; Figueiredo, L.T.M. Febre amarela. In: Veronesi R. & Focaccia R. Tratado de Infectologia. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. pág. 254-259.

Frey, A. D., Kallio, P.T. (2003) Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:525-545.

Friedman, D.B., Stauff, D. L., Pishchany, G., Whitwell, C. W., Torres, V. J., SKAAR, E. P. (2006) *Staphylococcus aureus* redirects central metabolism to increase iron availability. *PLoS Pathog.* 2: 777-789.

Friend, W.G., Choy, C.H.T., Cartwright, E. (1965) The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera: Reduviidae). *Can. J. Zool.* 43:892–904.

Gaio, A. O. (2011a) 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, 99p.

Gaio, A.O.; Gusmão, D.S.; Santos, A.V.; Berbert-Molina, M.A.; Pimenta, P.F.P.; LEMOS, F.J.A. (2011b) Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.) *Paras. And Vect.* 4:105.

Ghigo, M. J., Letoffe S., Wandersman C. (1997). A new type of hemo-phore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 3572–3579.

Gonzalez-Ceron, L.; Santillan, F.; Rodriguez, M.H.; Mendez, D. Hernandez-Avila, J.E. (2003) Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development. *J. Med. Entomol.* 40: 371–374.

Governo do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.rj.gov.br/web/ses/exibeconteudo?article-id=1604662> Acessado em junho de 2013.

Graca-Souza A.V., Maya-Monteiro C., Paiva-Silva G.O., Braz, G. R. C., Paes M. C., Sorgine, M.H.F., Oliveira, M.F., Oliveira, P.L. (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 36:322-335.

Grimont, F., Grimont, P. A. D. (2006) The Genus *Serratia*. *Prokaryotes* 6:219–244

Gubler, D. J., (1998) Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:480-496.

Gubler, D.J.; Clark, G.G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.* 2:55–57.

Gusmão, D.S., Santos, A.V., Marini, D.C., Bacci JR, M., Berbert-Molina, M.A., Lemos, F.J.A. (2010) Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop.* 115:275-81.

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

Gusmão, D.S.; Páscoa, V.; Mathias, L.; Vleira, I.J.C.; braz-Filho, R.; Lemos, F.J.A. (2002). Derris (Lonchocarpus) urucu (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz.* 97:371-375

Guzmán M.G.; Kourí G. (2002) Dengue: an update. *The Lancet Infect. Dis.* 2:33-42.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* 280:1-8.

Harris, A. K., Williamson, N.R., Slater, H., Cox, A., Abbasi,S. Foulds,I., Simonsen, H. T., Leeper,F.J., Salmond, G. P. (2004) The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species and strain-dependent genome context variation. *Microbiol.* 150:3547–3560

Hines, D. A., Saurugger, P. N., Ihler, G. M., Benedik, M. J. (1988) Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 170:4141–4146.

Idei, A., Kawai,E., Akatsuka, H., Omori, K. (1999). Cloning and characterization of the *Pseudomonas fluorescens* ATP binding cassette exporter,HasDEF, for the heme acquisition protein HasA. *J. Bacteriol.* 181:7545–7551.

Igbinosa, I.H.; Nwodo, U.U; Sosa, A.; Tom, M.; Okoh, A.I. (2012) Commensal *Pseudomonas* Species Isolated from Wastewater and Freshwater Milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as Reservoir of Antibiotic Resistant Determinants. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9:2537-2549

Isoe, J., Rascón JR.,A.A., Kunz,S.,Miesfeld, R.L. (2009) Molecular Genetic Analysis of Midgut Serine Proteases in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:68-73.

Jeun Y.C.; Park K.S.; Kim C.H.; Fowler W.D.; Kloepper J.W. (2004) Cytological observation of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biol. Control.* 29:39 –42.

Kampfer, P., Chandel, K., Prasad, G. B., Shouche, Y. S., Veer V. (2010) *Chryseobacterium culicis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 10:2387-91

- Kay, W.W., Phipps, B.M., Ishiguro, E.E., Trust, T.J. (1985) Porphyrin Binding by the Surface Array Virulence Protein of *Aeromonas salmonicida* *J. Bacteriol.* 64:1332-1336.
- Kikuchi, Y., Meng, X.Y., Fukatsu, T. (2005). Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4035–4043.
- Langer, R. C.; Vinetz, J.M.(2001) Plasmodium ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix. *Trends in Parasit.* 17: 269-272.
- Lee, B. C. (1995). Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol. Microbiol.* 18: 383–390.
- Lehane, M.J. (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 525-550.
- Létoffé S., Omori K., Wandersman C.(2000). Functional Characterization of the *HasAPF* Hemophore and Its Truncated and Chimeric Variants: Determination of a Region Involved in Binding to the Hemophore Receptor. *J. Bacteriol.* 182:4401-4405.
- Létoffé, S., Ghigo, J.M., Wandersman, C. (1994) Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter. *J. Bacteriol.* 176: 5372-5377.
- Létoffé, S., Nato F., M. E. Goldberg, Wandersman C.(1999) Interactions of HasA, a bacterial hemophore, with hemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. *Mol. Microbiol.* 33:546–555.
- Lewis, J.P., Dawson, J.A., Hannis, J.C., Muddiman, D., Macrina, F.L.(1999) Hemoglobinase activity of the lysine gingipain protease (Kgp) of *Porphyromonas gingivalis* W83. *J. Bacteriol.* 181:4905-4913.
- Li J., Ni X.D., Liu Y.J., Lu C.P. (2011). Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. *J. Appl. Microbiol.* 110:823–830.
- Lijnen H.R., Van Hoef B., Ugwu F., Collen D., Roelants I.(2000) Specific proteolysis of human plasminogen by a 24 kDa endopeptidase from a novel *Chryseobacterium* sp. *Biochem.* 39:479-488.
- Lindh, J.M., Terenius, O., Faye, I. (2005) 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7217-7223.
- Litwin, C.M., Calderwood, S.B. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:137-149.

Liu L.; Kloepper J.W.; Tuzun S.(1995) Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol.* 85:695–698.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Jour. of Biol. Chem.* 193: 265-275.

Malboobi, M. A.; Behbahani,M.; Madani, H.; Owlia, P.; Deljou, A.; Yakhchali,B.; Moradi, M. ; Hassanabadi (2009). Performance evaluation of potent phosphatesolubilizing bacteria in potato rhizosphere. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:1479 –1484.

Marraffini, A. L., Dedent , C. A., Schneewind. O. (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 70:192 – 221.

Matheson, R. (1932). The utilization of aquatic plants as aids in mosquito control. *The Amer. Natural.* 64:56–86.

Matsuyama, T., Bhasin, A., Harshey, R. M. (1995) Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J. Bacteriol.* 177:987–991.

Mazmanian S.K., Skaar E.P., Gaspar A.H., Humayun M., Gornicki P., Jelenska J., Joachmiak A., Missiakas D.M., Schneewind O. (2003). Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. **Science.** 299:906-909.

Ministério da Saúde Fundação Nacional de Saúde Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_feam.pdf Acessado em junho de 2013.

Miyazaki, Y., Hara-Hotta, H., Matsuyama, T., Yano, I. (1992) Hemolysis of phosphatidylcholine-containing erythrocytes by serratamic acid from *Serratia marcescens*. *Int. J. Biochem.* 24:1033-1038.

Monteiro, R. A., Balsanelli, E., Wasseem,R., Marin, A. M., Brusamarello-santos, L. C. C., Schmidt, M. A. (2012). *Herbaspirillum plantinteractions*: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant. Soil.* 356:175–196.

Moore, M.R. (1990) Historical introduction to porphyrins and porphyrias. In: Biosynthesis of heme and chlorophylls. Ed. Dailey, H.A McGraw-Hill Publishing Company, p. 1-54.

Moraes,C.S., Seabra,S.H, Castro,D.P., Brazil, R.P., De Souza, W., Garcia,E. S., Azambuja, P. (2008) *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: Ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. *Exp. Parasitol.* 4:561–568.

Morand,P.C., Billoet,A., Rottman, M., Tardy,V. S., Eyrolle,L., Jeanne,L., Tazi,A., Anract, P., Courpied,J.P., Poyart,C., Dumaine, V. (2009) Specific Distribution within the *Enterobacter cloacae* Complex of Strains Isolated from Infected Orthopedic Implants. *J. Clin. Microbiol.* 8:2489–2495.

Moro, C.V.; Tran, F. H.; Raharimalala, F. N.; Ravelonandro P.; Mavingui P. (2013) Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiol.* 13:1-11.

Mota Filho, J. P. (2012). Identificação de novos mecanismos de tolerância aos estresses osmótico e iônico em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF

Nam, I. Y.; Joh, K. (2007) Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR. *J. of Microbiol.* 45:297-304.

Nitzan, Y., Wexler, Finegold, S.M. (1994) Inactivation of anaerobic bacteria by various photosensitized porphyrins or by hemin. *Curr. Microbiol.* 29:125–131.

Noriega, F.G., Shah, D.K., Wells, M.A. (1997) Juvenile hormone controls early trypsin gene transcription in the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 6:63-66.

Olczak, T., Dixon, D.W., Genco C.A. (2001) Binding Specificity of the *Porphyromonas gingivalis* heme and hemoglobin receptor HmuR, Gingipain K, and Gingipain R1 for Heme, porphyrins, and metalloporphyrins *J. of Bacteriol.* 183:5599-5608.

Oliveira, M.F., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., DE Souza, W., Lins, U., Braga, C.M., Masuda, H., Oliveira, P.L. (1999). Haem detoxification by an insect. *Nature.* 400:517–518.

Oliveira, P.L., Kawooya, J.K., Ribeiro, J.M.C., Meyer, T., Poorman, R., Alves, E.W., Walker, F.A., Machado, E.A., Nussenzveig, R.H., Padovan, G.J., Masuda, H. (1995). A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 270:10897–10901.

Ongena, M.; Daayf, F.; Jacques, P.; Thonart, P.; benhamou, N.; Paulitz, T.C.; Bélanger, R.R. (2000) Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant. Pathol.* 49:523–530.

Paiva-Silva, G. O.; Cruz-oliveira, C.; Nakayasu, E. S. Maya-Monteiro, C. M.; Dunkov, B. C.; Masuda, H.; Almeida, I. C.; Oliveira, P.O. (2006) A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *PNAS.* 103:8030–8035.

Pascoa, V.; Oliveira, P.L.; Dansa-Petretski, M.; Silva, J.R.; Alvarenga, P.H.; Jacobs-Lorena, M.; Lemos, F.J.A. (2002). *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect. Biochem. and Mol. Biol.* 32: 517-523.

Pereira, L.O.R.; Oliveira, P.L.; Almeida, I.C.; Paiva-Silva, G.O. (2007). Biglutaminyl-biliverdin IX α as a heme degradation product in the dengue fever insect vector *Aedes aegypti*. *Biochem.* 23: 6822–6829

Perry, R.D., Lucier, T.S., Sikkema, D.J., Brubaker, R.R. (1993) Storage Reservoirs of Hemin and Inorganic Iron in *Yersinia pestis* *Infect Immun.* 61: 32-39.

Perry, R.D., Brubaker, R.R. (1979) Accumulation of Iron by *Yersiniae* Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *J. Bacteriol.* 137:1290-1298.

Peters, W.(1992) Peritrophic membranes. In: Bradshaw *et al.*, *Zoophysiol.* 30, 1st. edition. Berlin: Springer-Verlag, 238p.

Portal da Saúde (a) Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf Acessado em junho de 2013.

Portal da Saúde.(b) Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/rofissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31121&janela=1 Acessado em junho de 2013.

Portal da saúde.(c) Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_classica_2012_at032013.pdf Acessado em junho 2013.

Quecine, M. C.; Araújo, W. L.; Rossetto P.B.; Ferreira A., Tsui S., Lacava P.T.; Mondin M.; Azevedo J.L.; Pizzirani-Kleiner A.A. (2012).

Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1 *Appl. Environ. Microbiol.* 21:7511- 7518.

Rani, A.; Sharma, A.; Rajagopal, R. Adak, T.; Bhatnagar, R. K. (2009). Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.* 9:9 -96.

Ratliff, M., Zhu W., Deshmukh R., Wilks A., Stojiljkovic I. (2001) Homologues of Neisserial Heme Oxygenase in Gram-Negative Bacteria: Degradation of Heme by the Product of the pigA Gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Bacteriol.* 183: 6394-6403.

Raymond, K. N., Dertz E. A., Kim S.S. (2003) Enterobactin An archetype for microbial iron transport. *PNAS* 100:3584-3588.

Richards, A.G., Richards,P.A. (1977) The peritrophic membranes of Insects. *Ann. Rev. Entomol.* .22:219-240.

Rodrigues, R.C.C.(2008) 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 – UEN, p. 67.

Romoser, W.S. (1996) The vector alimentary system. In: Beaty, B.J.,Marquardt, W.C., *The Biol. of Disease Vect.* 1ª ed. Colorado University, 298-317.

Rossi M.S., Fetherston J.D., Létoffé S., Carniel E., Perry R.D., Ghigo J.M. (2001). Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 69:6707-6717.

Rossignol M, Basset A, Espeli O, Bocard F. (2001). NKBOR, a miniTn10-based transposon for random insertion in the chromosome of Gram-negative bacteria and the rapid recovery of sequences flanking the insertion sites in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 152:481–485.

Ruiz, L.M.; Dominguez, A.; Ruiz, N.; Vinas, M. (2004) Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Arch. Med. Res.* 35:251–257.

Sanders, H. R., Evans, A. M., Ross, L.S., Gill, S.S. (2003) Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 33:1105–1122.

Schatzmayr H.G.; Nogueira R.M.R.; Travassos da Rosa A.P.A. (1986) An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*, 81:245-246.

Secretaria de Saúde de Campos/CRD – Centro de Referência da Dengue (a) Disponível em http://www.campos.rj.gov.br/exibirNoticia.php?id_noticia=18449 Acessado em julho de 2013.

Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/programas-e-acoas/84-acoas/130-rio-contra-a-dengue-a-historia-da-dengue-no-mundo.html?highlight=WyJkZW5ndWUiXQ==> Acessado em junho de 2013.

Shen F.T., Kämpfer P, Young C.C., Lai W.A., Arun A.B. (2005) *Chryseobacterium taichungense* sp. nov., isolated from contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1301 - 1304.

Shen, Z., Jacobs-Lorena, M (1997) Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Biol. Chem.* 272:28895-28900.

Shimura K., Kaji S., Hirashi A. (2005) *Chryseobacterium shigense* sp. Nov., a yellow pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. *Internation. J. of Syst. Evolut. Microbiol.* 55:1903 – 1906.

Skaar, E.P., Humayun, M., Bae, T., Debord, K.L., Schneewind O. (2004) Iron source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* 305:1626–1628.

Stauff, D. L., Bagaley, D., Torres, V. J., Joyce, R., Anderson, K. L., Kuechenmeister, L., Dunman, P. M., Skaar, E.P. (2008) *Staphylococcus aureus* HrtA Is an ATPase Required for Protection against Heme Toxicity and Prevention of a Transcriptional Heme Stress Response. *J. Bacteriol.* 10: 3588–3596.

Stobart RH. (1977) The control of the diuresis following a blood meal in females of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (L) *J Exp Biol.* 69:53-85.

Stugard, C.E., Daskaleros P.A., Payne S.M. (1989) A 101-kilodalton heme-binding protein associated with congo red binding and virulence of *Shigella flexneri* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 57:3534-3539.

Tauil, P.L. (2001). Urbanização e ecologia do dengue. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro. 17: 99-102.

Tellam, R.L. The peritrophic matrix. In: Lehane, M.J., Billingsley P.F. (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*. 1st edition. London Chapman & Hall, 1996.

- Terra, W.R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. and Physiol.* 47:47-61.
- Tong Y., Guo M. (2009) Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch. Biochem. Biophys.* 481: 1–15.
- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. Microbiologia. 8^a ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 779-780.
- Tsavkelova, E.A.; Cherdyntseva, T.A.; Botina, S.G.; Netrusov, A.I. (2007) Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.* 162:69 –76.
- Vandamme, P., Bernardet, J.F., Segers, P., Kersters, K. Holmes, B. (1994). New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:827– 831.
- Venter H.; Osthoff, G.; Litthauer, D.(1999) Purification and characterization of a metalloprotease from *Chryseobacterium indologenes* ix9a and determination of the amino acid specificity with electrospray mass spectrometry. *Protein Expr. and Purif.* 15:282 – 295.
- Whipps, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.(2001) *J. of Experim. Botan.* 52:487-511.
- Wliffels, G.; Eisemann, C.; Riding, G.; Pearson, R.; Alun, J.; Willadsen, P.; Tellam, R. (2001). A novel family of chitin-binding proteins from insect type 2 peritrophic matrix: cDNA sequences, chitin binding activity, and cellular localization. *J. of Biol. Chem.* 276:15527-15536.
- Wyckoff, E. E., Lopreato, G. F., Tipton, K. A., Payne, S.M. (2005) *Shigella dysenteriae* ShuS Promotes Utilization of Heme as an Iron Source and Protects against Heme Toxicity. *J. Bacteriol.*16:5658–5664.
- Yamaguchi, S.; Yokoe M. A. (2000) A Novel Protein-Deamidating Enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a Newly Isolated Bacterium from Soil. *Apl. and Environm. Microbiol.* 66:3337–3343.
- Yanagida, N., Uozumi, T., Beppu, T. (1986) Specific excretion of *Serratia* protease through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 166:937–944.
- Yeh, H. Y.; Klesius, P. H. (2011) Over-expression, purification and immune response to *Aeromonas hydrophila* AL09-73 flagellar proteins. *Fish Shellfish Immunol.* 31:278-1283.
- Zimmer W.; Hundeshagen B.; Niederau E. (1994) Demonstration of the indolepyruvate decarboxylase gene homologous in different auxin producing species of the Enterobacteriaceae. *Can. J. Microbiol.* 40:1072–1076.