



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

SELEÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS CULTIVÁVEIS, SIMBIONTES DE
Anopheles darlingi (Root, 1926), PARA O CONTROLE DA MALÁRIA POR
PARATRANSGÊNESE

ELERSON MATOS ROCHA

MANAUS/AM
2020/01

ELERSON MATOS ROCHA

**SELEÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS CULTIVÁVEIS, SIMBIONTES DE
Anopheles darlingi (Root, 1926), PARA O CONTROLE DA MALÁRIA POR
PARATRANSGÊNESE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGBIOTEC-UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Wanderli Pedro Tadei

Coorientadora: Rosemary Aparecida Roque

Coorientador: Marcos César Fernandes Pessoa

**MANAUS/AM
2020/01**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R672b Rocha, Elerson Matos
Seleção de espécies bacterianas cultiváveis, simbiotes de Anopheles darlingi (Root, 1926), para o controle da malária por paratransgênese / Elerson Matos Rocha . 2020
90 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Wanderli Pedro Tadei
Coorientador: Rosemary Aparecida Roque
Coorientador: Marcos César Fernandes Pessoa
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bactérias simbióticas. 2. Anopheles darlingi. 3. paratransgênese. 4. Amazônia brasileira. I. Tadei, Wanderli Pedro. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



257ª. ATA DE DEFESA DE TESE

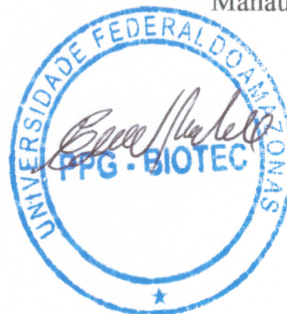
No dia 28 de fevereiro (sexta-feira) de 2020, às 09h:00 no auditório da Biblioteca do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Avenida Rodrigo Otavio – Petrópolis /INPA. **Elerson Matos Rocha** defendeu sua Tese de Doutorado intitulada: **“SELEÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS CULTIVÁVEIS SIMBIONTES AO *Anopheles darlingi* PARA O CONTROLE DA MALÁRIA POR PARATRANSGÊNESE”**

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dra. Rosemary Aparecida Roque	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 730 703 436-00
Dr. Jayme Augusto de Souza Neto	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 215 986 630-52
Dra Neila Soares Picanço	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 276 421 782-04
Dr. Ademir Castro e Silva	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 111.043.762-53
Dr. Grafe Oliveira Pontes.	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura: CPF: 860 082 183-53

Manaus, 28 de fevereiro de 2020.

Resultado Final: Aprovado(a) (X)
Reprovado(a) ()



AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade na realização de um dos maiores sonhos da minha vida.

À CAPES pelo auxílio financeiro, que sem dúvida foi mais que importante ao longo dos quatro anos de trabalho.

Ao meu orientador Dr. Wanderli Pedro Tadei pelo total apoio na realização deste trabalho. Muito obrigado.

Aos meus Coorientadores; Dra. Rosemary Roque, Marcos César Fernandes Pessoa e Olle Terenius pela colaboração na execução deste trabalho.

Ao Dr. Osvaldo Marinotti, pelo apoio e colaboração em todas as etapas deste trabalho. Obrigado por tudo.

Ao Dr. Marcelo Lorena, pelo apoio neste trabalho.

Ao Dr. Spartaco Astolfi Filho, pelo apoio na realização das etapas moleculares no laboratório de tecnologia do DNA da UFAM.

A todos os meus irmãos; Jairo Filho, Jainer, Jaison, Jarenilson, Emerson, Elizandra, Silviane, Silvana, Rizonete e Rejane, que sempre me apoiam em minha carreira acadêmica.

Aos meus amigos do Laboratório da Malária e Dengue do INPA: Juan Campos, Deidre Machado, Laura Viana, Veranilce Muniz, Marta Oliveira, Eunice Medeiros, Francisco Augusto, Willian Ribeiro e em especial ao Ricardo Katak.

Aos meus colegas do Centro de apoio multi-disciplinar da UFAM: Paulo, Júlio Nino, Kerollen, Diego, Enedina, Edson, Alana e Leissandra.

À minha namorada Elen Oliveira, pelo companheirismo, paciência e por sempre estar do meu lado em todos os momentos me apoiando e me fazendo muito feliz. Sinto-me completo ao seu lado e sei que venceremos juntos.

A todos, que direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse trabalho. Muito obrigado!

RESUMO

Apesar dos avanços positivos na luta contra a malária a cada ano, essa doença ainda é uma das mais letais entre as doenças parasitárias transmitidas por vetores em todo o mundo, com os maiores registros de mortes na África, causados principalmente por *Plasmodium* spp. e transmitido por *Anopheles* spp. Dentre as formas de controle dessa doença, a paratransgênese se destaca como uma alternativa nova e promissora que visa inibir o desenvolvimento de parasitas no vetor por meio da ação de bactérias geneticamente modificadas. Esta nova abordagem está sendo conduzida com sucesso contra o *Plasmodium* spp. em laboratório no continente africano. Devido aos constantes registros de casos de malária na Amazônia brasileira, essa região também poderia ser alvo de abordagens paratransgênicas, com o objetivo de bloquear o desenvolvimento de *Plasmodium vivax* no corpo de *Anopheles darlingi*, os principais responsáveis por esta doença nesta região. Nesse sentido, o primeiro passo deve ser direcionado à obtenção de bactérias simbiotes de *A. darlingi*, que podem ser transmitidas horizontal e verticalmente em mosquitos e não serem patogênicas para os seres humanos. Tais características são essenciais na paratransgênese. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo selecionar espécies bacterianas cultiváveis, simbiotes de *A. darlingi* para controlar a malária por paratransgênese. Isolamentos bacterianos foram realizados em amostras associadas ao ambiente de desenvolvimento larval, bem como no corpo de *A. darlingi*, a fim de identificar espécies recorrentes nas diferentes amostras. Após o sequenciamento do gene 16S rRNA das colônias isoladas, foram identificadas 179 espécies nas amostras de Coari e Manaus, que constituem 83 espécies diferentes, 12 de Coari e 71 de Manaus. As espécies predominantes em todas as amostras, de Coari e Manaus, foram: *Acinetobacter nosocomialis*; *Enterobacter asburiae*; *Klebsiella pneumoniae*; *Serratia marcescens*; *Bacillus cereus*; *Pantoea dispersa*; *Elizabethkingia miricola*; *Klebsiella variicola*; *Stenotrophomonas pavanii* e *Pantoea agglomerans*. Após análise de alguns critérios, fundamentais para o uso em paratransgênese, como a não patogenicidade para humanos, as cepas bacterianas *S. marcescens*-Adu40; *E. asburiae*-Adu24; *P. dispersa*-Adu38 e *P. agglomerans*-Ovo3, foram selecionados para serem transformados com um plasmídeo, contendo uma sequência de genes que expressa uma proteína verde fluorescente, quando exposta à luz UV. Assim, foi revelado o potencial de duas cepas bacterianas analisadas quanto à capacidade de transferência horizontal e vertical em *A. darlingi*. Tais cepas foram: *S. marcescens*-Adu40 e *P. agglomerans*-Ovo3. Os resultados dessas análises concluíram que essas duas linhagens têm o potencial de serem usadas no controle da malária por paratransgênese.

Palavras-chave: Bactérias simbióticas, *Anopheles darlingi*, paratransgênese e Amazônia brasileira.

SUMMARY

Despite positive advances in the fight against malaria each year, this disease is still one of the most lethal among vector-borne parasitic diseases worldwide, with the highest death records in Africa, caused mainly by *Plasmodium* spp. and transmitted by *Anopheles* spp. Among the ways of controlling this disease, paratransgenesis stands out as a new and promising alternative that aims to inhibit the development of parasites within the vector through the action of genetically modified bacteria. This new approach is being successfully conducted against *Plasmodium* spp. in laboratory on the African continent. Due to the constant records of malaria cases in the Brazilian Amazon, this region it could be also the target of paratransgenic approaches, with the objective of blocking the development of *Plasmodium vivax* within the body of *Anopheles darlingi*, the main responsables for this disease in this region. In this sense, the first step should be directed towards obtaining of symbionts bacteria of *A. darlingi*, which can be transmitted horizontally and vertically in mosquitoes and not being pathogenic to humans. Such characteristics are essential in paratransgenesis. In this sense, this work aimed to select cultivable bacterial species, symbionts of *A. darlingi* to control malaria by paratransgenesis. Bacterial isolations were performed on samples associated with the larval development environment, as well as on the body of *A. darlingi*, in order to identify recurrent species in the different samples. After sequencing the 16S rRNA gene of the isolated colonies, 179 species were identified in the samples from Coari and Manaus, which constitute 83 different species, 12 from Coari and 71 from Manaus. The predominant species in all samples, from Coari and Manaus, were: *Acinetobacter nosocomialis*; *Enterobacter asburiae*; *Klebsiella pneumoniae*; *Serratia marcescens*; *Bacillus cereus*; *Pantoea dispersa*; *Elizabethkingia miricola*; *Klebsiella variicola*; *Stenotrophomonas pavanii* and *Pantoea agglomerans*. After analyzing some criteria, fundamental for use in paratransgenesis, such as non-pathogenicity to humans, the bacterial strains *S. marcescens*-Adu40; *E. asburiae*-Adu24; *P. dispersa*-Adu38 and *P. agglomerans*-Ovo3, were selected to be transformed with a plasmid, containing a sequence of genes that expresses a green fluorescent protein, when exposed to UV light. Thus, the potential of two bacterial strains that went analyzed for horizontal and vertical transfer capacity in *A. darlingi* was revealed. Such strains were: *S. marcescens*-Adu40 and *P. agglomerans*-Ovo3. The results of these analyzes concluded that these two strains have the potential to be used to control malaria by paratransgenesis.

Keywords: Symbiotic bacteria, *Anopheles darlingi*, paratransgenesis and Brazilian Amazon.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Locais e datas das coletas de todas as amostras utilizadas neste trabalho.....	32
Tabela 2. Número de colônias bacterianas isoladas, grupos formados e espécies bacterianas identificadas das amostras dos municípios de Coari e Manaus.	48
Tabela 3. Número total de colônias bacterianas identificadas de cada amostra dos municípios de Coari e Manaus	49
Tabela 4. Quantidade de filos e gêneros bacterianos detectados nas amostras de Coari.....	50
Tabela 5. Espécies bacterianas identificadas das amostras do município de Coari	51
Tabela 6. Gêneros bacterianos e número de espécies detectadas nas amostras de Manaus	55
Tabela 7. Espécies bacterianas identificadas das amostras de Manaus – Filo Proteobacteria..	56
Tabela 8. Espécies bacterianas identificadas das amostras de Manaus – Filo Firmicutes.....	59
Tabela 9. Espécies bacterianas identificadas das amostras de Manaus – Filo Bacteroidetes ...	60
Tabela 10. Espécies bacterianas identificadas das amostras de Manaus – Filo Actinobacteria	61
Tabela 11. Cepas das espécies bacterianas identificadas das amostras de estômago e ovários	62
Tabela 12. Competência das cepas <i>S. marcescens</i> -Adu40; <i>E. asburiae</i> -Adu24; <i>P. dispersa</i> -Adu38; e <i>P. agglomerans</i> -Ovo3 em assimilar o plasmídeo pKS1-GFP no processo de transformação genética.	74
Tabela 13. Prevalência da cepa <i>S. marcescens</i> -Adu40 durante o teste de transmissão vertical e horizontal em <i>A. darlingi</i>	76
Tabela 14. Prevalência das cepas <i>P. agglomerans</i> -Ovo3 durante os testes de transmissão vertical e horizontal em <i>A. darlingi</i>	77
Tabela 15. Análise do grupo controle nos testes de transmissão vertical e horizontal em <i>A. darlingi</i>	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do ciclo da malária.....	18
Figura 2. Morfologia do ovo de <i>A. darlingi</i>	21
Figura 3. Morfologia das larvas de <i>A. darlingi</i>	22
Figura 4. Morfologia da pupa de <i>A. darlingi</i>	22
Figura 5. Morfologia do mosquito adulto <i>A. darlingi</i>	23
Figura 6. <i>Status</i> de resistência aos piretróides dos vetores de malária medidos com bioensaios de inseticidas no mundo, 2010–2016 (WHO, 2017).	25
Figura 7. Mapa do gene 16S rRNA	30
Figura 8. Coleta de água utilizando a malha de aço e tubo falcon.	33
Figura 9. Coleta de larvas e pupas de <i>A. darlingi</i>	34
Figura 10. Coleta das fêmeas de mosquitos anofelinos.....	34
Figura 11. Identificação de <i>A. darlingi</i>	35
Figura 12. Estômago de <i>A. darlingi</i>	35
Figura 13. Ovário de <i>A. darlingi</i>	36
Figura 14. Manutenção de larvas e adultos de <i>A. darlingi</i> em laboratório	37
Figura 15. Isolamento bacteriano por esgotamento de estrias cruzadas.....	38
Figura 16. Purificação, coloração de Gram e preservação das bactérias isoladas.....	40
Figura 17. Plasmídeo de expressão pKS1-GFP.....	44
Figura 18. Esquema para realização dos testes de transmissão vertical e horizontal.....	46
Figura 19. Comparação do número de isolados entre as amostras de Coari e Manaus.....	47
Figura 20. Prevalência das espécies bacterianas nas diferentes amostras de Coari	52
Figura 21. Características morfológicas das cepas C19 e C36 de <i>S. marcescens</i>	53
Figura 22. Características morfológicas de <i>B. wiedmannii</i> , cepa C22	53
Figura 23. Prevalência de espécies bacterianas nas amostras de estômagos, ovários e mosquito inteiro macerado de Manaus.	63
Figura 24. Prevalência das espécies bacterianas nas diferentes amostras de Manaus.....	65
Figura 25. Características morfológicas de <i>Acinetobacter nosocomialis</i> , cepa Wat1.....	66
Figura 26. Características morfológicas de <i>Enterobacter asburiae</i> , cepa Adu24.....	67
Figura 27. Características morfológicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , cepa Adu14.....	68
Figura 28. Características morfológicas de <i>Serratia marcescens</i> , cepa Adu40.....	68
Figura 29. Características morfológicas de <i>Bacillus cereus</i> , cepa Pup2	69
Figura 30. Características morfológicas de <i>Pantoea dispersa</i> , cepa Adu38.....	70
Figura 31. Características morfológicas de <i>Stenotrophomonas pavanii</i> , cepa Adu32.....	70
Figura 32. Características morfológicas de <i>Klebsiella variicola</i> , cepa Pup20.....	71
Figura 33. Características morfológicas de <i>Pantoea agglomerans</i> , cepa Ovo3.....	71
Figura 34. Características morfológicas de <i>Elizabethkingia miricola</i> , cepa Adu12	72
Figura 35. Cepa DH5 α de <i>Escherichia coli</i> expressando a inflorescência verde.....	73
Figura 36. Cepas bacterianas de <i>S. marcescens</i> -Adu40 (A) e <i>P. agglomerans</i> -Ovo3 (B) portando plasmídeo pKS1-GFP e expressando a proteína fluorescente.	75
Figura 37: Mosquitos emergidos em laboratório, apresentando fluorescência em luz UV após 12h da alimentação com solução contendo glicose 10% e ampicilina v/v (100 mg/ml).....	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 JUSTIFICATIVA.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE MALÁRIA.....	15
3.2 PROTOZOÁRIOS CAUSADORES DA MALÁRIA.....	16
3.3 PRINCIPAIS VETORES DA MALÁRIA NO BRASIL.....	19
3.4 BIOLOGIA DE <i>Anopheles darlingi</i>	20
3.5 RESISTÊNCIA DOS VETORES AOS INSETICIDAS E DOS PARASITAS ÀS DROGAS ANTIMALÁRICAS.....	23
3.6 O USO DA PARATRANSGENESE NO CONTROLE DA MALÁRIA.....	25
3.7 MICROBIOTA BACTERIANA ASSOCIADA AOS MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS.....	27
3.8 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS PELO GENE 16S rRNA.....	29
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 GERAL.....	31
4.2 ESPECÍFICOS.....	31
5 METODOLOGIA.....	32
5.1 LOCAIS E ORIGEM DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	32
5.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA, LARVAS, PUPAS, OVOS E FÊMEAS DE <i>A. darlingi</i> E ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	33
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS OVOS, LARVAS, PUPAS E ADULTOS DE <i>A. darlingi</i> E DISSECAÇÃO DE ESTÔMAGOS E OVÁRIOS.....	35
5.4 MANUTENÇÃO DE <i>A. darlingi</i> EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.....	36
5.5 ISOLAMENTO BACTERIANO DAS AMOSTRAS.....	37
5.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS.....	39
5.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS.....	40
5.8 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS POR BIOINFORMÁTICA.....	42
5.9 PREPARO DAS CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA.....	43
5.10 MONITORAMENTO DAS BACTÉRIAS TRANSFORMADAS DURANTE O CICLO DE VIDA DE <i>A. darlingi</i>	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.1 ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS DE TODAS AS AMOSTRAS DOS MUNICÍPIOS DE COARI E MANAUS.....	47
6.2 CEPAS BACTERIANAS IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS DO MUNICÍPIO DE COARI.....	50
6.3 CEPAS BACTERIANAS IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS DE MANAUS.....	54
6.4 PERFIL DAS ESPÉCIES BACTERIANAS SELECIONADAS PARA OS TESTES DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA COM O PLASMÍDEO pKS1-GFP.....	66
6.5 ANÁLISE DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DAS CEPAS BACTERIANAS SELECIONADAS.....	73
6.6 ANÁLISE DE TRANSMISSÃO VERTICAL E HORIZONTAL DAS CEPAS <i>S. marcescens</i> -Adu40 E <i>P. agglomerans</i> -Ovo3 EM <i>A. darlingi</i>	75
CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença que causa grandes impactos negativos à saúde pública em suas áreas de ocorrência. Cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, situadas em regiões tropicais do planeta e estima-se que 228 milhões de casos de malária ocorreram no mundo em 2018, com um número registrado de 405.000 óbitos e que essa enfermidade prevalece em 91 países (WHO, 2019).

No Brasil, a região amazônica registra os maiores números de casos de malária e o principal parasita é *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, 1890, sendo transmitido, em índices bastantes elevados, por *Anopheles darlingi* Root, 1926, considerado o principal vetor desta doença no norte do país. As condições tropicais desta região contribuem para a prevalência do vetor que é beneficiado por inúmeros criadouros naturais e artificiais (TADEI et al., 2010; 2017; WHO, 2018).

Pessoas contaminadas com as diferentes espécies de *Plasmodium* são tratadas principalmente com Artemisina, Cloroquina e Primaquina. Entretanto, desde 1980, cada vez mais cepas de *Plasmodium* vêm se mostrando resistentes a esses compostos, o que traz consequências negativas à saúde global e requer outros medicamentos como alternativa de controle aos parasitas causadores da malária (WHO, 2018).

Nesta mesma vertente, os mosquitos transmissores vêm adquirindo resistência aos compostos químicos (Piretróides, Organoclorados, Carbamatos e Organofosfatos) utilizados em excesso e por muitos anos no controle vetorial. Embora novos formulados sejam implementados a cada ano, é só uma questão de tempo para que as novas gerações de mosquitos fiquem tolerantes. Neste contexto, existe uma grande necessidade de desenvolver novas abordagens para controlar a malária de forma mais eficaz (ENAYATI & HEMINGWAY, 2010; RAGHAVENDRA et al., 2011; WANG & JACOBS-LORENA, 2013; WHO, 2017).

Uma alternativa que se apresenta viável para diminuir os casos de malária, seria impedir que os gametas de *Plasmodium*, ainda no intestino médio das fêmeas de mosquitos, não se desenvolvessem nas formas de esporozoítos, pois são estas formas que infectam os animais (WANG & JACOBS-LORENA, 2013).

No sentido de bloquear o desenvolvimento de *Plasmodium* spp. no interior dos mosquitos anofelinos, podemos utilizar os atributos da Paratransgênese que se define como uma técnica que utiliza microrganismos simbiotes, geneticamente modificados, para expressarem proteínas *anti*-parasíticas dentro do corpo de um determinado vetor de doenças e

assim bloquear o desenvolvimento dos parasitas de interesse. Esta nova abordagem vem se tornando cada vez mais utilizada para bloquear o desenvolvimento de parasitas causadores de doenças, incluindo os protozoários causadores da malária (CONTE, 1997; BEARD et al., 2002; HURWITZ et al., 2011; MANCINI et al., 2016; WANG et al., 2012; 2017).

Por meio do estudo da biologia de anofelinos e *Plasmodium* spp., sabe-se que uma fêmea de mosquito pode ingerir de um humano infectado na ordem de 10.000 gametócitos, que rapidamente se diferenciam em gametas masculinos e femininos para formarem zigotos, que, por sua vez, se diferenciam em oocinetos. Os oocinetos então migram por meio do sangue ingerido até que atinjam o epitélio do intestino médio, onde atravessam, em seguida, e se diferenciam em oocistos. Após a maturação, cada oocisto libera milhares de esporozoítos na hemocele, seguida por invasão das glândulas salivares de mosquitos. O ciclo de transmissão é concluído quando o mosquito infectado pica o próximo hospedeiro vertebrado transmitindo, por meio da saliva, alguns dos esporozoítos (WHITTEN et al., 2006).

Dos milhares de gametócitos ingeridos pela fêmea do mosquito, cerca de 10% consegue se diferenciar com sucesso em oocinetos e apenas metade desta nova forma consegue invadir o epitélio do intestino médio para formar oocistos. (TAYLOR, 1999; WHITTEN et al., 2006).

Claramente é observado um gargalo no desenvolvimento do parasita na fase de oocinetos no intestino médio do mosquito onde compartilha desse espaço com bactérias simbiotes do vetor, fazendo deste ambiente alvo preferencial para interferir com o ciclo do parasita por meio de técnica de paratransgênese (DREXLER et al., 2008; ABRAHAM & JACOBS-LORENA, 2004; WANG & JACOBS-LORENA, 2013).

Yoshida et al., (2001), utilizando *Escherichia coli*, geneticamente modificada, detectaram que uma imunotoxina de cadeia simples reduziu significativamente a densidade de oocistos de *Plasmodium berghei* no intestino de mosquitos *Anopheles stephensi*.

Outro estudo realizado por Riehle et al., (2007), utilizando *P. berghei* e o mosquito vector *A. stephensi*, também detectaram que uma cepa recombinante de *E. coli* expressou na glândula salivar e intestino médio uma proteína que reduziu a formação de oocistos do parasita.

Embora estes trabalhos tenham apresentados resultados positivos com a utilização de *E. coli*, foram detectadas algumas limitações em usar estirpes dessa espécie bacteriana, pois, por não ser uma bactéria simbiote obrigatória dos mosquitos testados, sofreu ação imunológica dos mosquitos. Esse fato torna cepas de *E. coli* inviáveis para serem utilizadas no controle da malária por paratransgênese (RIEHLE et al., 2007).

Wang et al., (2012), introduziram *Pantoea agglomerans*, geneticamente modificadas, no intestino médio de *Anopheles gambiae*. A ação de *P. agglomerans* resultou em 98% de redução na população de *Plasmodium falciparum* dentro do intestino médio do mosquito. Neste caso *P. agglomerans* foi isolada a partir do intestino médio de *A. gambiae* cuja geração e espécie foram as mesmas utilizadas nos bioensaios, o que justifica o sucesso do trabalho.

Para que uma bactéria seja adequada na execução da paratransgênese é preciso avaliar alguns critérios importantes, em que o candidato deve ser simbiote ao mosquito, não ser caracterizado como patogênico aos seres humanos pela comunidade científica, ser capaz de sobreviver por toda a metamorfose do mosquito, ser encontrado também no ambiente aquático, onde se desenvolvem as larvas dos vetores de doenças (ITO et al., 2002; RIEHLE et al., 2007; SMITH et al., 2013).

Wang et al., (2017), detectaram uma bactéria do gênero *Serratia* com potencial anti-*Plasmodium* ao longo de gerações de mosquitos *A. gambiae*. A cepa da bactéria foi isolada do próprio mosquito, em seguida marcada com um gene que expressa uma proteína fluorescente GFP e, em seguida, reintroduzida, por meio de alimentação sanguínea, em populações de mosquitos, afim de avaliar a capacidade de transmissão horizontal e vertical. Os resultados constatarem essa capacidade de transmissão nas duas vertentes requeridas. Em seguida, a cepa foi transformada geneticamente com um outro gene de proteína anti-*Plasmodium* e também foi introduzida nos mosquitos. Os resultados foram expressivos contra *P. falciparum*, diminuindo a quantidade de parasitas, via intestino médio, do mosquito *A. gambiae*.

Os resultados destes trabalhos demonstram que está ocorrendo um progresso bastante positivo com o uso da paratransgênese visando o controle da malária no continente africano. Isso precisa ser também introduzido no Brasil que notifica centenas de casos da doença a cada ano, a maioria na região amazônica, principalmente por *P. vivax* transmitido por *A. darlingi*.

Por ser uma região rica em biodiversidade, sobretudo a microbiana, é de se esperar que na Amazônia brasileira existam muitas espécies de bactérias simbiotes de *A. darlingi*, que ainda são desconhecidas pela comunidade científica e que podem ser utilizadas no controle de *Plasmodium* spp. por meio da paratransgênese (LEWINSOHN & PRADO, 2005; ARRUDA, 2017).

Neste sentido, é preciso darmos o primeiro passo na busca por bactérias simbiotes à *A. darlingi*. Nesta vertente este trabalho tem como objetivo selecionar espécies bacterianas cultiváveis, simbiotes ao *A. darlingi* para o controle da malária por paratransgênese.

2 JUSTIFICATIVA

Os efeitos negativos que a malária ocasiona na saúde global contribuem para que esta doença ainda seja considerada uma das que mais matam no mundo, sobretudo crianças e leva prejuízos econômicos, afetando as medidas de prevenção nas áreas de ocorrência, entre elas a Região Norte do Brasil (WHO, 2018).

Esforços para controlar esta doença se concentram na eliminação do vetor, mosquitos do gênero *Anopheles* que por serem altamente antropófilos, preferem se alimentar de sangue humano. Esta tentativa de controle se dá por meio da utilização de inseticidas, que quanto mais são utilizados, mais contribuem para o aumento de populações de insetos resistentes a estes compostos químicos (TADEI et al., 2017; WHO, 2018).

Fato semelhante acontece com o uso excessivo e prolongado de drogas visando combater os parasitas do gênero *Plasmodium* no interior do corpo de humanos. As drogas utilizadas ajudam a diminuir o número de mortes, mas contribuem para o crescente número de cepas dos parasitas resistentes aos produtos farmacêuticos (WHO, 2018).

Com isso, se torna crucial novos esforços no sentido de desenvolver ferramentas alternativas para o controle da malária a curto e longo prazo. Uma das metas atuais é utilizar bactérias simbiotas de anofelinos para expressarem moléculas anti-*Plasmodium* no interior do intestino médio de mosquitos. Esta nova abordagem é denominada paratransgênese e requer candidatos adequados para o seu sucesso, onde as bactérias precisam ser simbiotas do vetor e sobreviver por toda a metamorfose do inseto (JACOBS-LORENA, 2004; WANG & JACOBS-LORENA, 2013).

Os mosquitos estão presentes no mundo há milhares de anos, portanto, é de se esperar que existam muitas espécies bacterianas que desenvolveram mecanismos de convivência simbiótica com estes seres em todo seu ciclo de vida. Se forem descobertas, estas bactérias podem ser utilizadas para bloquear o desenvolvimento dos protozoários dentro do corpo dos mosquitos, impedindo a transmissão dos parasitas aos humanos. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo conhecer espécies bacterianas de ambiente amazônico do Brasil que vivam em associação com *A. darlingi*, para que sejam utilizadas no controle da malária por paratransgênese.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, descrito pela primeira vez por Machiavava e Celli (1983), transmitida ao homem pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*, descrito por Meigen (1818), que nessas condições são considerados vetores dessa doença (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Esta doença causa grandes impactos negativos à saúde pública em suas áreas de ocorrência. Cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, situadas em regiões tropicais do planeta e estima-se que 228 milhões de casos de malária ocorreram no mundo, com um número registrado de 405.000 óbitos e que essa enfermidade prevalece em 91 países, com maior incidência no continente Africano (WHO, 2018).

Nas regiões das Américas da organização mundial da saúde, os maiores registros são da Venezuela com 53% dos casos de malária, seguido pelo Brasil com 22% e Colômbia com 8%, sendo ocasionados principalmente por *P. vivax* com 75% dos registros e *P. falciparum* (WHO, 2018). Em 2019, foram registrados mais de 151.966 mil casos no país, sendo 99% deste total na região amazônica, onde o Estado do Amazonas foi o mais predominante com 39% dos registros, seguido por Pará com 22%, Roraima com 15%, Rondônia e Acre com 8%, Amapá com 7% e Mato Grosso com 1% (BRASIL, 2019).

A malária ocorre quando parasitas entram na corrente sanguínea de um vertebrado e se multiplicam, primeiramente no fígado, em seguida no interior das hemácias, as destruindo, deixando o hospedeiro debilitado com risco de morte (NEVES et al., 2005). Para alcançarem o sucesso do ciclo de vida, os protozoários se adaptaram, ao longo do tempo, em dois hospedeiros: um invertebrado que é o mosquito do gênero *Anopheles*, onde ocorre a fase sexuada do *Plasmodium*, e outro, um vertebrado, onde ocorre a fase assexuada, podendo ser o homem ou outros animais, como os primatas e animais domesticados (NEVES et al., 2005; MUELLER et al., 2009).

A atuação de diferentes espécies de *Plasmodium* como parasitas em humanos e outros animais favorecem a permanência da malária ao redor do mundo. Os mosquitos anofelinos têm preferência por ambientes onde tenham coleções de água com pouca matéria orgânica e parcialmente sombreadas no interior de florestas com o clima quente e úmido. Na Amazônia, existem milhares de locais com esse perfil onde pessoas frequentam nos fins de semana ou

residem, e dessa forma a malária vem se mantendo ativa ao longo dos anos nesta região. (TADEI et al., 1988; 2017).

Os sintomas mais comuns dessa doença são: febre alta, calafrios, dores de cabeça e musculares, aumento da frequência cardíaca, desorientação, sonolência, convulsões e vômitos. Existem algumas diferenças na ação parasitária das diferentes espécies de *Plasmodium*. Quando a infecção se dá por *P. falciparum*, pode vir acontecer a malária cerebral, o que na maioria dos casos leva a morte do paciente (FERREIRA et al., 2003; VEGA et al., 2014).

O fator que mais contribui para a dispersão da malária no mundo é o clima. O mosquito tem mais preferência por regiões que possuem temperatura acima de 20 graus Celsius (°C). A Amazônia brasileira apresenta essas condições de clima quente e úmido, além de um ciclo hidrológico de enchentes e vazantes que favorecem a formação de inúmeros criadouros para anofelinos (TADEI et al., 2010; WOLFARTH, 2011).

O processo de desenvolvimento de *Plasmodium* spp. nos mosquitos, incluindo o seu deslocamento até as glândulas salivares, dura em torno de nove dias, isso quando a temperatura está acima dos 30 °C. Para que ocorra a transmissão em animais vertebrados, as fêmeas dos mosquitos precisam viver, em média, por este período ou mais dias, assim só as fêmeas mais velhas conseguem realizar com sucesso essa transmissão (CDC, 2018).

Em temperaturas abaixo de 20 °C, o desenvolvimento dos parasitas não pode ser concluído, isso explica a intensa transmissão da malária somente em áreas com clima quente úmidos. O *P. vivax* não completa seu ciclo no mosquito se a temperatura estiver abaixo de 15 °C, e o *P. falciparum* se a temperatura estiver abaixo de 20 °C (CDC, 2018).

3.2 PROTOZOÁRIOS CAUSADORES DA MALÁRIA

Os agentes etiológicos causadores da malária são protozoários do gênero *Plasmodium* spp. pertencentes à classe Sporozoa do filo Apicomplexa. Realizam seu ciclo assexuado em hepatócitos e hemácias de vertebrados, estes considerados hospedeiros intermediários, e o ciclo sexuado nos anofelinos, hospedeiro definitivo (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Existem mais de 150 espécies de *Plasmodium* capazes de infectar diferentes espécies de animais, mas somente seis espécies do parasita são reconhecidas com potencial de desencadear a malária nos seres humanos, sendo eles: *Plasmodium malariae* Feletti e Grassi, 1889, encontrado em todo o mundo; *Plasmodium vivax* Grassi e Feletti, 1890, é encontrado principalmente na Ásia, América Latina e em algumas partes da África; *Plasmodium*

falciparum Welch, 1897, é encontrado em todo mundo em áreas tropicais e subtropicais; *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulligan, 1932, geralmente observado no Sudeste Asiático e *Plasmodium ovale* Stephens, 1922, que compreende duas espécies: *Plasmodium ovale wallikeri* e *Plasmodium ovale curtii* que ocorrem de forma simpátrica na Ásia e África (FERREIRA et al., 2003; SINGH et al., 2004; SUTHERLAND et al., 2010; FUEHRER, 2014; AMIR et al., 2016).

Em humanos, durante o repasto sanguíneo das fêmeas dos mosquitos anofelinos, os parasitas são injetados diretamente na corrente sanguínea na forma de esporozoítos. Cerca de 30 minutos invadem os hepatócitos (células do fígado) e após esse tempo, não é possível detectá-los na corrente sanguínea. No fígado são formados os esquizontes, onde milhares de elementos filhos se desenvolvem, os chamados merozoítos. Até aqui, esta etapa é chamada de esquizogonia pré-eritrocítica, que dura cerca de seis dias para *P. falciparum*, oito dias para *P. vivax*, nove dias para *P. ovale* e de 12 a 16 dias para *P. malariae* (REY, 2001; FERREIRA et al., 2003; CDC, 2018).

Na fase seguinte do ciclo, as células parasitadas do fígado ficam muito distendidas e acabam se rompendo liberando os merozoítos na corrente sanguínea. Muitos destes são fagocitados e destruídos pelas células de Kupffer, e os outros sobrevivem invadem as hemácias e dão início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios no vertebrado, o chamado ciclo hemático ou ciclo eritrocítico. A duração deste depende da espécie do parasita, sendo de 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e de 72 horas para *P. malariae* (REY, 2001; FERREIRA et al., 2003; CDC, 2018).

No ciclo eritrocítico o desenvolvimento do protozoário dentro das hemácias se dá por esquizogonia, com consequente formação de novos merozoítos, que se multiplicam por divisão binária, até serem liberados na corrente sanguínea após ruptura do eritrócito, para em seguida invadirem novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos, algumas formas se diferenciam em estágios sexuados, os chamados gametócitos, que não mais se dividem, mas seguem o seu desenvolvimento no mosquito vetor, caso este realize o repasto sanguíneo neste hospedeiro vertebrado que contenha estes gametócitos (REY, 2001; FERREIRA et al., 2003).

Os microgametócitos e macrogametócitos masculinos e femininos, respectivamente, permanecem na corrente sanguínea até serem ingeridos por uma fêmea do mosquito, durante um repasto sanguíneo. Dentro do intestino do mosquito, os gametócitos sofrem rápida divisão celular, um processo conhecido como exflagelação, que resulta na formação de oito gametas

masculinos ou microgametas. Os gametócitos femininos transformam-se em macrogametas (REY, 2001; FERREIRA et al., 2003; CDC, 2018).

A fusão dos microgametas e macrogametas resulta na formação do ovo ou zigoto. Em poucas horas, o zigoto transforma-se em um estágio móvel alongado chamado oocineto, que atravessa a parede do intestino e origina cistos em sua parede exterior, o oocisto. No interior do oocisto, ocorre uma divisão meiótica seguida de várias divisões mitóticas, resultando na formação de milhares de esporozoítos haplóides. Ao final deste processo, o oocisto se rompe e os esporozoítos migram para as glândulas salivares dos mosquitos. Durante os próximos repastos sanguíneos, eles serão injetados na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. O ciclo esporogônico no mosquito dura entre 10 e 17 dias (REY, 2001; FERREIRA et al., 2003; CDC, 2018).

Uma das características dos esporozoítos de *P. vivax* e *P. ovale* é que algumas vezes, após invadirem os hepatócitos, alguns assumem uma forma denominada hipnozoítos, os quais podem permanecer em um estágio de dormência por vários meses até se transformarem em esquizontes, que se multiplicam e dão origem aos merozoítos, dando continuidade ao ciclo eritrocítico. Assim, alguns pacientes que já haviam se recuperado da infecção, voltam a apresentar os sintomas da malária. Esta nova manifestação clínica recebe o nome de recaídas (FERREIRA et al., 2003).

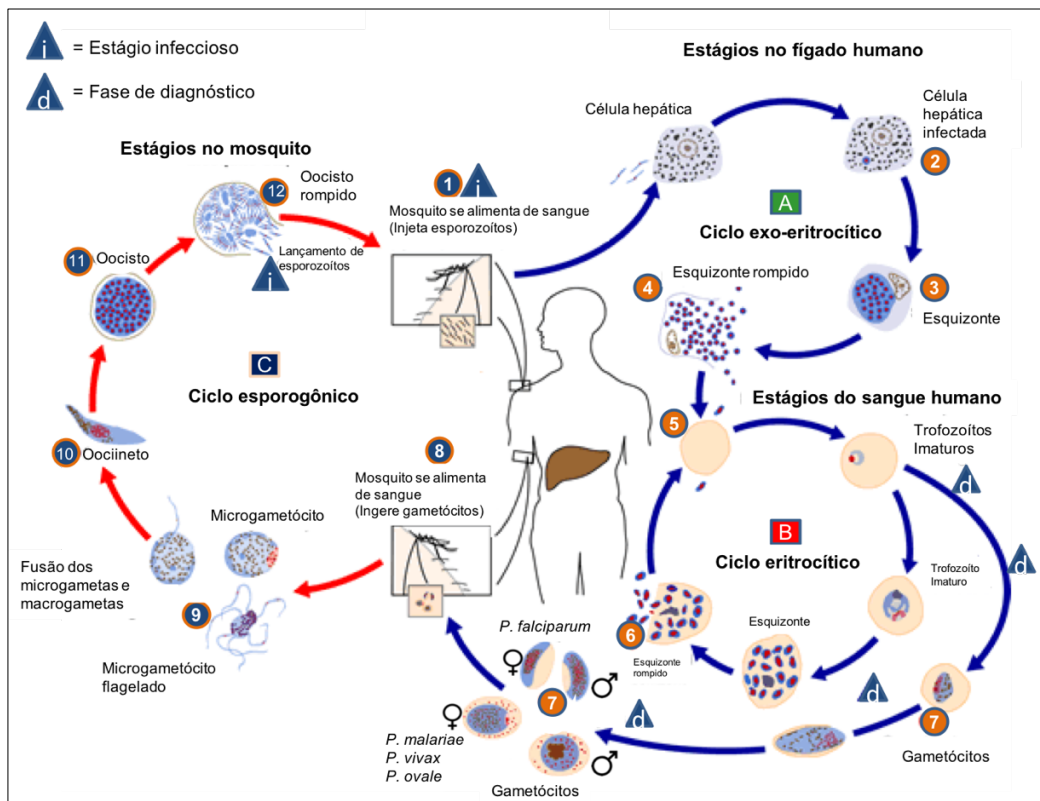


Figura 1. Esquema do ciclo da malária

Fonte. <<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>> com adaptações.

3.3 PRINCIPAIS VETORES DA MALÁRIA NO BRASIL

Ao longo dos séculos, os estudos da biologia de insetos proporcionaram a identificação de muitas espécies de mosquitos capazes de veicular agentes causadores de doenças e desde então os cientistas vêm tentando elaborar mecanismos para impedir essa veiculação. Estes mosquitos ficaram conhecidos como vetores de doenças e são encontrados em todas as partes do mundo, transmitindo as mais variadas doenças (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os mosquitos transmissores dos protozoários causadores da malária pertencem à família Culicidae, subfamília Anophelinae, conhecidos como anofelinos representados por três gêneros; *Bironella*, *Anopheles* e *Chagasia*, sendo estes dois últimos presentes no Brasil, mas com predomínio do gênero *Anopheles*, descrito com 486 espécies, sendo 39 dessas ocorrentes no Brasil e a principal delas é *Anopheles darlingi* (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HIWAT & BRETAS, 2011; WILKERSON et al., 2015).

Estes insetos, assim como todos os dípteros, são holometábolos, pois seu ciclo biológico se apresenta em quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Quando estão na fase de larvas, os mosquitos são aquáticos, compartilham um ambiente infestado por microrganismos, como bactérias, se alimentam de fitoplâncton e diversas partículas orgânicas. Os adultos, também chamados de pernilongos, cujas fêmeas são hematófagas e por esse processo podem transmitir patógenos aos animais vertebrados. A hematofagia ocorre porque as fêmeas precisam das proteínas do sangue para amadurecerem seus ovos no período de gestação (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os principais mosquitos vetores de *Plasmodium* sp. nas Américas são: *Anopheles aquasalis*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles albitarsis*, *A. darlingi*, *Anopheles freeborni*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Anopheles marajoara*, *Anopheles nuneztovari* e *Anopheles pseudopunctipennis*. No Brasil as mais comuns são: *A. aquasalis* Curry (1932); *A. albitarsis* Arribáizaga (1878); *A. braziliensis* Chagas (1907); *A. darlingi* Root (1926); *A. nuneztovari* Gabaldon (1940) e *A. triannulatus* Neiva e Pinto (1922) (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; SINKA et al., 2012).

Os maiores registros de casos de malária no Brasil são da região amazônica e o principal vetor é *A. darlingi* que nas últimas décadas foi a espécie que melhor se adaptou às alterações ambientais causadas pelo homem (TADEI et al., 1988; CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; HIWAT & BRETAS, 2011).

3.4 BIOLOGIA DE *Anopheles darlingi*

Anopheles darlingi é o principal vetor da malária na região amazônica do Brasil. Este mosquito é altamente antropofílico, que tem preferência por sangue humano, e apresenta comportamento endófilico, isto é, costuma descansar dentro das casas de pessoas para, no momento oportuno, se alimentar de sangue durante a noite. As fêmeas desses mosquitos também podem pernoitar na área externa das casas e se alimentar de sangue de outros mamíferos. Costumam atacar as pessoas, com elevada densidade, nas primeiras horas da noite, sendo esta uma característica dessa espécie (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 1992; 2010).

Nas áreas de sua ocorrência, *A. darlingi* é espécie que mais está presente no interior das localizadas próximas as florestas. Prefere climas tropicais e subtropicais, com índices elevados de umidade e temperatura. A Amazônia brasileira apresenta tais condições, dispondo de milhares criadouros naturais e artificiais, onde as fêmeas dos mosquitos põem seus ovos (DEANE, 1988; CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; TADEI et al., 2010; ARCOS, 2012).

O acasalamento ocorre durante o voo, logo em seguida a fêmea sai a procura de sangue, por um tempo de duas horas, guiada por seus estímulos sensoriais capazes de detectar substâncias oriundas de vertebrados como: o dióxido de carbono e ácido láctico. A fêmea utiliza uma estrutura presente em sua cabeça, chamada de tromba dentada para picar os animais, por meio desta estrutura é injetado um anticoagulante, que evitam a coagulação do sangue no local da picada. Após a alimentação de sangue, as fêmeas procuram um lugar para repousar e durante a noite realizam a postura de seus ovos na lamina d'água de lagos (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os ovos possuem aspecto alongado e simetria bilateral com flutuadores laterais que auxiliam no deslocamento sempre para as margens do ambiente aquático. O número de ovos depositados em cada postura varia em média de 75 a 150. O tempo de eclosão varia de 2 a 3 dias, dependendo, principalmente, da temperatura (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 1992; CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

CICLO DE VIDA DE *Anopheles darlingi*

Por apresentar uma metamorfose completa em seu ciclo de vida, este mosquito é holometábolo, pois assim como qualquer culicídeo, apresenta duas fases no seu ciclo de vida; a aquática, que inclui três estágios de desenvolvimento; ovo, larvas, pupa e a fase terrestre, que corresponde aos mosquitos adultos alados (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

OVO DE *Anopheles darlingi*

Os ovos apresentam formato elíptico ou oval, com um lado mais achatado e côncavo e outro lado convexo. A casca dos ovos dos mosquitos, também conhecida como cório, é impermeável. Em torno do cório existe uma outra estrutura chamada de exocório que apresenta duas estruturas: os flutuadores e coroa, que auxiliam na identificação da espécie (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Após postura da fêmea, os ovos têm aspecto claro, tornando-se escurecido quando estão férteis. Dessa forma, de todos os que ficam escuros eclodem as larvas (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

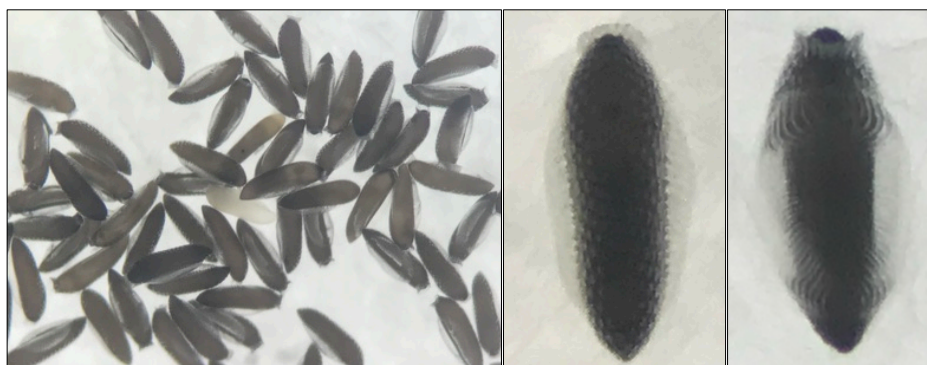


Figura 2. Morfologia do ovo de *A. darlingi*.

Fonte. Acervo do laboratório de malária e dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

LARVA

As larvas de *A. darlingi* são caracterizadas por possuírem um abdome semicilíndrico com oito segmentos. Na parte dorsal do corpo pode ser localizado a placa respiratória, esta estrutura faz com que as larvas fiquem aderidas no espelho d'água, ou seja em paralelo à

superfície, o que contribui para serem facilmente reconhecidas. O período de desenvolvimento até a fase adulta varia de sete a dez dias, dependendo de diversos fatores físicos, como a temperatura e disponibilidade de luz, e bióticos, como a disponibilidade de alimentos e predadores (FLEMING, 1992; CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).



Figura 3. Morfologia das larvas de *A. darlingi*.
Fonte. Acervo do laboratório de malária e dengue do INPA.

PUPA

A fase de pupa é caracterizada quando as larvas de quarto estágio adquirem o formato de virgula, ficam constantemente na superfície da água para respirarem através das trombetas respiratórias e passam a não se alimentar por um período de um a três dias. O tamanho entre fêmea e macho é perceptível, sendo as pupas machos menores que as fêmeas. O fim da fase de pupa se dá quando emergem em adultos com asas, as pupas machos emergem primeiro que as fêmeas. (FLEMING, 1992; CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).



Figura 4. Morfologia da pupa de *A. darlingi*.
Fonte. Acervo do laboratório de malária e dengue do INPA.

ADULTO

Após a fase de pupa os adultos emergem com asas, completando a metamorfose do mosquito que a partir então deixam de ser aquáticos. Seu corpo a partir de então é dividido em cabeça, tórax e abdome. Os principais órgãos do sentido (olhos, antenas e palpos) dos mosquitos encontram-se na cabeça. No tórax podem ser observados as estruturas de locomoção (pernas e asas). Os órgãos internos estão localizados no abdome e são constituídos de: aparelho reprodutor, digestivo e excretor (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).



Figura 5. Morfologia do mosquito adulto *A. darlingi*.
Fonte. Acervo do laboratório de malária e dengue do INPA.

A alimentação comum para os machos e fêmeas é basicamente néctar de flores. Somente as fêmeas se alimentam de sangue, pois os constituintes proteicos dessa substância auxiliam no amadurecimento de seus ovários e desenvolvimento dos ovos durante o período de gestação. Portanto, somente as fêmeas podem transmitir os patógenos causadores da malária e vivem por mais tempo que os machos, podendo alcançar de duas semanas a um mês de vida (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

3.5 RESISTÊNCIA DOS VETORES AOS INSETICIDAS E DOS PARASITAS ÀS DROGAS ANTIMALÁRICAS

A organização mundial da saúde deu início em 2016 à Global Technical Strategy (GTS), plano para eliminar a malária até 2030. A redução dos números de casos vem ocorrendo a cada ano, mas ainda falta muito para um panorama de satisfação. Em um cenário, onde milhares de mortes ainda são notificadas ao redor do mundo, mostra que a malária vem sendo combatida por meio de ações profiláticas e com uso de drogas, direcionadas aos

parasitas e aos hospedeiros invertebrados. O uso excessivo e sem controle de inseticidas e drogas antimaláricas vem se tornando menos eficaz, devido à resistência que parasitas e vetores adquirem ao longo dos anos (WHO, 2017).

As diferentes espécies de *Plasmodium* são tratadas principalmente com o uso de; Artemisinina associadas com drogas parceiras (ATC); Cloroquina (CQ); Primaquina (PQ) e Artesunato-mefloquina (ASMQ). No Brasil, Peru e Venezuela, a droga mais utilizada é ASMQ. Já foram detectadas cepas *P. falciparum* resistentes à artemisinina em vários países da África. Entre os anos de 2010 e 2016 no Brasil, Colômbia, Guiana e Peru, foram notificados casos de falhas no tratamento ou resistência ao produto ASMQ por *P. vivax*. A resistência à CQ por *P. vivax* já foi confirmada na Etiópia, Indonésia, Malásia, e mais outros seis países (WHO, 2017).

O recurso mais viável para o controle da malária, seria uma vacina, entretanto, ainda não se pode confirmar a existência de uma vacina com 100% de eficácia. A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) deu validade científica a uma vacina contra a malária por *P. falciparum* em 2015, este foi o primeiro registro de uma vacina contra malária no mundo e que ainda passa por testes em regiões da África (WHO, 2016).

Direcionada ao *P. falciparum*, esta vacina não apresentaria efeitos tão positivos na Amazônia brasileira, uma vez que nesta região quem predomina é *P. vivax*. Neste sentido, os esforços para o controle da malária no Norte do Brasil são principalmente direcionados aos mosquitos vetores, com o uso de inseticidas (TADEI et al., 2010; RAGHAVENDRA., et al. 2011; WANG & JACOBS-LORENA, 2013; WHO, 2017).

No controle dos mosquitos são utilizados mosquiteiros tratados com inseticida e a pulverização residual em áreas que registram casos de malária. Os inseticidas utilizados em ambos tratamentos são formulados de agrotóxicos das classes dos Piretróides, Organoclorados, Carbamatos e Organofosfatos (WHO, 2017; BARBOZA et al., 2018).

Os dados da OMS de 2017, mostraram que 70% dos casos de resistências dos mosquitos aos inseticidas foram oriundos de países da África. Em 61 países foram detectadas resistências a pelo menos uma classe dos inseticidas e em outros 50, à duas classes. A resistência aos piretróides foi declarada como generalizada em todo planeta. Houve um aumento, de 71% em 2010 para 81% em 2016, no número de países que relataram resistência de anofelinos aos piretróides. As regiões da África foram as que mais apresentaram casos de resistência (Figura 6) (WHO, 2017).

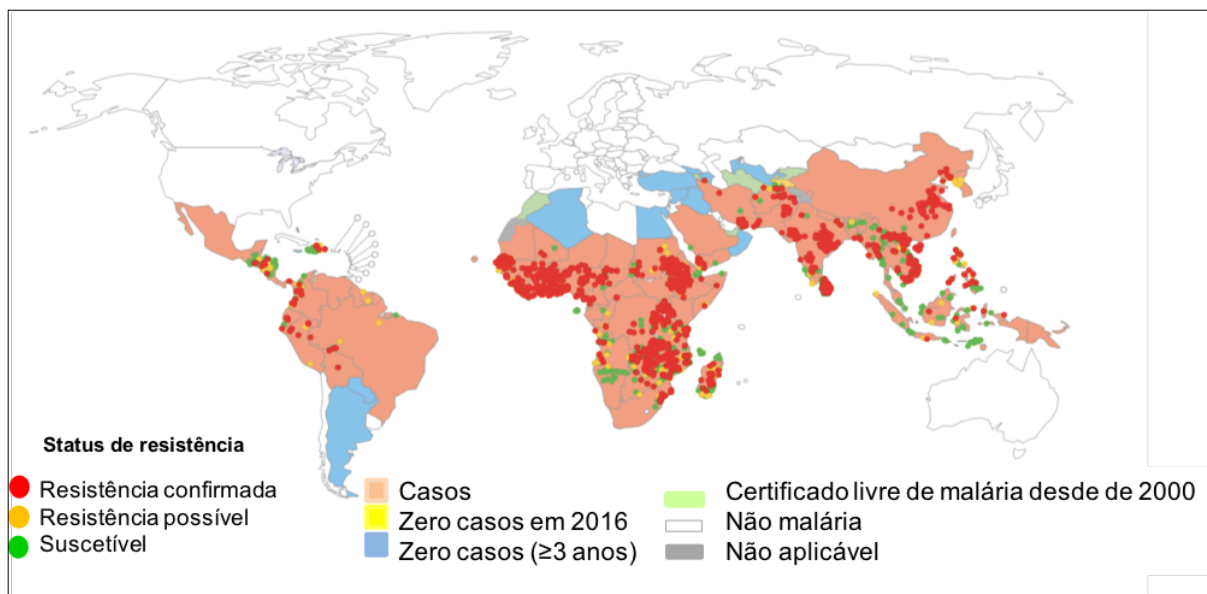


Figura 6. Status de resistência aos piretróides dos vetores de malária medidos com bioensaios de inseticidas no mundo, 2010–2016 (WHO, 2017).

3.6 O USO DA PARATRANSGÊNESE NO CONTROLE DA MALÁRIA

Estudos recentes validam a ideia de que microrganismos, simbioses a mosquitos vetores de doenças, podem ser geneticamente modificados para inibirem o desenvolvimento de parasitas no interior do corpo dos insetos, tornando-os refratários à transmissão de patógenos causadores das mais variadas doenças que acometem o ser humano. Esta técnica recebeu o nome de Paratransgênese e teve seu primeiro relato no controle de *Trypanosoma cruzi* via intestino do inseto *Rhodnius prolixus* no ano de 1997. A partir da década de 2000 foram surgindo estudos de paratransgenia visando bloquear também o desenvolvimento de *P. falciparum* no intestino médio de mosquitos *Anopheles* (DURVASULA et al., 1997; CONTE, 1997; BEARD et al., 2002; RIEHLE et al., 2007; SMITH et al., 2013; BONGIO & LAMPE, 2015; MANCINI et al., 2016; WANG et al., 2012; 2017).

Um dos primeiros estudos de paratransgenia, voltado para malária, foi realizado por Yoshida et al., (2001). Neste estudo, um gene codificador de uma imunotoxina de cadeia simples foi clonado e expresso em uma cepa de *Escherichia coli*. Os testes revelaram que houve uma redução significativa da densidade de oocistos de *Plasmodium berghei* no intestino médio de *Anopheles stephensi*.

Em outra pesquisa, realizada por Riehle et al., (2007), foi também detectada a diminuição do número de oocistos de *P. berghei* no estômago de *A. stephensi* pela ação de uma proteína denominada SM1, cujo gene foi clonado também em uma cepa de *E. coli*.

Os resultados expressivos que estes dois trabalhos tiveram esbarraram em um fator limitante para o sucesso da paratransgênese no controle da malária. Embora as cepas de *E. coli* serem de fácil cultivo e manipulação em laboratório, não são caracterizadas como simbioses de mosquitos e, portanto, não suportam as mudanças que ocorrem durante o ciclo de vida dos anofelinos e conseqüentemente, não conseguem perpetuar os genes anti-*Plasmodium* nas gerações dos mosquitos na natureza. No trabalho de Riehle et al., (2007), a cepa de *E. coli* sofreu a ação imunológica de *A. stephensi*.

No ano de 2012, pesquisadores utilizaram a espécie bacteriana *Pantoea agglomerans*, caracterizada como simbiote de mosquitos do gênero *Anopheles*, modificaram seu DNA, com um gene Anti-*Plasmodium* e a introduziram por via da alimentação no intestino médio de *Anopheles gambiae*. Esta ação reduziu em 98% o número de oocistos de *Plasmodium falciparum* na parede do estômago do mosquito. Análises posteriores confirmaram a prevalência de *P. agglomerans* nas gerações seguinte de *A. Gambiae*, bem como a eficiência da proteína de interesse. A cepa bacteriana em questão foi isolada do estômago de mosquitos *A. gambiae* e, portanto, teve influência positiva no sucesso deste trabalho (WANG et al., 2012).

Além de serem isoladas de *Anopheles* spp., as bactérias precisam ter outras características que as deixarão aptas para serem usadas em paratransgenia no controle da malária, sendo estes os chamados requisitos à paratransgênese. Os candidatos devem ser simbioses aos mosquitos anofelinos; não serem caracterizadas como patogênicas aos seres humanos; serem capazes de sobreviver por toda a metamorfose do mosquito e serem encontradas também no ambiente, onde as larvas dos mosquitos se desenvolvem (ITO et al., 2002; RIEHLE et al., 2007; WANG et al., 2012; SMITH et al., 2013).

Absorvidas da água pelas larvas, as bactérias simbioses podem sobreviver por toda metamorfose dos mosquitos, assim oferecendo duas capacidades essenciais à paratransgênese, sendo elas: transmissão horizontal e transestadial. Além dessas duas formas ainda temos a transmissão vertical, também chamada de transovariana que neste caso as bactérias são transmitidas da mãe para a prole. Essas três características são fundamentais em um candidato à paratransgênese (MANCINI et al., 2016; WANG et al., 2017).

O primeiro trabalho, voltado para o controle da malária por paratransgênese, que avaliou o potencial de bactérias, quanto a transmissão horizontal e vertical, foi conduzido por Mancini et al., (2016). Neste estudo foram levadas em consideração as condições de semi-campo para avaliar a transmissão de bactérias do gênero *Asaia* durante o ciclo de vida das espécies *A. stephensi* e *A. gambiae*. As bactérias foram marcadas com gene que expressa uma

proteína fluorescente. A transmissão horizontal foi constatada nas duas espécies de mosquitos, mas somente em *A. gambiae* foi detectado indícios de transmissão vertical.

Wang et al., (2017), chegaram em um nível mais elevado de inibir o desenvolvimento de *P. falciparum* no intestino de mosquitos *A. gambiae* utilizando bactérias geneticamente modificadas. Neste trabalho foi constatado que uma cepa bacteriana do gênero *Serratia*, simbiote de anofelinos, após ter recebido um gene anti-*Plasmodium*, foi capaz de se manter durante a transmissão horizontal e vertical dos mosquitos e reduziram significativamente o número de *P. falciparum* no intestino médio de *A. gambiae*.

O progresso da paratransgênese no controle da malária já é uma realidade, entretanto, os maiores esforços estão direcionados principalmente aos parasitas e vetores ocorrentes no continente africano, o que deixa outras regiões do mundo de fora dessa ação, sobre tudo a Amazônia brasileira. Considerando essa região do Brasil, no contexto de biodiversidade microbiana, é de se esperar que existam muitas bactérias simbiotes de *A. darlingi* ainda desconhecidas pela comunidade científica, que podem ser utilizadas no controle de *P. vivax* por meio da paratransgênese.

3.7 MICROBIOTA BACTERIANA ASSOCIADA AOS MOSQUITOS VETORES DE DOENÇAS

O ambiente aquático, onde as larvas de insetos se desenvolvem, é completamente coabitado por uma gigantesca diversidade de microrganismos, sendo as bactérias e fungos os predominantes. Estima-se que apenas 1% de todas as bactérias presentes no mundo, são cultiváveis, isto é, podem ser cultivadas em laboratório, dando-lhes suplementos nutricionais, os chamados meios de cultura (GUIMARÃES et al., 2010; WEISS & AKSOY, 2011).

As bactérias são microrganismos procariotos, simples na sua estrutura e muito complexos do ponto de vista bioquímico e metabólico. Habitam os mais diferentes ambientes do planeta, sendo assim cosmopolitas, contribuindo para reciclagem de compostos orgânicos, consideradas como parte chave na maioria dos ecossistemas naturais e são encontradas na natureza em formas de cocos, bacilos, espirilos, vibriões entre outros (CARVALHO et al., 2008; MALAJOVICH, 2009).

A reprodução de grande parte das bactérias é assexuada, em um processo chamado divisão binária, também conhecida como cissiparidade ou bipartição. Em condições adequadas, como a temperatura, disponibilidade de nutrientes, pH, entre outros, uma bactéria pode se dividir em até 30 minutos podendo chegar em aproximadamente em 15 milhões de

células após 15 horas, sendo assim considerada uma reprodução extremamente rápida. A reprodução sexuada é realizada por alguns gêneros de bactérias por meio de um processo conhecido como conjugação bacteriana, onde as bactérias são capazes de trocar material genético. Neste processo, uma bactéria doadora passa uma pequena quantidade de DNA para uma bactéria receptora através de um orifício. Outra forma de ocorrer variação genética é por meio da mutação gênica (MALAJOVICH, 2009).

As bactérias possuem uma grande variedade de vias metabólicas, o que contribui para a existência de organismos heterotróficos e organotróficos, degradadores de compostos orgânicos; quimiotróficos e litotróficos que usam compostos inorgânicos como fonte de energia; e ainda os fototróficos que utilizam a luz como fonte de energia no metabolismo. Assim, por meio dessas atividades, controlam e influenciam todos os aspectos do funcionamento da biosfera. (CANHOS et al., 1999).

Em todos os ambientes, as bactérias mantêm relações simbióticas com os mais variados seres vivos, contribuindo para a harmonia ecológica do local, trazendo na maioria das vezes benefícios, principalmente, a suplementação de nutrientes para os organismos eucariontes, como as larvas de insetos e também ajudam na proteção contra parasitas (WEISS & AKSOY, 2011; CIRIMOTICH et al., 2011; ENGEL & MORAN, 2013; NARTEY et al., 2013).

Milhares de bactérias vivem associadas a larvas e adultos de insetos vetores de doenças, como a malária. A maioria das funções dessa relação ainda é desconhecida e vem sendo alvo de estudos inovadores que visam bloquear o desenvolvimento de *Plasmodium* no interior do intestino médio de mosquitos (JACOBS-LORENA, 2004; WANG & JACOBS-LORENA, 2013; VILLEGAS & PIMENTA, 2014).

Os insetos abrigam um surpreendente número de microrganismos bacterianos simbiotes, vivendo no trato intestinal de larvas e de adultos, onde apresentam impactos significativos em sua fisiologia, contribuindo na sua alimentação e combate a certos patógenos (BACKHED et al., 2005; LINDH et al., 2005; GUSMÃO et al., 2010; CIRIMOTICH et al., 2011; ITURBE-ORMAETXE et al., 2011; CONTI et al., 2012; CHAVSHIN et al., 2012).

A composição microbiana, presente em tratos intestinais de mosquitos, vem sendo cada vez mais conhecida, entretanto a sua relação de interação com os insetos ainda não são claras o suficiente. A compreensão dos mecanismos dessas interações pode gerar inúmeras ideias para intervir no desenvolvimento de patógenos dentro do corpo dos insetos. Na paratransgênese busca-se identificar primeiro os microrganismos simbiotes, em seguida suas

funções metabólicas por meio da ação proteica anti-parasitas de genes introduzidos em seus materiais genéticos (CARDOSO et al., 2010; CARDOSO et al., 2012; CONTI et al., 2012; CHAVSHIN et al., 2012).

A relação simbiótica entre mosquitos e bactérias vem sendo estabelecida há milhares de anos na natureza. O intestino dos insetos é o ambiente preferido de muitas espécies bacterianas devido à alimentação, contudo é possível detectar bactérias colonizando, simbioticamente, outros órgãos, como as glândulas salivares e os ovários (RANI et al., 2009; VILCINSKAS, 2010).

Existem espécies de bactérias que entram no corpo dos insetos junto com o alimento, resistem às respostas imunes do hospedeiro e passam a produzir metabólitos que comprometem o funcionamento fisiológico dos mosquitos, podendo levar à morte dos mesmos. Essas bactérias são denominadas entomopatogênicas (VILCINSKAS, 2010).

Uma grande variedade de toxinas inseticidas são produzidas pelo processo de esporulação das bactérias entomopatogênicas. A espécie *Bacillus thuringiensis* (Bt) produz corpos de inclusões denominados cristais, como a proteína *Cry*. Esta proteína é capaz de perfurar a matriz peritrófica de mosquitos do gênero *Aedes*, levando a morte do inseto. Tal mecanismo é utilizado no controle biológico de populações de *Aedes* e poderia ser ampliado em um contexto paratransgênico (LACEY et al., 2001; DE MAAGD et al., 2003; CIRIMOTICH et al., 2011; GLARE et al., 2012).

O processo de disseminação dessas bactérias no ambiente é favorecido pela facilidade dos mosquitos se dispersarem. Levando em conta o ciclo de vida desses insetos, é possível que se encontrem bactérias associadas à água onde as larvas se desenvolvem e nos ambientes onde os adultos interagem. Dessa forma, uma bactéria que consiga sobreviver por toda metamorfose dos mosquitos pode ser alvo para uma abordagem na paratransgênese (RAHME et al., 1997; CIRIMOTICH et al., 2011; WANG & JACOBS-LORENA, 2013).

3.8 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS PELO GENE 16S rRNA

Existem várias técnicas para identificar bactérias, dentre as quais pode-se destacar a utilização do gene 16S rRNA, cuja confiabilidade também é cientificamente comprovada e, portanto, confiável. O gene em questão funciona como um marcador genético entre as bactérias, pois suas sequências nucleotídicas continuam conservadas ao longo das gerações dos procariotos. Este seguimento é constituído de 1.500 pb e dividido em 9 regiões (V1 – V9)

(figura 7), tendo como modelo universal o 16S rRNA da bactéria *Escherichia coli* (COENYE et al., 2005; KLINDWORTH et al., 2013; YANG et al., 2016).

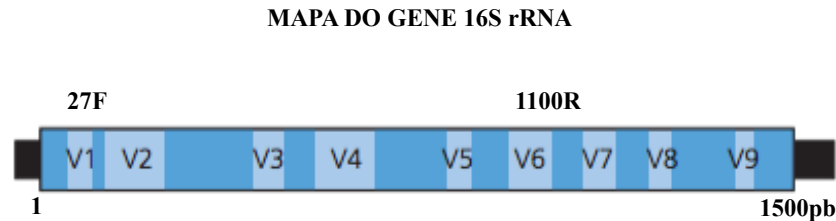


Figura 7. Mapa do gene 16S rRNA
Fonte. Mitreva, (2017), com adaptações.

As nove regiões do gene servem de alvo para o anelamento de oligonucleotídeos denominados *primers* que guiam a enzima DNA polimerase no processo de amplificação gênica denominado PCR, sigla inglesa para o termo Polymerase Chain Reaction. O tamanho de 1500 pb do gene facilita as análises por bioinformática. Desde a década de 1980 já foram identificadas pouco mais de 8.000 espécies bacterianas, cujas sequências encontram depositadas em bancos de dados, como no GeneBank do National Center for Biotechnology Information - NCBI (PATEL, 2001; JANDA & ABBOTT, 2007).

As análises das sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA constituem-se de um processamento analítico, cuja função envolve a exclusão de fragmentos ou bases nitrogenadas duvidosas detectadas nos eletroferogramas, obtidos das plataformas de sequenciamento de DNA e alinhamentos das duas fitas, oriundas dos *primers* Forward (F) e Reverse (R), utilizados na PCR, para que gerem uma fita consenso, sendo esta fita que deverá ser comparada com as dos bancos de dados bacterianos disponíveis, como por exemplo do GeneBank do NCBI, utilizando a ferramenta BLAST (KLINDWORTH et al., 2013).

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Conhecer espécies bacterianas cultiváveis, simbiotes de *Anopheles darlingi* com potencial para a utilização no controle da malária por paratransgênese.

4.2 ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias cultiváveis a partir das amostras de larvas, pupas, adultos e de água dos criadouros de *A. darlingi* nos municípios de Coari e Manaus no Estado do Amazonas;
- Identificar as bactérias por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Analisar a prevalência de espécies bacterianas nas diferentes amostras para a obtenção de possíveis simbiotes de *A. darlingi*;
- Avaliar o potencial de espécies bacterianas, marcadas com o plasmídeo pKS1-GFP no processo de transmissão vertical e horizontal durante o ciclo de vida de *A. darlingi*;

5 METODOLOGIA

5.1 LOCAIS E ORIGEM DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os locais de onde foram obtidas as amostras de larvas, pupas, adultos e de água dos criadouros de *A. darlingi* compreendem os municípios de Coari e Manaus no Estado do Amazonas, Brasil (Tabela 1). Manaus é capital do Amazonas e fica localizada a leste do Estado, na confluência dos rios Negro e Solimões. O município de Coari fica localizado na região central do Estado, às margens do rio Solimões entre o lago de Mamiá e o lago de Coari.

Esses locais apresentam fragmentos de matas em suas adjacências que oferecem condições adequadas para o desenvolvimento dos anofelinos como: igarapés; barragens permanentes; represamentos ou tanques de piscicultura; entre outras estruturas naturais e artificiais em meio à floresta.

O Ministério da Saúde registra, todos os anos, muitos casos de malária nesses locais que por isso sempre são alvos de campanhas de intervenção e pesquisas (BRASIL, 2019).

Todos os experimentos de laboratório foram realizados no Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue (LCBBMD) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus.

As colônias bacterianas da Cidade de Coari foram obtidas de uma coleção do LCBBMD-INPA. Os isolados desta coleção foram obtidos de amostras de larvas, pupas, adultos e água dos criadouros de *A. darlingi* coletadas no primeiro semestre de 2014 em Coari. Esta coleção se encontrava preservada em glicerol 20%, à temperatura de -80 °C e seus isolados foram reativados no segundo semestre de 2016 para a utilização neste trabalho.

As colônias bacterianas da Cidade de Manaus foram obtidas diretamente das amostras coletadas *in situ*. As informações dos locais e datas das coletas de todas as amostras utilizadas neste trabalho, encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1. Locais e datas das coletas de todas as amostras utilizadas neste trabalho

Local	Descrição	GPS - Google Mapas	Data
Coari - Itapeuá -Sítio do Gordo	Barragem permanente	4°06'45.5"S, 63°07'44.0"W	01/2014
Manaus, Puraquequara - Portela	Barragem permanente	3°02'47.0"S, 59°52'54.4"W	02/2017
Manaus, Puraquequara - Dona Chagas	Barragem permanente	3°02'33.5"S, 59°53'15.6"W	01.02/2018
Manaus, Brasileirinho - Raifram	Barragem permanente	3°02'11.2"S, 59°52'17.4"W	02/2018

5.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA, LARVAS, PUPAS, OVOS E FÊMEAS DE *A. darlingi* E ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS

Todos os materiais utilizados na coleta das amostras foram previamente esterilizados. Alguns materiais, como bandejas e pipetas de plástico foram esterilizadas com álcool a 70% e exposição à luz ultravioleta por 15 minutos (min), outros foram esterilizados em autoclave à temperatura de 127 °C por 15 min.

COLETA DE ÁGUA

A água foi coletada por meio de uma tela de malha de aço inoxidável medindo 400 cm², com um tamanho de malha de 1,25 e 0,36 milímetros de diâmetro. A malha de aço é utilizada para a coleta da superfície do espelho d'água, onde se desenvolvem as larvas dos anofelinos, na busca de isolar bactérias que compartilham do mesmo ambiente, onde as larvas se alimentam (AGOGUE et al., 2004). A amostragem de água coletada foi transferida para tubos falcon de 50 ml, esses tubos foram armazenados em caixa de isopor com gelo numa temperatura de aproximadamente 4 °C e em seguida transportados até o LCBBMD-INPA para o isolamento bacteriano (Figura 8).



Figura 8. Coleta de água utilizando a malha de aço e tubo falcon.

Fonte. Acervo do autor.

COLETA DE LARVAS E PUPAS DE *A. darlingi*

Larvas e pupas de *A. darlingi* foram coletadas utilizando concha entomológica padrão, de capacidade volumétrica de 350 ml, abertura de 11 cm e cabo de manuseio de um metro e bacias de plástico. Triagens preliminares foram realizadas *in locu* e em seguida foram transferidas para depósitos de plásticos esterilizados (figura 9) e armazenados em isopor com gelo para o transporte até o LCBBMD-INPA.



Figura 9. Coleta de larvas e pupas de *A. darlingi*.

Fonte. Acervo do autor

COLETA DE FÊMEAS DE *A. darlingi*

As coletas de fêmeas de *A. darlingi* foram realizadas próximas de residências, situadas na borda dos fragmentos florestais, onde existem criação de animais domésticos; porcos, cachorros, gatos e galinhas. Estes locais são de habituais coletas realizadas pelo INPA.

Para coleta das fêmeas de *A. darlingi*, foi adotada a técnica de atração humana protegida, utilizando aspiradores manuais denominado Capturadores de Castro (Figura 10). Após capturados, os mosquitos foram transferidos para gaiolas e, ainda no local, alimentados com sangue de ave. Em seguida foram transportadas para o LCBBMD-INPA, onde foram transferidas individualmente para copos parafinados, forrados internamente no fundo com papel-filtro e algodão, ambos umedecidos em quantidade suficiente de água destilada esterilizada para a oviposição (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Os ovos obtidos dessa oviposição foram utilizados no isolamento bacteriano.



Figura 10. Coleta das fêmeas de mosquitos anofelinos

Fonte. Acervo autor.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS OVOS, LARVAS, PUPAS E ADULTOS DE *A. darlingi* E DISSECAÇÃO DE ESTÔMAGOS E OVÁRIOS

Os ovos, larvas, pupas e adultos de *A. darlingi* foram identificados individualmente em microscópio estereoscópico, utilizando-se a chave de identificação de Consoli & Oliveira (1994) (Figura 11).

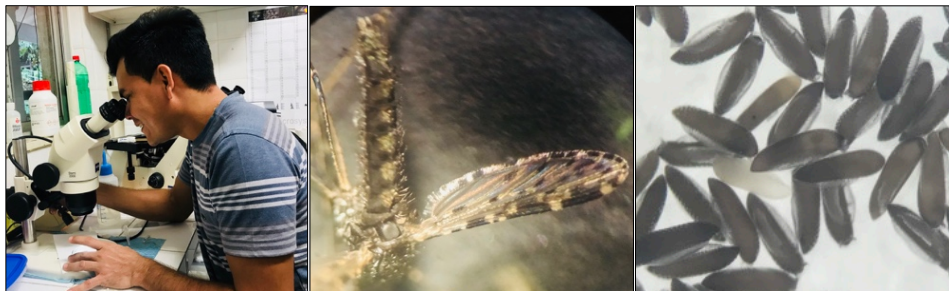


Figura 11. Identificação de *A. darlingi*
Fonte. Acervo do autor

DISSECAÇÃO DOS ESTÔMAGOS DE *A. darlingi*

A fêmea foi sacrificada em temperatura de ± 18 °C por 10 minutos, em seguida foi colocada na posição ventral em uma lâmina microscópica estéril, onde também foi adicionada uma gota de solução de NaCl 0,9%. Na lupa, com auxílio de pinças finas e estiletes, foram removidas as asas e pernas e em seguida foi feito um pequeno corte longitudinal no tegumento do 7º segmento que foi tracionado lentamente com o estilete na mão esquerda, enquanto o tórax era segurado com a pinça na mão direita. O estômago então foi separado das demais estruturas removidas e colocado em um micro tubo de 2 ml contendo 1 ml de água destilada esterilizada a qual foi utilizada no isolamento bacteriano dessa estrutura (CONSOLI E OLIVEIRA, 1994) (Figura 12).



Figura 12. Estômago de *A. darlingi*
Fonte. Acervo do autor

DISSECAÇÃO DOS OVÁRIOS DE *A. darlingi*

Os ovários foram dissecados com auxílio de lupa, pinças, estiletos e solução salina de NaCl₂ a 0,9%, como descrito por Consoli e Oliveira (1994). As fêmeas foram mortas sob temperatura de ± 18 °C por 10 minutos e colocadas sobre uma lâmina microscópica limpa, com o ventre voltado para cima e uma gota de solução salina sobre o últimos segmentos abdominais. Na lupa, a ponta do estilete na mão direita foi colocada firmemente sobre o 8º segmento, enquanto a pinça na mão esquerda exercia uma pequena força sobre o tórax do mosquito, puxando-o e assim podendo se obter os ovários que foram separados das demais estruturas removidas e colocado em um micro tubo de 2 ml contendo 1 ml de água destilada esterilizada a qual foi utilizada no isolamento bacteriano dessa estrutura (Figura 13).

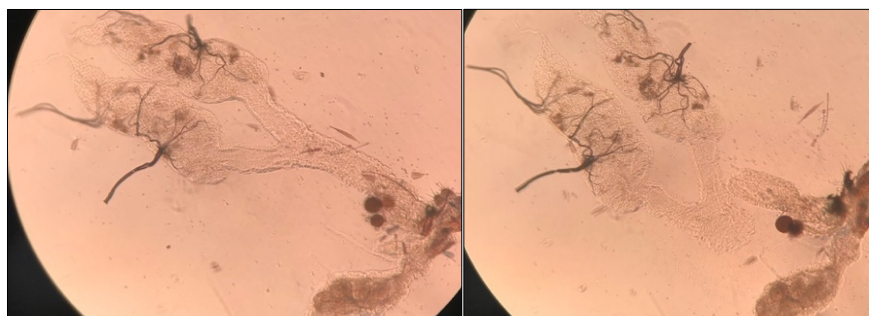


Figura 13. Ovário de *A. darlingi*
Fonte. Acervo do autor

5.4 MANUTENÇÃO DE *A. darlingi* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

A manutenção de larvas e adultos de anofelinos no LCBBMD-INPA foi realizada seguindo as recomendações descritas no documento de procedimento operacional padrão do INPA.

As larvas foram mantidas em bacias esmaltadas dispostas em estantes. No processo de manutenção foi utilizada água destilada e ração de peixe triturada. As bacias, água e ração foram previamente esterilizadas. Diariamente, durante 4 semanas, a água e a ração eram substituídas.

Os adultos, recém eclodidos foram transferidos para gaiolas e alimentados com solução de glicose a 10%. Esta solução foi preparada com água destilada esterilizada.

No processo de manutenção dos adultos, foram utilizadas bolas de algodão de 2 cm de comprimento umedecidas na solução de glicose a 10% e colocadas sobre a tela de malha das gaiolas diariamente por 6 h durante os dias de vida dos mosquitos (Figura 14).



Figura 14. Manutenção de larvas e adultos de *A. darlingi* em laboratório
Fonte. Acervo do autor

5.5 ISOLAMENTO BACTERIANO DAS AMOSTRAS

Em todos os isolamentos bacterianos foram realizados em placa de Petri de 9 cm de diâmetro com os seguintes meios de cultivo para bactéria: Triptona Soja Agar (TSA), Nutriente Agar (NA) e Lúria bertani (LB), todos da fabricante Himedia. Para impedir o crescimento de fungos, nestes meios de cultivo foram adicionados fluconazol a 20 mg/ml. Os meios de cultivo foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Todos os meios de cultivo, bem como placas de Petri e outras vidrarias foram esterilizados em autoclave à temperatura de 127 °C por 15 min.

ISOLAMENTO BACTERIANO DAS AMOSTRAS ÁGUA

Neste isolamento, foram utilizados 50 microlitros (μl) das amostras de água. As amostras foram espalhados por cima do meio de cultivo sólido contidos em placas de Petri com o auxílio de uma alça de vidro do tipo drigalsk. Em seguida, as placas foram vedadas com filme de cloreto de polivinil (PVC), identificadas de acordo com a origem e armazenadas em uma estufa incubadora do tipo BOD à temperatura de 29 °C por um período de 24h. Após esse período, as colônias bacterinas crescidas nas placas foram isoladas, com o auxílio de uma alça de platina, por meio da técnica do esgotamento por estrias cruzadas a partir de uma única colônia (Figura 15).

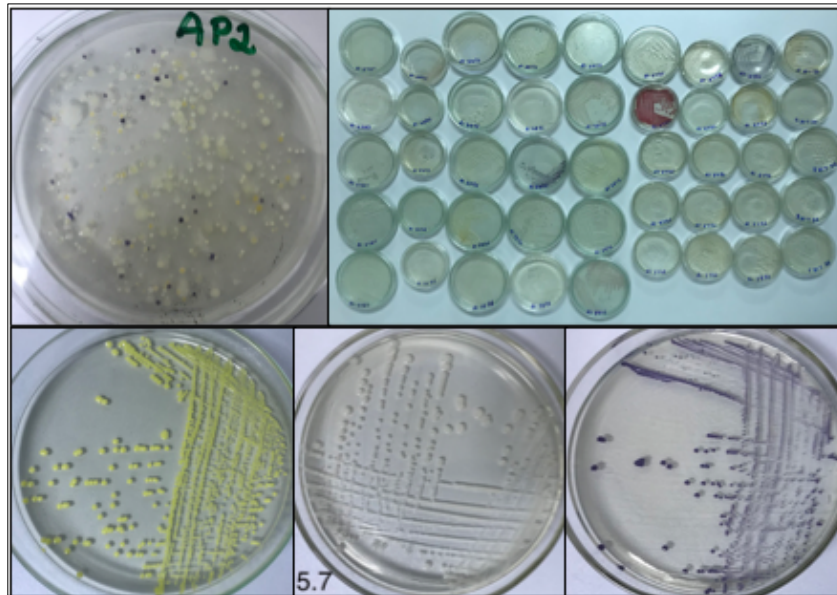


Figura 15. Isolamento bacteriano por esgotamento de estrias cruzadas
Fonte. Acervo autor

ISOLAMENTO BACTERIANO DAS AMOSTRAS DE LARVAS E PUPAS DE *A. darlingi*

As amostras de larvas de 3^o e 4^o estádios e pupas foram lavadas por imersão em álcool a 70% por 1 min e água estéril por 1 min, em seguida maceradas e centrifugadas por 3 min a 8.000 rotações por minuto (rpm). Após a centrifugação, o pellet foi ressuscitado em 200 µl de água deionizada esterilizada, em seguida foi agitado vigorosamente em aparelho vórtex e centrifugado por 3 min a 8.000 rpm. 50 µl do sobrenadante foram utilizados no isolamento bacteriano.

ISOLAMENTO BACTERIANO DAS AMOSTRAS FÊMEAS DE *A. darlingi*

As bactérias das fêmeas dos mosquitos foram isoladas de três formas. A primeira foi da maceração do mosquito inteiro. Este procedimento foi semelhante aos descritos para as larvas e pupas. Os outros dois procedimentos consistiram a partir de ovários e estômagos dos mosquitos, os quais foram obtidos dissecando as fêmeas com solução salina de fosfato. As amostras obtidas foram maceradas e ressuscitadas em 200 µl de água deionizada

esterilizada, onde em seguida essa solução foi agitada vigorosamente em aparelho vórtex e depois centrifugada por 3 min a 8.000 rpm, onde 50 µl do sobrenadante foram retirados e plaqueados. Neste isolamento, foram utilizados 10 estômagos e/ou ovários para cada placa de Petri.

ISOLAMENTO BACTERIANO DAS AMOSTRAS OVOS DE *A. darlingi*

Os ovos de *A. darlingi* foram lavados por imersão em água estéril e etanol 70% por 1 min, em seguida, macerados e centrifugados por 3 min a 8.000 rpm. Após a centrifugação, o pellet foi ressuspendido em 200 µl de água deionizada, esterilizada, agitado vigorosamente em aparelho vórtex e centrifugado por 3 min a 8.000 rpm. Foram utilizados no isolamento bacteriano 50 µl do sobrenadante. Neste isolamento foram utilizados 10 ovos macerados do mesmo mosquito por placa de Petri.

5.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Após o isolamento, as bactérias crescidas foram purificadas pela mesma técnica de esgotamento por estrias cruzadas, utilizando uma alça de platina, flambada em chama no bico de Bunsen, a qual espalhava as colônias sobre os meios de cultivo sólidos contidos nas placas de Petri. Em seguida, as placas foram colocadas na B.O.D à temperatura de 29 °C por 24h, para o crescimento bacteriano.

As colônias purificadas crescidas foram caracterizadas de acordo com a cor, forma da na placa de Petri, viscosidade, formatos das bordas, brilho e coloração de Gram (figura 16), se positivo ou negativo e a forma celular (bastonete, coco, espirilo e outras).

Os isolados foram preservados nos mesmos meios de cultura do isolamento, na forma líquida, com a adição de 20% de glicerol (v/v) em microtubos de 2 ml que se encontram estocados em freezer à -80 °C no LCBBMD-INPA.

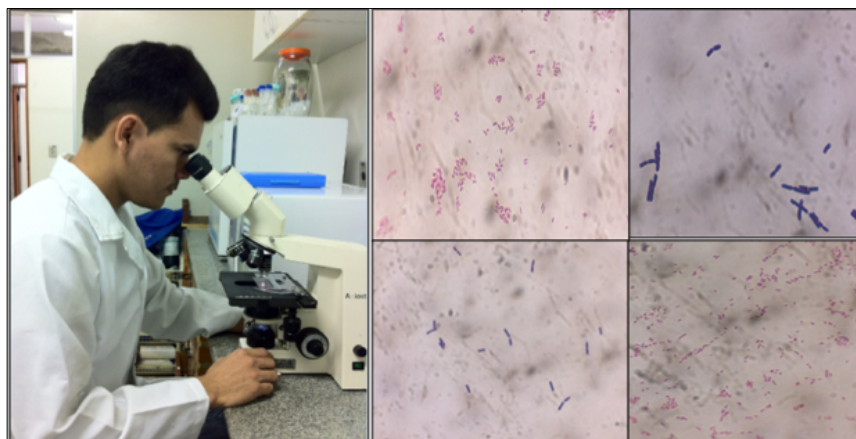


Figura 16. Purificação, coloração de Gram e preservação das bactérias isoladas
Fonte. Acervo do autor

5.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS

Na identificação molecular bacteriana, o procedimento consistiu das seguintes etapas: Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos; amplificação por PCR da região 16S do rRNA; sequenciamento da região 16S e comparação das sequências obtidas com banco de dados de nucleotídeos públicos do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Em todas as extrações realizadas neste trabalho, foi utilizado o produto Matriz InstaGene™ BioRad seguindo as recomendações da fabricante: Uma pequena quantidade (0,001g) de massa bacteriana foi adicionada em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml contendo 1 ml de água nanopura esterilizada. A mistura foi então homogeneizada e incubada à temperatura de 29 ° C durante 25 min. Em seguida foi centrifugado a 12.000 rpm por 3 min e depois o sobrenadante foi cuidadosamente removido. Logo após, 200 µl da matriz InstaGene™ foram adicionados ao pellet, que então foi homogeneizado em aparelho vórtex por 10 segundos e incubados a 56 °C em banho maria por 25 min. Em seguida o tubo foi homogeneizado em aparelho vórtex por 10 seg e incubados em banho maria a 100 °C por 8 min. Após isso, o tubo foi novamente agitado em aparelho vórtex por 10 seg e depois centrifugado a 12.000 rpm por 3 min. Por fim o sobrenadante foi quantificado em um aparelho de espectrofotômetro, sua concentração foi ajustada para 150 nanogramas (ng) de DNA e foi estocados em freezer à -20 °C para a utilização na reação em cadeia da polimerase (PCR).

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S rRNA

As amostras de DNA foram submetidas a um protocolo de PCR para amplificação de um fragmento de aproximadamente 1100 pares de base (pb) do rRNA bacteriano 16S.

As reações de amplificação do gene 16S consistiram em um volume final de 25 μ l, utilizando o kit Taq Pol - Master mix 2X (Cellco Biotec) seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados, para cada reação, 12,5 μ l do kit Master mix; 1 μ l DNA (150 ng/ μ l); 10,5 μ l de H₂O milli-Q e 0,5 μ l (10pMol) dos seguintes oligonucleotídeos (*Primers*); 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-AGGGTTGCGCTCGTT-3').

As reações foram realizadas em termociclador Thermal Cycler[®]. O perfil térmico da PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de: desnaturação das fitas-molde a 95 °C por 1 min, pareamento dos *primers* a 54 °C por 40 seg e extensão a 72 °C por 1 min e 30 seg. Ao final um ciclo de extensão a 72 °C por 5 min.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os fragmentos de rRNA 16S, amplificados na PCR, foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (0,8%, p/v) corado com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v), onde o registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene).

PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os fragmentos de rRNA 16S, amplificados na reação de PCR, foram purificados utilizando PCR Purification Kit (Cellco Biotec), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de rRNA 16S purificadas foram quantificadas em Fluorômetro Qubit 2.0 (Invitogen) e uma alíquota foi ajustada para 50 ng do rRNA 16S que serviu como matriz para as reações de sequenciamento.

SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

No sequenciamento foi utilizado o kit BigDye Terminator V 3.1. (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento consistiram

em um volume final de 10 µl. Foram utilizados 0,6 µL do kit BigDye; 0,4 µl de *primers* (10 pMol) (mesmo *primer* da PCR); 2 µl de Tampão 5X; 3 µl de Água Milli-Q; 7 µl de DNA (50 ng).

As reações de sequenciamento foram submetidas ao termociclador (uma reação para cada *primer*) e o perfil térmico consistiu de um ciclo de inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, seguido de desnaturação das fitas moldes 95 °C por 30 seg, pareamento do *primer* a 58 °C 30 por seg, extensão a 60 °C por 30 seg, em um total de 40 ciclos e extensão final a 60 °C por 4 min.

O produto da reação de sequenciamento de cada primer foi precipitado com etanol e inseridos no Analisador Genético ABI 3500 XL (Applied Biosystems) para a determinação das sequências, os chamados eletroferogramas.

5.8 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS POR BIOINFORMÁTICA

ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS CONSENSO

A qualidade dos eletroferogramas, gerados da leitura do ABI 3500 XL, foi analisada na plataforma Electropherogram Quality Analysis – EMBRAPA (disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Esta plataforma (*online*) é constituída de um conjunto de programas que analisa as sequências geradas e atribui valores de qualidade às bases usando o programa PHRED e ao final do processamento apresenta uma tabela contendo o número total e a estatística de sequências processadas e de boa qualidade.

A partir da tabela de qualidade, foi possível analisar, individualmente, as duas sequências do rRNA 16S de cada bactéria e montar uma sequência consenso usando o alinhamento do programa CAP3, também presente na plataforma da EMBRAPA.

Após a obtenção das fitas consenso das sequências, foi feita uma busca comparativa no banco de genomas bacterianos depositados no “GenBank” utilizando a ferramenta BLASTn do “National Center for Biotechnology Information”(NCBI) disponível em (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

Todas as sequências das bactérias identificadas neste trabalho foram depositadas no “GenBank” do NCBI.

5.9 PREPARO DAS CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES

Foram preparados pré-inóculos em tubos de ensaio de 50 ml, contendo 5 ml Nutrient Broth MERK (caldo nutritivo) e 20 µl da solução das bactérias preservadas. Estes foram mantidos a 37 °C por 16h sob agitação de 250 rpm.

Após o crescimento bacteriano, 100 µl do pré-inóculo foram adicionados em recipiente Erlenmeyer 250 ml, contendo 50 ml de caldo nutritivo e em seguida incubado a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 2 a 4 horas até que atingisse a densidade óptica (D.O) entre 0,7 e 0,9, com comprimento de onda de 600 nm em aparelho espectrofotômetro.

Depois de atingir a densidade óptica adequada, as células bacterianas foram transferidas para tubos falcon de 50 ml e centrifugadas a 3.000 x g por 30 min a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas foram ressuspendidas em 10 ml de glicerol 10% (v/v) a 4 °C com o auxílio de pipetas, pré-resfriadas, e novamente foram centrifugadas a 3.000 x g por 30 min a 4 °C. Este procedimento de lavagem com glicerol 10% foi repetido por quatro vezes.

Após a última centrifugação, as células bacterianas competentes foram ressuspendidas em 1 ml de glicerol 10%, distribuídas em microtubos estéreis (200 µl) devidamente etiquetados e foram estocadas em freezer a -80 °C.

MÉTODO DE ELETROPORAÇÃO E PLASMÍDEO pKS1-GFP

Em um microtubo de 1,5 ml, foram adicionados 100 µl de células eletrocompetentes e 2 µl de um plasmídeo que expressa uma proteína fluorescente verde - GFP (*Green fluorescent protein*), que emite luz verde quando excitada por luz ultravioleta (UV). Também foram preparadas amostras controle com adição de água deionizada no lugar do plasmídeo. Após a homogeneização das amostras, estas foram adicionadas em cubetas de 2 ml, pré-resfriadas, e inseridas no equipamento Electroporator 2510 (Eppendorf®), expostas a uma voltagem de 1900 volts. Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de caldo nutritivo e as células foram incubadas a 37 °C por 1 h sob agitação de 250 rpm.

A etapa seguinte consistiu no plaqueamento de 50 µl de bactérias transformadas com o plasmídeo em meio de cultivo NA, contendo ampicilina 100 mg/ml. Em seguida, as placas

foram incubadas em estufa a 37 °C por 16h e após o crescimento, as colônias foram visualizadas em luz ultravioleta, onde apenas bactérias que expressaram fluorescência verde foram preservadas com glicerol a -80 °C.

O plasmídeo pKS1-GFP (figura 17), é um vetor de expressão contendo marcador de seleção para o antibiótico ampicilina. Esse plasmídeo foi cedido pelo Centro de Apoio Multicêntrico da Universidade Federal do Amazonas (CAM-UFAM), sob autorização do Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho.

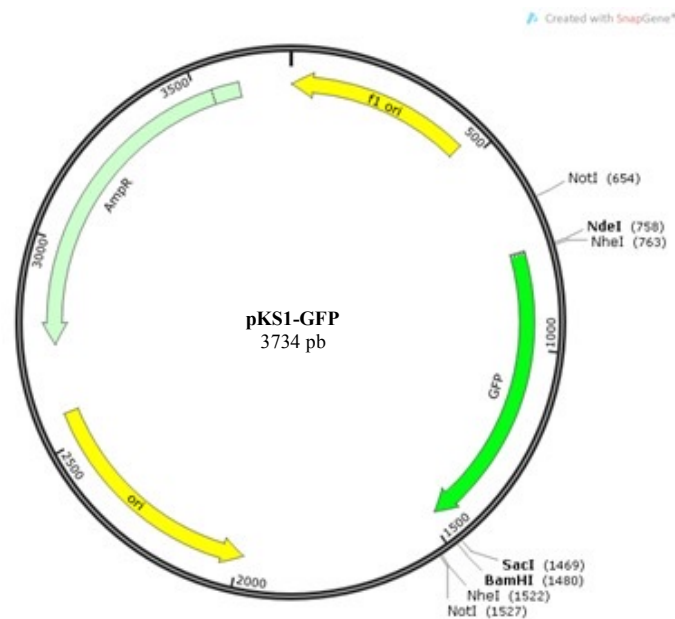


Figura 17. Plasmídeo de expressão pKS1-GFP

CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO E EXPOSIÇÃO DAS COLONIAS BACTERIANAS À LUZ ULTRAVIOLETA

Para realizar o cálculo de eficiência de transformação genética em Unidade Formadora de Colônia por microlitro (UFC/μl), a placa foi dividida em quatro partes (quadrantes), onde foi feita a contagem das mesmas. Para o cálculo, foi utilizada a seguinte equação.

Equação

$$\frac{\mu\text{l de cél. transformadas usado na placa} \times \text{n}^\circ \text{ de colônias em um quadrante} \times 4}{\mu\text{l total do sist. de cél. transformadas}} \times \text{n}^\circ \text{ UFC obtidas no sist. total}$$

Após a contagem da eficiência, foram selecionadas colônias das células transformadas por choque térmico e as mesmas foram expostas à luz ultravioleta para confirmação da competência bacteriana cuja característica foi a inflorescência de cor verde.

5.10 MONITORAMENTO DAS BACTÉRIAS TRANSFORMADAS DURANTE O CICLO DE VIDA DE *A. darlingi*

TRANSMISSÃO VERTICAL

As fêmeas de *A. darlingi*, coletadas em campo, foram transportadas para o laboratório em copos parafinados de capacidade volumétrica de 500 ml, onde permaneceram sem alimentação por 12h. Após esse período, foram alimentadas com uma solução de sacarose a 10% contendo ampicilina, volume por volume (v/v) na concentração de 100 mg/ml e $\pm 3 \times 10^4$ UFC/ml de células bacterianas transformadas geneticamente com plasmídeo pKS1-GFP. Bolas de algodão de 2 cm de comprimento foram umedecidas em 30 ml dessa solução e colocadas sobre a tela de malha dos copos parafinados por 6h, cada copo continha 10 fêmeas. Após esse período, as bolas de algodão foram retiradas e as fêmeas foram alimentadas com sangue de ave por 1h e em seguida deixadas para ovipor em copos individuais, contendo um disco de papel umedecido com uma solução de água deionizada esterilizada, contendo ampicilina (v/v) à 100 mg/ml. Após a postura dos ovos, foram retirados 10 exemplares de cada fêmea para serem submetidos ao processo de assepsia com álcool 70% por 1 min e água esterilizada por 1 min, onde em seguida foram macerados e seus resíduos plaqueados em meio de cultivo NA, contendo ampicilina (v/v) à 100 mg/ml. As colônias crescidas nas placas de Petri foram expostas em luz UV para a visualização das colônias de cor verde fluorescente. Os outros ovos foram removidos dos copos e transferidos para bandejas de crescimento larval, contendo 100 ml de água deionizada esterilizada e 100 μ l de ampicilina (100 mg/ml).

Após a postura dos ovos, as fêmeas foram submetidas também ao processo de assepsia, em seguida, maceradas e seus resíduos foram plaqueados em meio NA, contendo ampicilina (100 mg/ml). As colônias crescidas nas placas foram expostas à luz ultravioleta para a visualização das colônias de cor verde fluorescente.

A solução açucarada, bem como as bolas de algodão, copos, telas e bandejas foram previamente esterilizados. Os procedimentos realizados na transmissão vertical foram realizados em estufa BOD com temperatura de 29°C e umidade 80%.

TRANSMISSÃO HORIZONTAL

Oriundas de uma única fêmea, as larvas eclodidas nas bacias individualizadas foram mantidas até que se transformassem em mosquitos adultos. Durante esse período, algumas das larvas foram recolhidas para os testes de transmissão horizontal, enquanto outras seguiam o seu desenvolvimento. O teste funcionou da seguinte forma: a cada eliminação do exoesqueleto (ecdise), um total de 10 larvas foram retiradas das bacias para o processo de assepsia, e em seguida maceradas e seus resíduos plaqueados em meio de cultivo NA contendo ampicilina (100 mg/ml). As placas foram então expostas em luz ultravioleta para a visualização das colônias de cor verde fluorescente. Pupas e adultos emergidos em laboratório, também foram macerados e seus resíduos plaqueados em meio NA.

Todos os dias foram realizados os procedimentos de limpeza das bacias, troca da água, adição de ampicilina (100 mg/ml) e alimentos.

Neste procedimento, foram utilizadas pipetas de plástico, água e alimentos, todos esterilizados.

O esquema que norteou a execução dos testes de transmissão vertical e horizontal está apresentado na figura 18.



Figura 18. Esquema para realização dos testes de transmissão vertical e horizontal

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS DE TODAS AS AMOSTRAS DOS MUNICÍPIOS DE COARI E MANAUS

Foram isoladas, um total de 900 colônias bacterianas cultiváveis, de todas as amostras deste estudo, entre os anos de 2016 a 2018. Do município de Coari, foram isoladas 178 colônias e de Manaus, 722. Estes números correspondem a 175 isolados das amostras de água, seguido de 168 das larvas, 152 das pupas, 279 dos mosquitos adultos e 126 dos ovos. Manaus teve os maiores números de colônias bacterianas isoladas devido a uma maior disponibilidade de amostras (Figura 19).

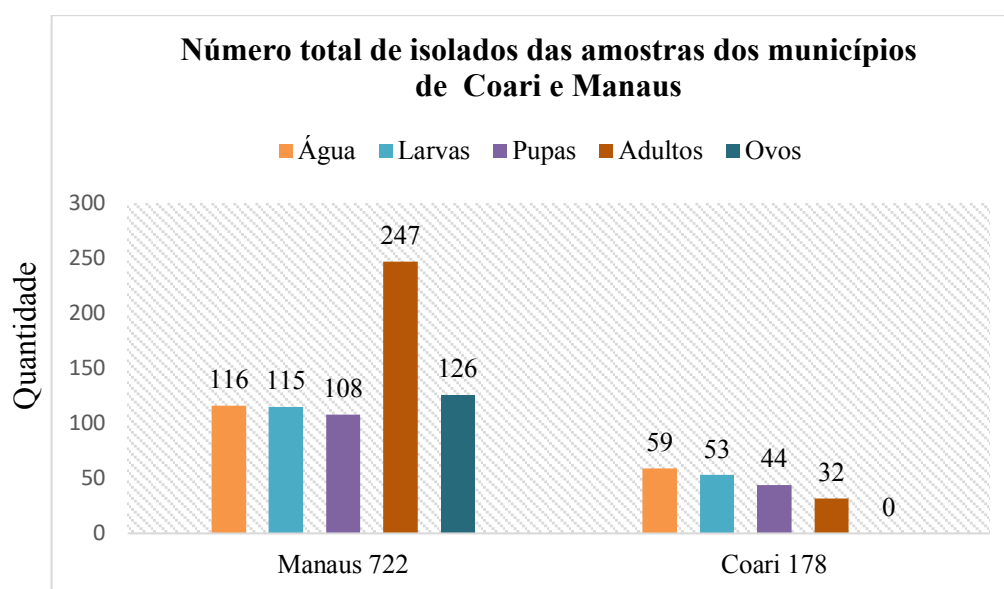


Figura 19. Comparação do número de isolados entre as amostras de Coari e Manaus

Os 247 isolados dos mosquitos adultos do município de Manaus constituem-se de: 98 de estômagos; 95 de ovários; e 86 de mosquitos inteiros macerados. Havia a possibilidade para obter um maior número de isolados por amostra, sobre tudo de água e mosquito inteiro, porém foi estipulada uma média na obtenção do número de isolados das amostras de Manaus, que variou de 86 a 126. Dessa forma, foi possível identificação de um número mais ou menos homogêneo entre as amostras.

Não foi possível a obtenção de estômagos e ovários de mosquitos adultos e nem ovos das amostras do município de Coari. Portanto, os 32 isolados de mosquitos adultos de Coari são todos de mosquitos inteiros macerados. As bactérias dessas amostras foram reativadas de

uma coleção bacteriana já estabelecida no Laboratório de Controle Biológico e Biotecnologia da Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LCBBMD-INPA).

Em relação aos diferentes meios de cultivo, utilizados em nosso trabalho, não foram observadas preferências quanto ao crescimento das bactérias por um meio específico. Por esse motivo, os meios Nutriente Ágar (NA) himedia e Caldo Nutriente (NC) himedia foram utilizados em todos os procedimentos depois do isolamento bacteriano.

Dos 900 isolados obtidos das amostras dos municípios de Coari e Manaus, somente uma parte pôde ser identificada, devido a grande quantidade, por isso, foram reunidos em grupos, de acordo as características morfológica das colônias observadas em placa de Petri como: cor da colônia; viscosidade; ondulações da bordas; e o brilho. A forma celular também foi levada em conta nesse processo de montagem dos grupos, onde foi utilizado microscópio ótico com lente objetiva de 100X para determinar a forma da célula e coloração de GRAM.

Foram formados 126 grupos de todas as amostras, sendo Coari com 21 e Manaus com 105. Dos grupos das amostras de Coari, foram selecionados quatro de cada amostra (água, larvas, pupas e mosquitos inteiros) para a identificação molecular, totalizando 16 grupos, o que representou 48 colônias submetidas aos processos moleculares, onde foi possível identificar 24 colônias. Considerando as amostras de Manaus, dos 105 grupos, foram selecionados 12 das amostra de água, larvas, pupas, ovos e mosquito inteiro macerado e quatro de estômagos e ovários, num total de 60 grupos, o que representou 204 colônias submetidas aos processos moleculares, onde foi possível identificar 155 colônias. Foi, então, possível identificar 179 colônias bacterianas das amostras dos dois municípios (Tabela 2).

Tabela 2. Número de colônias bacterianas isoladas, grupos formados e espécies bacterianas identificadas das amostras dos municípios de Coari e Manaus.

	Isolados	Grupos formados	Grupos submetidos para identificação molecular	Espécies identificadas
Manaus	722	105	68	155
Coari	178	21	16	24
Total	900	126	84	179

Na tabela 3, são mostrados os números das colônias bacterianas identificadas de cada amostra dos municípios de Coari e Manaus. Nas amostras de água, foram identificadas 45 colônias, sendo este o maior número de identificados entre as amostras. Esse número se deve ao processo de sequenciamento, uma vez que algumas sequências de DNA não puderam ser lidas pelos programas PHRED e CAP3, devido a uma qualidade baixa. Vale ressaltar que foi

escolhido um número homogêneo de grupos para cada amostra dos dois municípios, sendo quatro para as de Coari, que representou 16 grupos e 12 para cada amostra de Manaus, o que representou 84 grupos.

Tabela 3. Número total de colônias bacterianas identificadas de cada amostra dos municípios de Coari e Manaus

Amostras	Coari	Manaus	Nº de colônias bacterianas identificadas
Água	11	34	45
Larvas	5	28	33
Pupas	2	23	25
Estômagos	0	11	11
Ovários	0	5	5
Mosquito inteiro	6	33	39
Ovos	0	21	21
Total de identificados	24	155	179

Estudos sobre a microbiota bacteriana associada a insetos vetores de doenças ocorrentes na Amazônia brasileira, ainda são escassos na literatura. No entanto, vem crescendo o interesse de alguns pesquisadores em detectar bactérias cultiváveis em *A. darlingi* nesta região do Brasil, visando o controle da malária por paratransgênese (TERENIUS et al., 2008; VILLEGAS & PIMENTA, 2014; OLIVEIRA, 2015; ARRUDA, 2017).

Oliveira (2015), a partir de uma análise metagenômica de amostras de larvas de *A. darlingi* e seu habitat aquático na região amazônica do Brasil, detectou 827.842 sequências de DNA bacteriano que constituíram 6.714 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). Isso demonstra que existem milhares de bactérias que ainda não são conhecidas e que vivem em associação com *A. darlingi* nesta Região. Milhares dessas sequências são de bactérias que ainda não puderam ser cultivadas em laboratório.

Das 179 bactérias identificadas em nosso trabalho, foram detectadas 83 espécies diferentes, sendo 12 de Coari e 71 de Manaus.

Todas as espécies bacterianas identificadas neste trabalho foram cadastradas, sob o número de registro A0F653E, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen.

6.2 CEPAS BACTERIANAS IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS DO MUNICÍPIO DE COARI

Dos 16 grupos bacterianos das amostras de Coari que puderam ser submetidos para a identificação molecular, foram identificadas 24 colônias correspondentes a 12 espécies diferentes, pertencentes a seis gêneros de dois filios do reino monera. O filo Proteobacteria foi representado por cinco gêneros: *Achromobacter*; *Acinetobacter*; *Klebsiella*; *Serratia*; e *Siccibacter*. O filo Firmicutes foi representado apenas pelo gênero *Bacillus* com seis espécies diferentes (Tabela 4).

Tabela 4. Quantidade de filios e gêneros bacterianos detectados nas amostras de Coari

Filo	Gênero bacteriano	N. de espécies bacterianas
Proteobacteria	<i>Achromobacter</i>	2
	<i>Acinetobacter</i>	1
	<i>Klebsiella</i>	1
	<i>Serratia</i>	1
	<i>Siccibacter</i>	1
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	6
2 filios	6 gêneros	12 espécies diferentes

Quantos às espécies identificadas das amostras do município de Coari, o grau de identidade das nossas sequências variou de 98 a 100% comparando com as do NCBI. Das 12 espécies diferentes detectadas, *Serratia marcescens* foi a mais frequente, com um número de sete representantes. *Bacillus wiedmannii* e *Siccibacter colletis* também tiveram destaques quanto ao número de exemplares detectados nas amostras, ambos com 3 representantes.

São poucos os registros da detecção de cepas da espécie bacteriana *S. marcescens* associadas aos mosquitos vetores de doenças, como os anofelinos. Entretanto alguns estudos sugerem que é uma bactéria abundante na natureza, podendo ser encontrada em associação com outros mosquitos (RANI et al., 2009; WANG et al., 2011; CHANDEL et al., 2013; MWADONDO et al., 2017).

Gonzalez-Ceron et al., (2003), isolaram cepas da espécie *S. marcescens* do campo de uma região costeira do sul de Chiapas, México, onde *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 é bastante frequente, transmitindo principalmente *P. vivax* e avaliaram o potencial anti-*Plasmodium* dessas cepas, e de certa forma *S. marcescens* apresentou ação positiva, diminuindo a quantidade de oocistos de *P. vivax* dentro de *A. albimanus*.

Estudos, com fins paratransgênicos, visando o controle da malária, também já foram realizados e tiveram resultados expressivos com a utilização de cepas de *S. marcescens* (BANDO et al., 2013; WANG et al., 2017).

Considerando os possíveis potenciais anti-*Plasmodium* de *S. marcescens*, nossas cepas, dessa espécie, podem também vir a ser utilizadas contra *P. vivax* no contexto paratransgênico, para o controle da malária na região da Amazônia brasileira.

As demais espécies detectadas tiveram seus representantes em números de dois e um. Todas as sequências de DNA das cepas identificadas em nosso trabalho, foram depositadas no banco de dados de nucleotídeos do GenBank do NCBI, cujos registros, bem como o nome de todas as espécies identificadas de cada amostra de Coari, podem ser encontrados na tabela 5.

Tabela 5. Espécies bacterianas identificadas das amostras do município de Coari

Filo	Cepa	Espécie	% de Identidade	Nº de acesso GenBank
Proteobacteria	C41	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MT052388
	C61	<i>Achromobacter insuavis</i>	99%	MT052393
	C64	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	98%	MT052394
	C30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	MT052383
	C6	<i>Serratia marcescens</i>	100%	MT052375
	C9	<i>Serratia marcescens</i>	98%	MT052377
	C19	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MT052379
	C36	<i>Serratia marcescens</i>	98%	MT052384
	C37	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MT052385
	C38	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MT052386
	C58	<i>Serratia marcescens</i>	98%	MT052392
	C5	<i>Siccibacter colletis</i>	98%	MT052374
	C7	<i>Siccibacter colletis</i>	98%	MT052376
	C29	<i>Siccibacter colletis</i>	99%	MT052382
Firmicutes	C14	<i>Bacillus aerius</i>	99%	MT052378
	C55	<i>Bacillus aerius</i>	99%	MT052391
	C4	<i>Bacillus albus</i>	99%	MT052373
	C67	<i>Bacillus cereus</i>	100%	MT052395
	C2	<i>Bacillus paramycoides</i>	99%	MT052372
	C21	<i>Bacillus paramycoides</i>	99%	MT052380
	C39	<i>Bacillus stratosphericus</i>	100%	MT052387
	C22	<i>Bacillus wiedmannii</i>	100%	MT052381
	C45	<i>Bacillus wiedmannii</i>	100%	MT052389
	C46	<i>Bacillus wiedmannii</i>	98%	MT052390
Total	24 identificadas			

De todas as amostras de Coari, foi possível a detecção de duas espécies bacterianas que apresentam vestígios de transmissão horizontal em *A. darlingi*. As espécies são; *Serratia marcescens* e *Bacillus wiedmannii*, em destaques na figura 20.

Prevalência das espécies bacterianas nas diferentes amostras de Coari

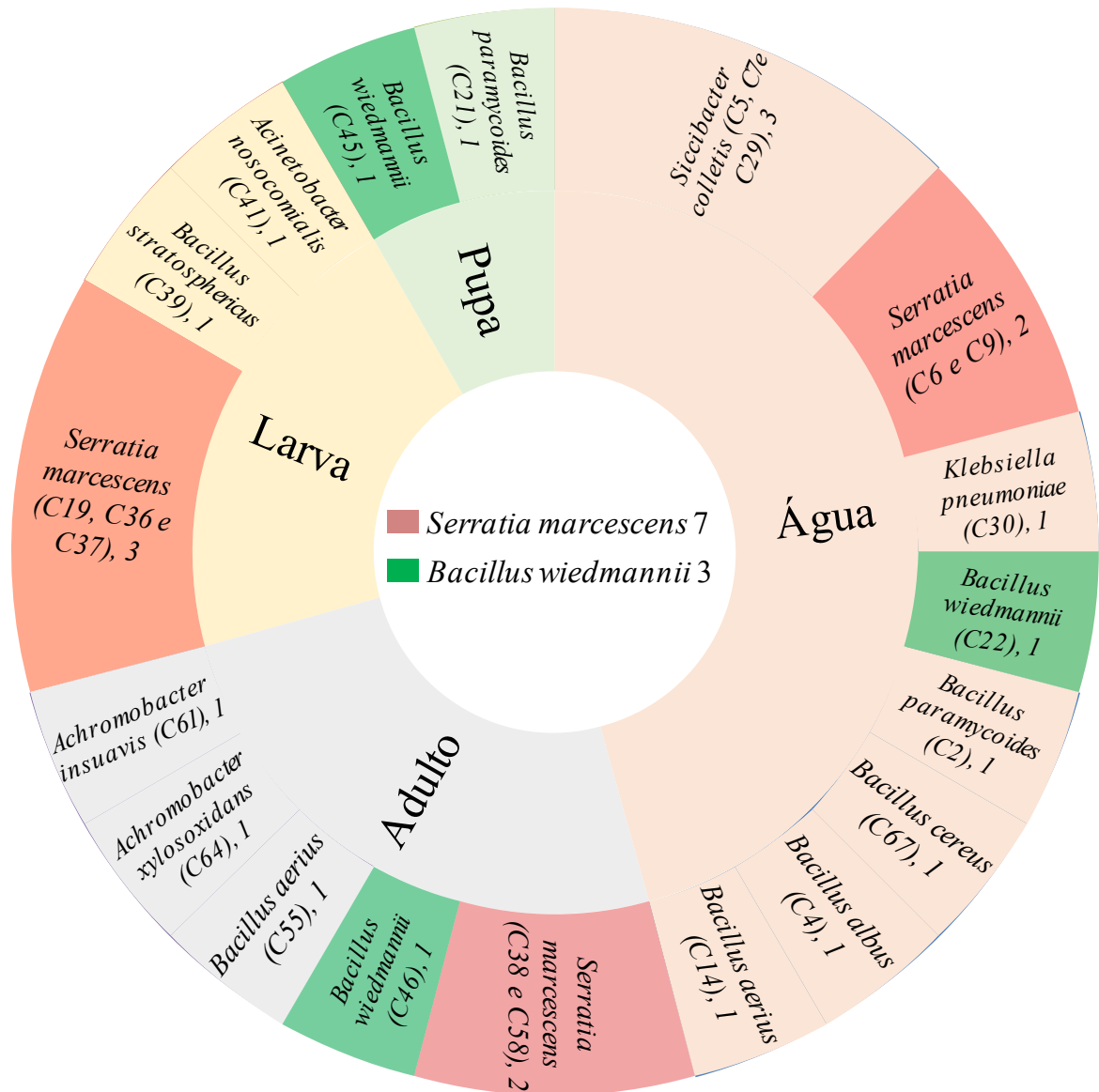


Figura 20. Prevalência das espécies bacterianas nas diferentes amostras de Coari

Sete cepas da espécie *S. marcescens* foram detectadas nas amostras de Coari, sendo C7 e C37 na água, C6, C9 e C36 nas larvas e C19 e C38 nos adultos. Este número poderia ter sido maior, pois com a formação dos grupos, com colônias apresentando características morfológicas semelhantes, muitas deixaram de ser detectadas. Somente nas amostras de pupa é que não foram detectadas colônias bacterianas com as características de *S. marcescens*, isso pode explicar a ausência na detecção dessa espécie nessa amostra. Entretanto, hipotetizamos

que essa espécie tenha forte associação com *A. darlingi* nos ambientes amazônicos, o que pode ser reforçados com os resultados das amostras do município de Manaus.

Em relação à morfologia das cepas de *S. marcescens* em placa de Petri, as colônias se apresentaram na cor vermelha, com alta viscosidade, bordas arredondadas e brilhosa. Quanto a forma celular, as cepas se apresentaram como bacilos Gram negativos.

Segundo Nakashima (2005), a espécie *S. marcescens* se caracteriza em pH ácido com uma intensa cor vermelha, podendo variar para uma tonalidade alaranjada em meios alcalinos ou até se apresentar sem pigmento em meio neutro, ficando assim com a cor branca. O que pode justificar, de alguma forma, a cor da colônia C36, que depois de quatro repicagens não expressou mais a os pigmentos de cor vermelha (Figura 21).

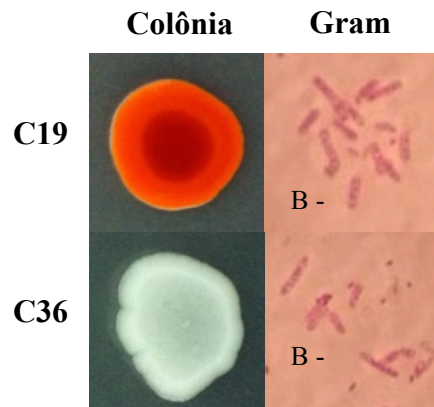


Figura 21. Características morfológicas das cepas C19 e C36 de *S. marcescens*

Outra espécie que foi identificada em maior número nas amostras do município de Coari foi a *B. wiedmannii*, com três cepas (C45, C46 e C22), sendo detectadas em água, pupa e mosquito adulto respectivamente.

Quanto a morfologia das cepas de *B. wiedmannii* em placa de Petri, a colônia se apresentou na cor creme, com formato redondo, com baixa viscosidade, bordas arredondadas e sem brilho. As formas celulares das cepas se apresentaram como bacilos Gram positivos. (Figura 22).

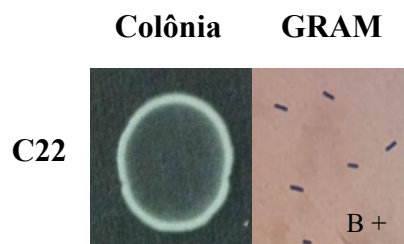


Figura 22. Características morfológicas de *B. wiedmannii*, cepa C22

B. weidmannii é uma espécie recém descoberta e faz parte do grupo *Bacillus cereus* sensu lato (s.l), que incluem espécies patogênicas e não patogênicas. *B. weidmannii* pertence à família Bacillaceae, que possui a forma de bastonete, sendo considerado um patógeno emergente e oportunista de origem alimentar, encontrado no solo, água, vegetação e no ar, podendo ser facilmente transferido para os alimentos e causar intoxicação (PORTUONDO, 2012; CEUPPENS et al., 2013; MILLER et al., 2016).

A espécie *Siccibacter colletis*, das cepas C5, C7 e C29, foi detectada em maior quantidade nas amostras de água de Coari. Nas demais amostras não foi detectada essa espécie bacteriana, o que podemos sugerir que esta espécie seja comum no ambiente aquático de desenvolvimento larval de *A. darlingi* naquela região.

Destacamos a presença das espécies *Acinetobacter nosocomialis*, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *S. colletis*, *Bacillus aerius*, *Bacillus albus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus paramycoides* e *Bacillus stratosphericus* que podem estar sendo descritas pela primeira como espécies associadas ao *A. darlingi* na Amazônia brasileira, uma vez que não foram encontrados registros na literatura sobre bactérias cultiváveis em associação com mosquitos, sobretudo *A. darlingi*, na Amazônia Brasileira.

Consideramos que a presença das cepas de *S. marcescens* nas amostras de água, larvas e mosquito inteiro macerado, possa ser um indício de que essa espécie consiga transitar do ambiente aquático para o corpo das larvas, passando por toda a metamorfose do mosquito e viver de forma comensal ou mutualística no intestino de *A. darlingi*. Isso pode configurar um vestígio de transmissão horizontal. Dessa forma, as análises posteriores, com dados do município de Coari foram focadas somente nas cepas de *S. marcescens*.

6.3 CEPAS BACTERIANAS IDENTIFICADAS NAS AMOSTRAS DE MANAUS

Dos 84 grupos bacterianos das amostras de Manaus, que puderam ser submetidos para a identificação molecular, foram identificadas 155 colônias, correspondentes a 71 espécies diferentes, pertencentes a 34 gêneros dos filos: Proteobacteria; Firmicutes; Actinobacteria; e Bacteroidetes. Dentre os 34 gêneros, os predominantes em quantidade foram: *Bacillus*, com 10 espécies distintas; *Acinetobacter*, com 7; *Pseudomonas*, com 6; e *Chryseobacterium* com 5 espécies. Os demais gêneros foram representados por 1, 2 ou 3 espécies (Tabela 6).

Tabela 6. Gêneros bacterianos e número de espécies detectadas nas amostras de Manaus

Gênero bacteriano	N. de espécies bacterianas
<i>Acinetobacter</i>	7
<i>Aeromonas</i>	2
<i>Aquitalea</i>	2
<i>Arthrobacter</i>	1
<i>Azospirillum</i>	1
<i>Bacillus</i>	10
<i>Brevibacterium</i>	1
<i>Burkholderia</i>	1
<i>Chromobacterium</i>	3
<i>Chryseobacterium</i>	5
<i>Citrobacter</i>	1
<i>Cronobacter</i>	1
<i>Cupriavidus</i>	3
<i>Elizabethkingia</i>	1
<i>Enterobacter</i>	4
<i>Exiguobacterium</i>	1
<i>Flectobacillus</i>	1
<i>Herbaspirillum</i>	1
<i>Klebsiella</i>	3
<i>Leucobacter</i>	1
<i>Lysinibacillus</i>	1
<i>Microbacterium</i>	2
<i>Moraxella</i>	1
<i>Nubsella</i>	1
<i>Paenibacillus</i>	1
<i>Pantoea</i>	2
<i>Pectobacterium</i>	1
<i>Pseudomonas</i>	6
<i>Ralstonia</i>	1
<i>Rhizobium</i>	1
<i>Serratia</i>	1
<i>Sphingobacterium</i>	1
<i>Staphylococcus</i>	1
<i>Stenotrophomonas</i>	1
34 Gêneros	71 espécies diferentes

Os filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes, detectados neste trabalho, foram também relatados Oliveira (2015), que além desses, detectou o filo Verrucomicrobia.

Arruda (2017), detectou os gêneros bacterianos *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Serratia* em fezes de *A. darlingi* da região amazônica do Brasil. Todos esses gêneros também foram detectados nas amostras do nosso trabalho, o que reforça a ideia de associação simbiótica entre esses microrganismos e *A. darlingi*.

Entre os filos detectados, o Proteobacteria foi bem superior em números de espécies. Por esse motivo, as espécies identificadas deste filo e dos outros serão apresentadas em tabelas separadas.

No filo Proteobacteria, as espécies que se destacaram quanto a sua presença, após o sequenciamento, foram *Acinetobacter nosocomialis* com 17 cepas representantes, *Enterobacter asburiae* com 9, *Klebsiella pneumoniae* com 9, *Serratia marcescens* com 8, *Pantoea dispersa* 4, *Stenotrophomonas pavanii* 4, e *Klebsiella variicola* com 4 (Tabela 7).

Tabela 7. Espécies bacterianas identificadas das amostras de Manaus – Filo Proteobacteria

Cepa	Espécie	% de Identidade	Nº de acesso GenBank
Ovo9	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	99%	MN709229
Adu2	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	99%	MN709294
Wat25	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	99%	MN709366
Ovo14	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	97%	MN709234
Lar11	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	96%	MN709252
Adu22	<i>Acinetobacter lactucae</i>	99%	MN709314
Pup5	<i>Acinetobacter modestus</i>	99%	MN709274
Adu29	<i>Acinetobacter modestus</i>	99%	MN709321
Lar6	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709247
Adu16	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709308
Pup14	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709283
Adu44	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709336
Wat1	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709342
Lar3	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709244
Adu48	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709340
Wat3	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709344
Lar27	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709268
Wat5	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709346
Adu6	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709298
Wat15	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709356
Lar15	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709256
Wat21	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709362
Wat27	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709368
Lar19	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709260
Adu21	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	MN709313
Pup19	<i>Acinetobacter seifertii</i>	100%	MN709288
Adu36	<i>Acinetobacter ursingii</i>	100%	MN709328
Pup4	<i>Aeromonas caviae</i>	100%	MN709273
Adu13	<i>Aeromonas jandaei</i>	99%	MN709305
Ovo19	<i>Aquitalea magnusonii</i>	99%	MN709239
Adu45	<i>Aquitalea pelogenes</i>	100%	MN709337
Pup15	<i>Azospirillum melinis</i>	99%	MN709284
Lar10	<i>Burkholderia contaminans</i>	99%	MN709251
Wat4	<i>Chromobacterium amazonense</i>	99%	MN709345
Adu7	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	99%	MN709299
Pup6	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	99%	MN709275

Cepa	Espécie	% de Identidade	Nº de acesso GenBank
Adu23	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	99%	MN709315
Wat16	<i>Chromobacterium rhizoryzae</i>	99%	MN709357
Lar4	<i>Chromobacterium violaceum</i>	98%	MN709245
Wat26	<i>Chromobacterium violaceum</i>	98%	MN709367
Adu18	<i>Chryseobacterium arachidis</i>	98%	MN709310
Adu1	<i>Chryseobacterium arachidis</i>	99%	MN709293
Wat12	<i>Chryseobacterium gambrini</i>	99%	MN709353
Adu28	<i>Chryseobacterium gambrini</i>	98%	MN709320
Adu26	<i>Chryseobacterium lactis</i>	98%	MN709318
Adu37	<i>Chryseobacterium oncorhynchi</i>	99%	MN709329
Lar7	<i>Chryseobacterium vietnamense</i>	99%	MN709248
Wat20	<i>Chryseobacterium vietnamense</i>	98%	MN709361
Wat22	<i>Chryseobacterium vietnamense</i>	99%	MN709363
Ovo1	<i>Citrobacter murlinae</i>	97%	MN709221
Lar26	<i>Cronobacter zurichensis</i>	99%	MN709267
Wat34	<i>Cupriavidus basilensis</i>	98%	MN709375
Ovo6	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	100%	MN709226
Adu8	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99%	MN709300
Adu17	<i>Cupriavidus pampae</i>	98%	MN709309
Lar9	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	MN709250
Adu30	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	MN709322
Pup17	<i>Enterobacter asburiae</i>	100%	MN709286
Wat19	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	MN709360
Adu24	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	MN709316
Ovo2	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	MN709222
Lar16	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	MN709257
Adu49	<i>Enterobacter asburiae</i>	99%	MN709341
Wat6	<i>Enterobacter asburiae</i>	100%	MN709347
Adu20	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99%	MN709312
Lar12	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99%	MN709253
Wat7	<i>Enterobacter tabaci</i>	99%	MN709348
Wat13	<i>Enterobacter tabaci</i>	99%	MN709354
Lar24	<i>Enterobacter tabaci</i>	99%	MN709265
Adu31	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	99%	MN709323
Lar5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	100%	MN709246
Adu14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	MN709306
Wat8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	MN709349
Wat14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	MN709355
Lar25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	MN709266
Wat24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100%	MN709365
Ovo7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100%	MN709227
Wat33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100%	MN709374
Pup18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99%	MN709287
Adu47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100%	MN709339
Adu35	<i>Klebsiella variicola</i>	100%	MN709327
Pup20	<i>Klebsiella variicola</i>	100%	MN709289
Wat2	<i>Klebsiella variicola</i>	99%	MN709343
Wat28	<i>Klebsiella variicola</i>	99%	MN709369
Adu9	<i>Moraxella osloensis</i>	99%	MN709301

Cepa	Espécie	% de Identidade	Nº de acesso GenBank
Ovo8	<i>Moraxella osloensis</i>	99%	MN709228
Ovo3	<i>Pantoea agglomerans</i>	99%	MN709223
Wat32	<i>Pantoea agglomerans</i>	98%	MN709373
Pup12	<i>Pantoea agglomerans</i>	99%	MN709281
Adu38	<i>Pantoea dispersa</i>	99%	MN709330
Ovo15	<i>Pantoea dispersa</i>	99%	MN709235
Lar13	<i>Pantoea dispersa</i>	98%	MN709254
Adu3	<i>Pantoea dispersa</i>	99%	MN709295
Pup11	<i>Pectobacterium aroidearum</i>	97%	MN709280
Wat31	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	99%	MN709372
Adu5	<i>Pseudomonas mosselii</i>	100%	MN709297
Ovo10	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	99%	MN709230
Adu46	<i>Pseudomonas paralactis</i>	99%	MN709338
Adu10	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99%	MN709302
Lar17	<i>Pseudomonas putida</i>	97%	MN709258
Pup9	<i>Ralstonia pickettii</i>	100%	MN709278
Wat17	<i>Rhizobium pusense</i>	99%	MN709358
Pup23	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MN709292
Adu40	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MN709332
Wat9	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MN709350
Wat23	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MN709364
Ovo4	<i>Serratia marcescens</i>	100%	MN709224
Lar23	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MN709264
Lar14	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MN709255
Pup13	<i>Serratia marcescens</i>	100%	MN709282
Wat11	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99%	MN709352
Ovo18	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99%	MN709238
Adu32	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99%	MN709324
Adu4	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	99%	MN709296
48 espécies diferentes			

Entre todas as espécies identificadas do filo Proteobacteria, a que teve maior destaque quanto a sua quantidade foi *A. nosocomialis*, com 17 cepas representantes, sendo seis nas amostras de água, cinco em larvas, cinco em adultos e uma em pupas.

Outra espécie com destaque em quantidade no filo em questão, foi *E. asburiae*, que teve 9 cepas representantes, sendo três detectadas nas amostras de adulto, duas nas de água, duas nas amostras de larvas, uma nas de pupas e uma nas de ovo.

A espécie *K. pneumoniae* teve um total de 9 cepas detectadas nas amostras, sendo quatro em água, duas em adultos, um em ovos, um em larvas e um em pupas.

Outra espécie do filo Proteobacteria, detectada em uma quantidade expressiva nas amostras, foi *S. marcescens*, com 8 cepas identificadas, sendo duas cepas nas amostras de água, larvas e pupas, e uma nas amostras de ovo e adultos. Provavelmente esse número

poderia ter sido maior, pois na caracterização morfológica dos isolados bacterianos, notou-se muitas colônias de cor vermelha, o que caracteriza esta espécie.

A detecção dessas espécies bacterianas, *A. nosocomialis*, *E. asburiae*, *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, em quantidade expressivas nas amostras, pode significar um forte indício de associação destas espécies com *A. darlingi* nos ambientes amazônicos.

As demais bactérias detectadas no filo Proteobacteria podem representar uma grande diversidade, que vivem, de alguma forma, em simbiose com *A. darlingi* na Amazônia brasileira.

No filo Firmicutes, a espécie que mais se destacou, quanto a sua presença, foi *Bacillus cereus*, com 6 cepas, sendo duas nas amostras de pupas, duas em adultos, uma em água e uma em ovos (Tabela 8).

Tabela 8. Espécies bacterianas identificadas das amostras de Manaus – Filo Firmicutes

Cepa	Espécie	Identidade	Nº de acesso GenBank
Ovo20	<i>Bacillus aerius</i>	99%	MN709240
Lar2	<i>Bacillus altitudinis</i>	100%	MN709243
Ovo5	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100%	MN709225
Adu39	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99%	MN709331
Pup2	<i>Bacillus cereus</i>	99%	MN709271
Adu11	<i>Bacillus cereus</i>	99%	MN709303
Adu25	<i>Bacillus cereus</i>	99%	MN709317
Wat10	<i>Bacillus cereus</i>	99%	MN709351
Ovo11	<i>Bacillus cereus</i>	99%	MN709231
Pup10	<i>Bacillus cereus</i>	99%	MN709279
Wat30	<i>Bacillus kochii</i>	99%	MN709371
Lar22	<i>Bacillus marisflavi</i>	99%	MN709263
Wat29	<i>Bacillus marisflavi</i>	99%	MN709370
Pup22	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	MN709291
Wat18	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	MN709359
Pup1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	MN709270
Lar1	<i>Bacillus proteolyticus</i>	99%	MN709242
Adu43	<i>Bacillus proteolyticus</i>	100%	MN709335
Adu15	<i>Bacillus proteolyticus</i>	99%	MN709307
Pup7	<i>Bacillus stratosphericus</i>	100%	MN709276
Adu27	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	MN709319
Lar28	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%	MN709269
Pup16	<i>Exiguobacterium indicum</i>	99%	MN709285
Pup3	<i>Flectobacillus roseus</i>	99%	MN709272
Adu41	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99%	MN709333
Ovo16	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99%	MN709236
Lar8	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	99%	MN709249
Adu33	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99%	MN709325
15 Espécies diferentes			

O gênero bacteriano *Bacillus*, foi detectado com um número de 10 espécies diferentes em todas as amostras, sendo a espécie *B. cereus* com um número maior de cepas detectadas. Esta espécie já foi relatada como sendo associada a intestinos de mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex* (LUXANANIL et al., 2001). Podemos destacar também a presença de *Bacillus megaterium* e *Bacillus proteolyticus*, ambos com três cepas identificadas, cujos registros em associação com mosquitos ainda não foram relatados na literatura.

Outra espécie bacteriana identificada foi *Bacillus thuringiensis*, onde teve sua presença detectada nas amostras de larvas e adultos. Esta espécie tem grande potencial biotecnológico, podendo ativar a produção de variedades de toxinas inseticidas, como a proteína *Cry*, cuja ação é capaz de perfurar a matriz peritrófica de mosquitos, podendo levando a morte do inseto (CIRIMOTICH et al., 2011; GLARE et al., 2012; EL-KERSH et al., 2016).

Algumas espécies bacterianas, detectadas nas amostras, estão associadas à presença humana, como é o caso de *Staphylococcus epidermidis*, que é uma bactéria comensal associada à pele humana, que produz substâncias com odor atraente para os anofelinos (VERHULST et al., 2009). A detecção em nossas amostras pode estar relacionado com presença de pessoas que moram nas regiões onde foi realizado este estudo.

As demais espécies bacterianas *Bacillus aerius*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus kochii*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus proteolyticus*, *Lysinibacillus fusiformis* e *Paenibacillus barcinonensis* são relatadas pela primeira vez em associação com *A. darlingi* na região amazônica do Brasil.

No filo Bacteroidetes, a espécie que mais se destacou foi *Elizabethkingia miricola*, detectada com 4 cepas, sendo duas nas amostras de adultos, uma em ovos e uma em larvas (Tabela 9).

Tabela 9. Espécies bacterianas identificadas das amostras de Manaus – Filo Bacteroidetes

Cepa	Espécie	Identidade	Nº de acesso GenBank
Ovo12	<i>Elizabethkingia miricola</i>	99%	MN709232
Adu12	<i>Elizabethkingia miricola</i>	99%	MN709304
Adu42	<i>Elizabethkingia miricola</i>	99%	MN709334
Lar21	<i>Elizabethkingia miricola</i>	99%	MN709262
Lar18	<i>Nubsella zeaxanthinifaciens</i>	97%	MN709259
Ovo21	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	99%	MN709241
3 Espécies diferentes			

Elizabethkingia miricola é uma espécie conhecida por ocasionar quadros de pneumonia, entre outras infecções do trato respiratório dos humanos (ZDZIARSKI et al., 2017). Aparentemente, a presença dessas espécies nas amostras de ovos, larvas e adultos do nosso trabalho pode revelar a existência de uma relação comensal ou mutualística com o mosquito na natureza.

O gênero bacteriano *Elizabethkingia* possui uma espécie (*Elizabethkingia anopheles*) que tem uma associação simbiótica bastante clara em mosquitos do gênero *Anopheles*. A espécie bacteriana é altamente prevalente no intestino desses mosquitos e com transferência horizontal confirmada em *Anopheles gambiae* (LINDH et al., 2008, CHEN et al., 2015; KÄMPFER et al., 2011). O grau de parentesco de *E. miricola* e *E. anopheles* pode contribuir para uma explicação da presença da espécie em questão nos resultados do nosso trabalho.

No filo Actinobacteria, onde só foram detectadas 7 espécies, a que se destacou foi a *Microbacterium proteolyticum* com 2 representantes, sendo um nas amostras de ovo e um nas de adultos (Tabela 10).

Tabela 10. Espécies bacterianas identificadas das amostras de Manaus – Filo Actinobacteria

Cepa	Espécie	Identidade	Nº de acesso GenBank
Adu34	<i>Arthrobacter woluwensis</i>	100%	MN709326
Lar20	<i>Brevibacterium siliguriense</i>	100%	MN709261
Pup8	<i>Leucobacter iarius</i>	98%	MN709277
Pup21	<i>Leucobacter iarius</i>	98%	MN709290
Ovo13	<i>Microbacterium proteolyticum</i>	99%	MN709233
Adu19	<i>Microbacterium proteolyticum</i>	99%	MN709311
Ovo17	<i>Microbacterium testaceum</i>	99%	MN709237
5 Espécies diferentes			

A presença da espécie bacteriana *M. proteolyticum* pode ser de origem endofítica, uma vez que esta pode ser encontrada em raízes de certas plantas (ALVES et al., 2015). Considerando a biologia de *A. darlingi*, é possível que este capture estas bactérias durante sua alimentação, quando tem contado com árvores e arbustos. Como foi detectada, também nas amostras de ovos, podemos hipotetizar com sendo um indício de transmissão horizontal dessa espécie em *A. darlingi*.

Em relação às cepas bacterianas identificadas nas amostras de adultos (estômagos, ovários e do próprio mosquito inteiro macerado), todas estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11. Cepas das espécies bacterianas identificadas das amostras de estômago e ovários

Espécie bacteriana	Estômago	Ovário
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	Adu6 e Adu16	Adu21
<i>Arthrobacter woluwensis</i>	Adu34	
<i>Bacillus cereus</i>	Adu11	
<i>Bacillus proteolyticus</i>	Adu15	
<i>Chryseobacterium arachidis</i>		Adu1
<i>Elizabethkingia miricola</i>	Adu12	
<i>Enterobacter asburiae</i>	Adu24	Adu30
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Adu20	
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Adu41	
<i>Pantoea dispersa</i>		Adu3
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Adu10	
<i>Serratia marcescens</i>		Adu40
<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	Adu4	
Total	11 espécies	5 espécies

O número de bactérias identificadas nas amostras de estômago e ovários foi menor que de outras amostras. Isso se deve ao fato da seleção de apenas quatro grupos de cada amostra. Cada grupo continha três colônias bacterianas, o que totalizou 12 cepas de cada amostra submetidas para os processos moleculares, sendo possível a identificação de 11 espécies nas amostras de água e cinco em ovários.

As espécies *A. nosocomialis* e *E. asburiae* foram as únicas detectadas nas três amostras juntas (em destaque na figura 23). Podemos associar esse fato a uma possível relação simbiótica dessas duas espécies com *A. darlingi*. Esse fato pode revelar a existência de uma possível transferência vertical e horizontal, pois essas duas espécies podem ser encontradas em abundância na natureza (AL-ATROUNI et al., 2016).

Ainda sobre a quantidade de isolados bacterianos das amostras de adultos do município de Manaus, estas totalizaram em 247, sendo divididos em 98 de estômagos, 95 de ovários e 86 de mosquitos inteiros macerados. Foram identificados, dessas amostras, 49 espécies, sendo 11 cepas de estômagos, cinco de ovários e 33 de mosquito inteiro macerados, como mostra a figura 23.

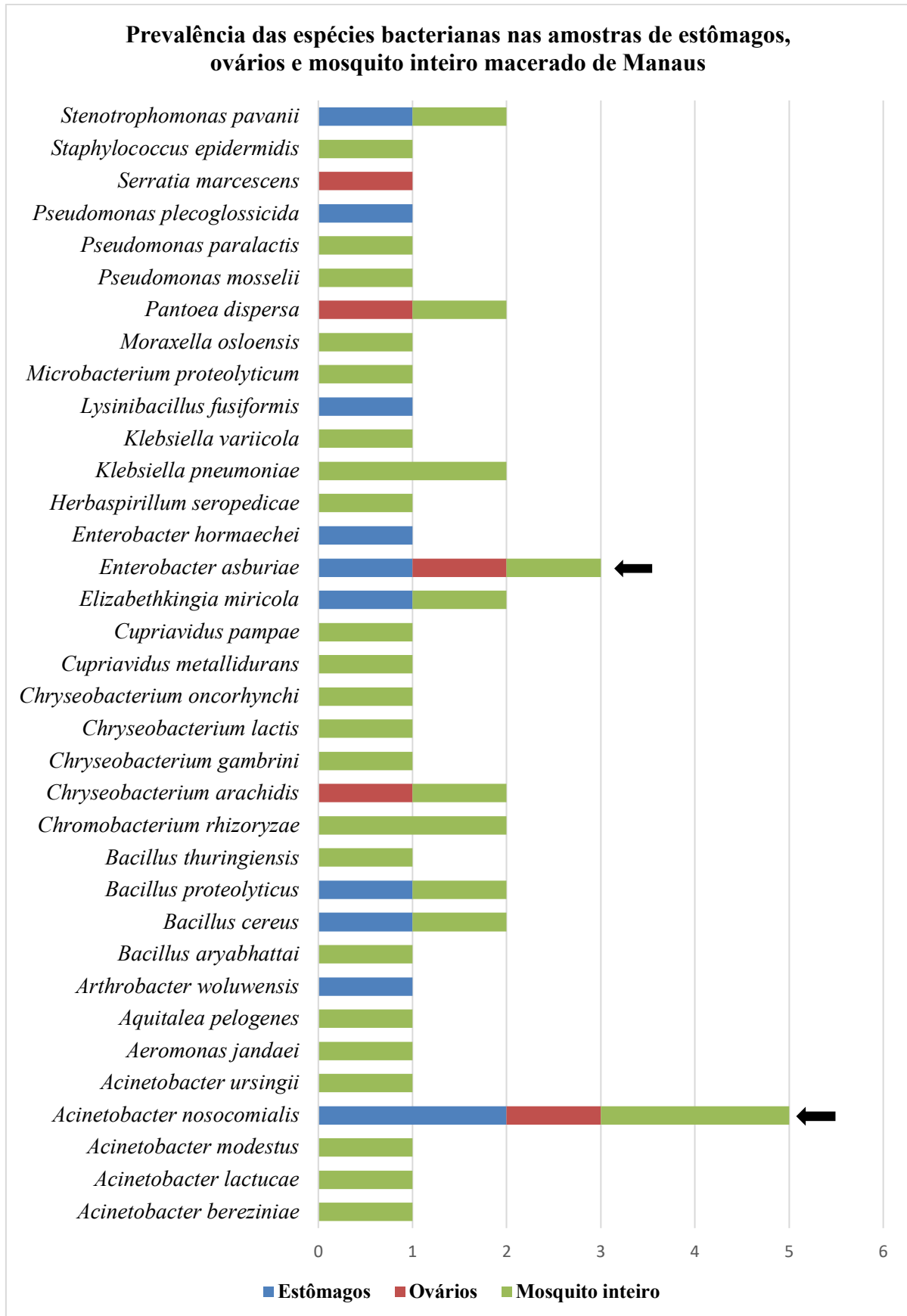


Figura 23. Prevalência de espécies bacterianas nas amostras de estômagos, ovários e mosquito inteiro macerado de Manaus.

Todas as espécies bacterianas identificadas nas amostras são descritas pela primeira vez em estômagos e ovários de *A. darlingi* ocorrentes na região amazônica do Brasil. Tais bactérias podem possuir a capacidade de sobreviver por toda metamorfose do mosquito, e por isso podem ser transferidas para outras gerações de mosquitos de forma horizontal e vertical, fato de interesse em nosso trabalho.

As bactérias identificadas em todas as amostras de Manaus perfazem um número de 71 espécies distintas. Foi observado que os 3 representantes de cada grupo, em sua grande maioria, não foram condizentes com espécies semelhantes. Somente um grupo que teve seus identificados com sendo da mesma espécie (*S. marcescens*). Isso demonstra a existência de uma grande diversidade de bactérias cultiváveis nos ambientes amazônicos em que *A. darlingi* está associado.

Destacamos a importância de ser realizados estudos para entender as relações ecológicas entre esses seres, uma vez que muitas bactérias podem contribuir para a harmonia ecológica do local de desenvolvimento larval dos insetos, aumentam a quantidade de nutrientes no ambiente, resultantes do metabolismo, e também ajudam na proteção dos insetos contra parasitas (WEISS & AKSOY, 2011; CIRIMOTICH et al., 2011; ENGEL & MORAN, 2013; NARTEY et al., 2013).

Alguns autores enfatizam que a disseminação de bactérias no ambiente é favorecido, em grande parte, pela facilidade dos mosquitos se dispersarem na natureza, uma vez que durante o ciclo de vida desses insetos, estes entram em contato com a água de lagos, plantas, solo e ar (CIRIMOTICH et al., 2011; WANG & JACOBS-LORENA, 2013).

Algumas das espécies bacterianas que foram detectadas nas amostras do nosso trabalho, podem ser estudadas, quanto a capacidade de transportar genes efetores anti-*Plasmodium* e passarem a se tornar agentes paratransgênicos no controle da malária em um futuro próximo. Com esse objetivo, foi preciso analisar se estas, de fato, conseguem passar do ambiente aquático, onde as larvas se desenvolvem, para colonizar com sucesso o intestino dos mosquitos adultos e demais estruturas como os estômagos, ovários e ovos, o que configurou estudar a transmissão horizontal e vertical de algumas dessas espécies em *A. darlingi* em nosso trabalho.

Em relação as 179 espécies bacterianas, identificadas nas diferentes amostras de Manaus, descrevemos cada uma na figura 24.

Na figura 24, destacamos o predomínio de algumas espécies que puderam ser detectadas em todas as amostras de Manaus. Tais espécies foram: *A. nosocomialis*; *E. asburiae*; *K. pneumoniae*; *S. marcescens*; *B. cereus*; *Pantoea dispersa*; *E. miricola*; *K. variicola*; *S. pavanii*; e *Pantoea agglomerans*. Foi realizado um estudo para determinar o perfil dessas bactérias, afim de selecionar os melhores candidatos para os teste de transmissão horizontal e vertical em *A. darlingi*.

6.4 PERFIL DAS ESPÉCIES BACTERIANAS SELECIONADAS PARA OS TESTES DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA COM O PLASMÍDEO pKS1-GFP

A partir dos resultados de identificação molecular das cepas bacterianas deste trabalho, foi possível fazer uma seleção das espécies bacterianas detectadas com maior prevalência em todas as amostras e realizar um estudo na literatura sobre alguns critérios requeridos em paratransgenia. Dessa forma, foram selecionados os candidatos para os testes de transformação genética com o plasmídeo pKS1-GFP, para em seguida serem monitorados nos testes de transmissão horizontal e vertical em *A. darlingi*. Os candidatos são apresentados abaixo.

Acinetobacter nosocomialis: Suas colônias apresentaram-se na cor branca, com aspecto leitoso, com ondulações nas bordas e brilho intenso. Suas células apresentaram-se como sendo cocos gram negativos (Figura 25). Foram detectadas em todas as amostras.

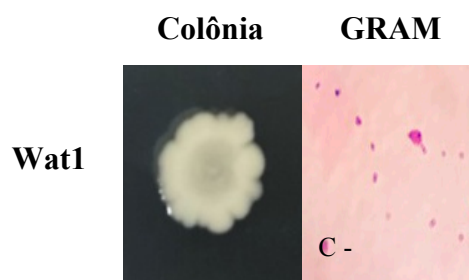


Figura 25. Características morfológicas de *Acinetobacter nosocomialis*, cepa Wat1

Esta espécie constitui, juntamente com *A. calcoaceticus*, *A. baumannii* e *Acinetobacter pittii*, um complexo denominado *Acinetobacter-calcoaceticus-baumannii* (ACB). Somente *A. calcoaceticus* não é patogênica aos seres humanos. O restante são patógenos oportunistas, capazes de causar infecções graves nas pessoas e desenvolver, em poucas gerações,

mecanismos de resistência a medicamentos antimicrobianos (PELEG et al., 2008; CHEN et al., 2008; NEMEC et al., 2011).

O gênero bacteriano *Acinetobacter* constitui-se de espécies que podem ser encontradas nos mais diversos ambientes na natureza, podendo estar associada a tratos intestinais de mosquitos, como é caso de *Acinetobacter calcoaceticus* detectadas em mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* (PIDIYAR et al., 2004; MANGUIN et al., 2013).

Apesar de ter sido detectada em diferentes amostras, o que configura indícios de transmissão vertical, *Acinetobacter nosocomialis* não pode ser utilizada em testes paratransgênicos, pois é considerada patogênica aos seres humanos, conseqüentemente, não foi utilizada nos testes de transmissão horizontal e vertical em *A. darlingi*.

***Enterobacter asburiae*:** Suas colônias apresentaram-se na cor branca, com aspecto leitoso, bordas lisas e brilho intenso. Suas células apresentaram-se como bacilos gram negativos (Figura 26). Foram encontradas nas amostras de larvas, pupas, estômagos, ovários e ovos.

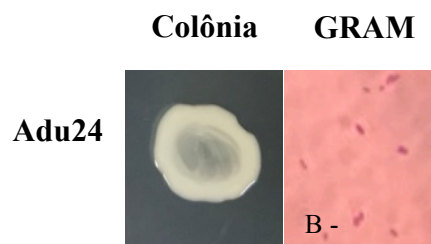


Figura 26. Características morfológicas de *Enterobacter asburiae*, cepa Adu24

Esta espécie pertence à família Enterobacteriaceae, podendo ser isolados do microbioma humano e outros ambientes da natureza. São gram-negativas em forma de bastonete. São patógenos oportunistas em humanos, podendo causar uma variedade de doenças (KOTH et al., 2012; MCAULEY, 2016; YIN et al., 2016).

Em um estudo realizado no Sul da Zâmbia, Cirimotich et al., (2011), identificaram uma cepa de *Enterobacter* (*Esp_Z*), isolada de *Anopheles arabiensis* que tornou *A. gambiae* e *A. stephensi* 99% resistentes à infecção por *Plasmodium falciparum*. Segundo os autores, o efeito anti-*Plasmodium* foi possivelmente causado pela geração bacteriana de espécies reativas de oxigênio (ROS), reforçando a hipótese de que microrganismos nativos dos mosquitos apresentam um papel importante na refratariedade à infecção por *Plasmodium*.

Apesar do potencial paratransgênico do gênero *Enterobacter*, ainda não há relatos de estudos envolvendo a espécie *E. asburiae* na paratransgênese, no entanto, esta é

frequentemente encontrada em mosquitos (GUSMÃO et al., 2010; CHANDEL et al., 2013; YADAV et al., 2016).

Klebsiella pneumoniae: Apresentou colônias na cor branca, bastante leitosa e com brilho intenso. Suas células foram observadas como bacilos gram negativos (Figura 27). Foram detectadas nas amostras de larvas, pupas estômagos e ovos.

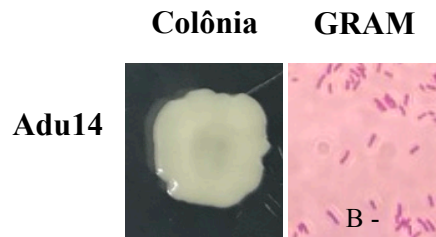


Figura 27. Características morfológicas de *Klebsiella pneumoniae*, cepa Adu14

Esta espécie pertencente à família Enterobacteriaceae tem a forma de um bastonete Gram negativo. É considerada patogênica aos seres humano por causar pneumonia e outras infecções graves (SEIBERT et al., 2014).

Serratia marcescens: Teve suas características morfológicas observadas de algumas colônias de cor vermelha e outras brancas, com aspecto leitoso, bordas lisas e de brilho intenso. Suas células apresentaram-se como bacilos gram negativos (Figura 28). Foram detectadas nas amostras de água, larvas, ovários, mosquito inteiro macerado e ovos.

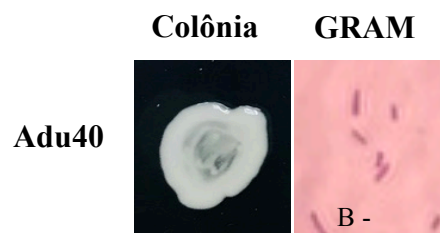


Figura 28. Características morfológicas de *Serratia marcescens*, cepa Adu40

Esta espécie pertencente a família Enterobacteriaceae, podendo ser isoladas de amostras ambientais e insetos. É considerada como um patógeno oportunista, podendo ocasionar infecções hospitalares em pacientes com imunidade baixa (HEJAZI & FALKINER, 1997).

S. marcescens é uma bactéria comumente encontrada na natureza, podendo também ser detectada em associação com insetos, como relatam os estudos de isolamento bacteriano de mosquitos (RANI et al., 2009; WANG et al., 2011; CHANDEL et al., 2013;

MWADONDO et al., 2017). Sua patogenicidade não é bem definida, no entanto é considerada um agente patogênico oportunista em humanos (KURZ et al., 2003).

Em estudos visando à utilização da paratransgênese, Bando et al., (2013) observaram que a cepa HB3 de *Serratia marcescens* inibiu a formação de oocistos de *Plasmodium berghei* em *Anopheles stephensi*, sugerindo que esta espécie apresenta um efeito anti-*Plasmodium*.

Wang et al., (2017), também estudaram os efeitos de uma cepa de *S. marcescens* geneticamente modificada (*S. marcescens* AS1), onde esta foi eficientemente transmitida vertical e horizontalmente e reduziu de forma significativa o desenvolvimento de *Plasmodium falciparum* em *A. stephensi*.

Apesar de ser um agente patogênico oportunista em humanos, *S. marcescens* não apresenta resistência a antimicrobianos, pode facilmente colonizar o intestino médio de insetos, ser manipulável geneticamente para inibir o desenvolvimento de *Plasmodium* dentro dos mosquitos e, portanto ser utilizada na paratransgênese para o controle da malária, podendo ser aplicada em *P. vivax* dentro *Anopheles darlingi*, os principais responsáveis pelos casos de malária na Amazônia brasileira (BANDO et al., 2013; WANG et al., 2017).

Arruda (2017), defende a hipótese que as bactérias do gênero *Pantoea* e *Serratia* podem ser utilizadas em paratransgenia no controle da malária.

Bacillus cereus: foram detectadas nas amostras de água, pupas e mosquito adultos. Quanto a morfologia, sua colônia em placa foi caracterizada pela cor branca e suas células como bacilos gram positivos (Figura 29).

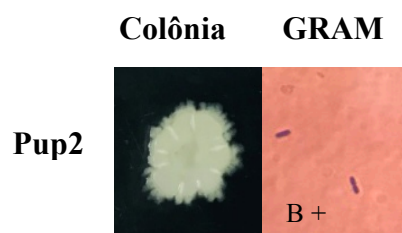


Figura 29. Características morfológicas de *Bacillus cereus*, cepa Pup2

B. cereus é uma bactéria pertencente à família Bacillaceae que possui a forma de bastonete. É considerado um patógeno emergente e oportunista de origem alimentar, encontrado no solo, água, vegetação e no ar, podendo ser facilmente transferido para os alimentos e causar intoxicação (PORTUONDO, 2012).

Pantoea dispersa: Suas colônias apresentaram-se na cor creme, com aspecto leitoso e brilho intenso. Suas células apresentaram-se como bacilos gram negativos (Figura 30). Foram detectadas nas amostras de estômagos e ovários.

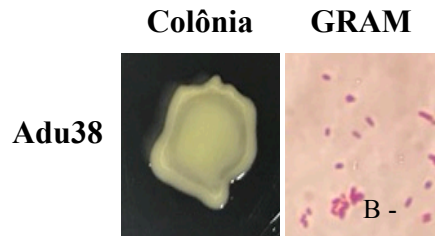


Figura 30. Características morfológicas de *Pantoea dispersa*, cepa Adu38

Esta espécie pertence à família Enterobacteriaceae. Pode ser encontrada associadas a plantas, solo, frutas, hortaliças e insetos, sendo pouco encontradas em humanos. *P. dispersa* é considerada como um patógeno oportunista aos seres humanos e apresenta resistência para alguns antimicrobianos (BARRON, 2009; CHANDEL et al., 2013; MEHAR et al., 2013).

Em mosquitos. *P. dispersa* já foi relatada em *Culex quinquefasciatus*, *Aedes albopictus* e *Anopheles darlingi* (CHANDEL et al., 2013; YADAV et al., 2016, ARRUDA, 2017).

Atualmente não há relatos de estudos com *P. dispersa* aplicada na paratransgenia, no entanto, não se deve descartar o seu potencial na condução de moléculas anti-*Plasmodium*, assim como relatado em *P. agglomerans*, bactéria simbiótica estudada por Wang et al., (2012).

Stenotrophomonas pavanii: Apresentou colônias na cor branca e sem brilho. Suas células foram observadas como bacilos gram negativos (Figura 31). Foram detectadas nas amostras de ovários e ovos.

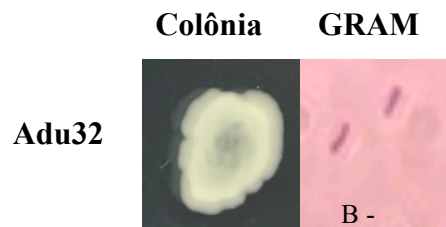


Figura 31. Características morfológicas de *Stenotrophomonas pavanii*, cepa Adu32

Esta espécie pertence à família Xanthomonadaceae, suas células se apresentam na forma de bastonetes Gram negativos. Pode ser isolada de plantas, onde exerce a função de

fixar nitrogênio, por isso é considerada como importante na biotecnologia. Não foi encontrados relatos sobre o risco de ser patogênica aos seres humanos (RYAN et al., 2009; RAMOS et al., 2011).

Klebsiella variicola: Suas colônias apresentaram cor branca, com aspecto leitoso, com ondulações nas bordas e brilho intenso. Suas células foram observadas como bacilos gram negativos (Figura 32). Foram detectadas nas amostras de pupa.

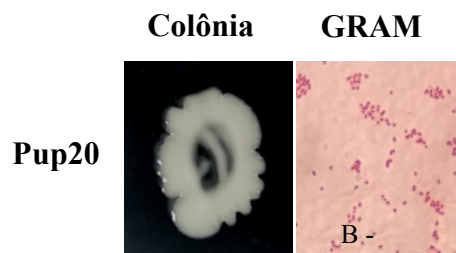


Figura 32. Características morfológicas de *Klebsiella variicola*, cepa Pup20

Esta espécie pertence à família Enterobacteriaceae, suas células apresentam forma de bastonetes Gram negativos. Podem ser isoladas de solo. São consideradas patógenos de plantas, bovinos e humano (ANDRADE et al., 2014).

Pantoea agglomerans: Apresentou como características morfológicas de suas colônias a cor creme, de aspecto leitoso e brilho intenso. Quanto a coloração de Gram, suas células foram caracterizadas como bacilos gram negativos (Figura 33).

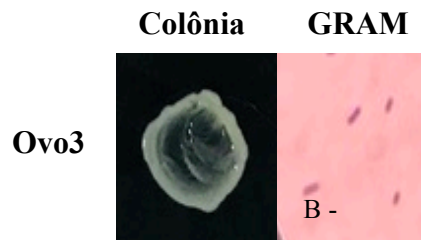


Figura 33. Características morfológicas de *Pantoea agglomerans*, cepa Ovo3

Esta espécie pertence à família Enterobacteriaceae. Suas células são bacilos aeróbios gram-negativos. Estão presentes em plantas, solos e material fecal. É considerada como um patógeno oportunista em humanos (DELE'TOILE, 2009).

A bactéria *P. agglomerans* é considerada um patógeno oportunista em pacientes imunodeprimidos, geralmente as infecções ocorrem quando há contato da pele com plantas infectadas, podendo se disseminar pela corrente sanguínea e causar infecções em diversos órgãos (CRUZ et al., 2007; DUTKIEWICZ et al., 2016).

P. agglomerans é uma bactéria simbiótica natural cuja ocorrência é generalizada em mosquitos anofelinos (TERENIUS et al., 2008; RANI et al., 2009).

Em um estudo realizado por Wang e colaboradores, *P. agglomerans* foi modificada geneticamente com o objetivo de produzir proteínas com efeito anti-*Plasmodium*, e foi eficaz em combater o *Plasmodium falciparum* e *berghei* em até 98%. (WANG et al., 2012).

Elizabethkingia miricola: Foram caracterizadas como colônias de cor branca, aspecto leitoso e com brilho. Quanto a coloração de Gram, suas células se apresentaram como bacilos gram negativos (Figura 34). Sua presença foi detectada nas amostras de larvas e pupas.

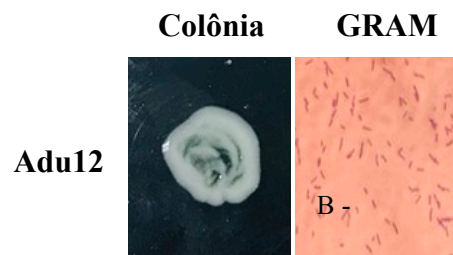


Figura 34. Características morfológicas de *Elizabethkingia miricola*, cepa Adu12

Esta espécie é uma bactéria não fermentativa, gram-negativa que raramente é encontrada. É considerada patogênica aos seres humanos e possui resistência a muitos antibióticos (GUPTA et al., 2017).

Considerando os critérios de seleção das espécies bacterianas para a utilização na paratransgenia, foram selecionadas para a etapa de transmissão horizontal e vertical as seguintes cepas bacterianas: *S. marcescens*-Adu40; *E. asburiae*-Adu24; *P. dispersa*-Adu38; e *P. agglomerans*-Ovo3, todas das amostras de Manaus, uma vez que também foi detectada a espécie *S. marcescens* nas amostras de Coari.

6.5 ANÁLISE DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DAS CEPAS BACTERIANAS SELECIONADAS

As cepas, *S. marcescens*-Adu40; *E. asburiae*-Adu24; *P. dispersa*-Adu38; e *P. agglomerans*-Ovo3, foram transformadas geneticamente, com um plasmídeo de expressão denominado pKS1-GFP, que foi clonado, primeiramente, na cepa DH5 α (invitrogen) da espécie bacteriana *Escherichia coli*, ambos cedidos pelo Centro de Apoio Multicêntrico da Universidade Federal do Amazonas (CAM-UFAM).

Após ser transformada, *E. coli* expressou a inflorescência verde quando foi exposta à luz ultravioleta (Figura 35).



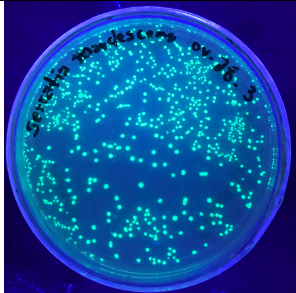
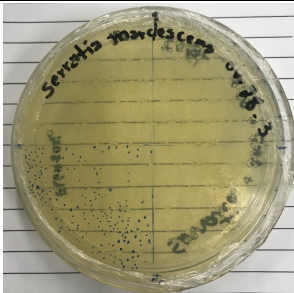
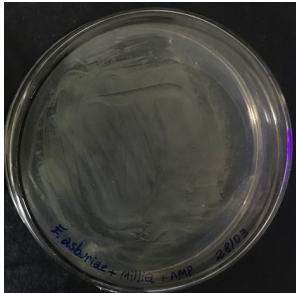
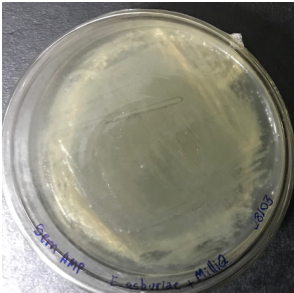
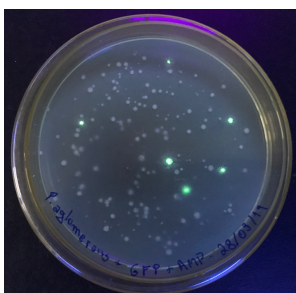
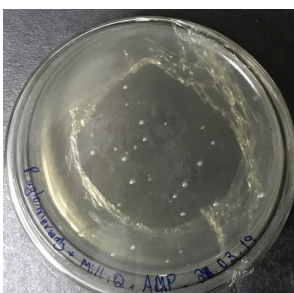
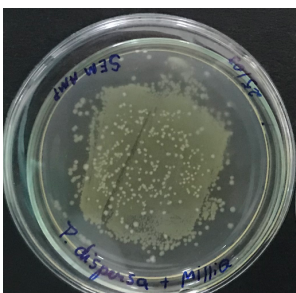
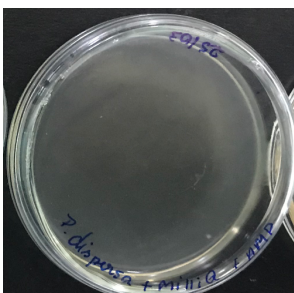
Figura 35. Cepa DH5 α de *Escherichia coli* expressando a inflorescência verde

Em seguida, foi realizada uma extração plasmidial da *E. coli*. O plasmídeo extraído foi utilizado para a transformação genética das nossas quatro cepas de espécies bacterianas, selecionadas para os testes de transmissão horizontal e vertical.

O plasmídeo pKS1-GFP, contém sequências na sua origem de replicação (Ori) que são específicas para uma boa expressão na cepa DH5 α de *E. coli*. Contudo, as cepas *E. asburiae*-Adu24 e *P. dispersa*-Adu38 não puderam assimilar esse plasmídeo. Hipotetizamos, que se fossem desenhados plasmídeos com sequências específicas para essas cepas, provavelmente, todas iriam expressar a fluorescência quando expostas à luz UV.

Dessa forma, dentre as quatro cepas bacterianas transformadas com o plasmídeo pKS1-GFP, somente *S. marcescens*-Adu40 e *P. agglomerans*-Ovo3 foram passíveis de receber o plasmídeo e expressar a proteína de fluorescente (Tabela 12).

Tabela 12. Competência das cepas *S. marcescens*-Adu40; *E. asburiae*-Adu24; *P. dispersa*-Adu38; e *P. agglomerans*-Ovo3 em assimilar o plasmídeo pKS1-GFP no processo de transformação genética.

Cepas	Expostas à luz UV	Não expostas à luz UV
<i>S. marcescens</i> -Adu40		
<i>E. asburiae</i> -Adu24		
<i>P. agglomerans</i> -Ovo3		
<i>P. dispersa</i> -Adu38		

As cepas bacterianas *S. marcescens*-Adu40 e *P. agglomerans*-Ovo3, por terem sido competentes em assimilar o plasmídeo pKS1-GFP e expressar a proteína fluorescente (figura 36), foram, então, utilizadas nos testes de transmissão vertical e horizontal em *A. darlingi*.

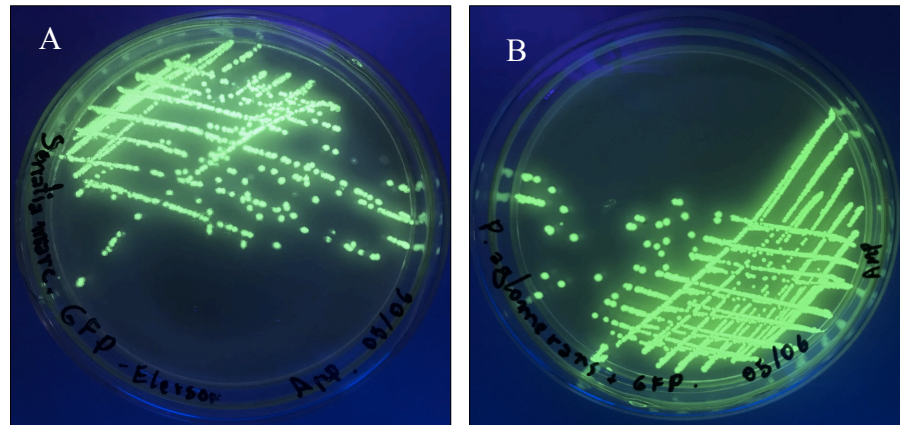


Figura 36. Cepas bacterianas de *S. marcescens*-Adu40 (A) e *P. agglomerans*-Ovo3 (B) portando plasmídeo pKS1-GFP e expressando a proteína fluorescente.

6.6 ANÁLISE DE TRANSMISSÃO VERTICAL E HORIZONTAL DAS CEPAS *S. marcescens*-Adu40 E *P. agglomerans*-Ovo3 EM *A. darlingi*

As análises de transmissão vertical e horizontal consistiram no monitoramento das cepas *S. marcescens*-Adu40 e *P. agglomerans*-Ovo3 durante todo o ciclo de vida de *A. darlingi*. Os experimentos deste monitoramento foram realizados da seguinte forma:

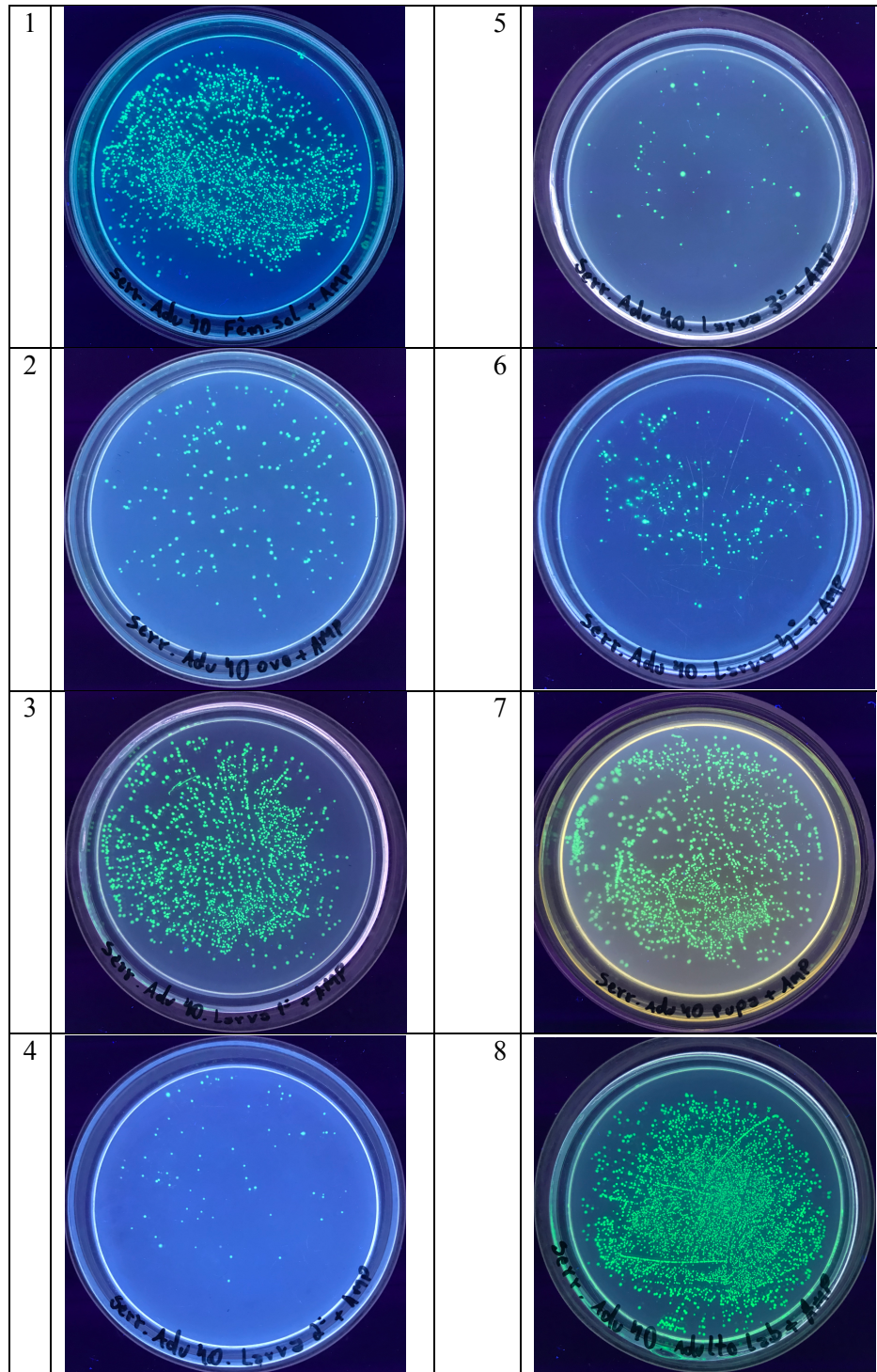
Em cinco copos parafinados de capacidade volumétrica de 500 ml, cada um contendo 10 fêmeas selvagens, foi colocado, sobre a tela de malha, um chumaço de algodão umedecido com uma solução contendo glicose 10%, ampicilina (v/v) 100 mg/ml e cepa bacteriana (*S. marcescens*-Adu40 ou *P. agglomerans*-Ovo3). Somente as fêmeas selvagens tiveram contato as bactérias transformadas com o plasmídeo pKS1-GFP.

Foram utilizadas 50 fêmeas selvagens para os testes de transmissão, sendo 20 em contato com *S. marcescens*-Adu40, 20 com *P. agglomerans*-Ovo3 e 10 sem contato com bactérias, este configurando o grupo controle.

Os resultados das análises de transmissão vertical e horizontal das cepas bacterianas *S. marcescens*-Adu40 e *P. agglomerans*-Ovo3, transformadas com pKS1-GFP, foram bastantes expressivos, uma vez que foi constatada a presença das colônias bacterianas, expressando a fluorescência, em todas as fases do ciclo de vida de *A. darlingi*.

Na tabela 13, são apresentadas as placas de Petri, contendo as colônias fluorescentes da cepa *S. marcescens*-Adu40 detectada em todas as fases do ciclo de vida de *A. darlingi*

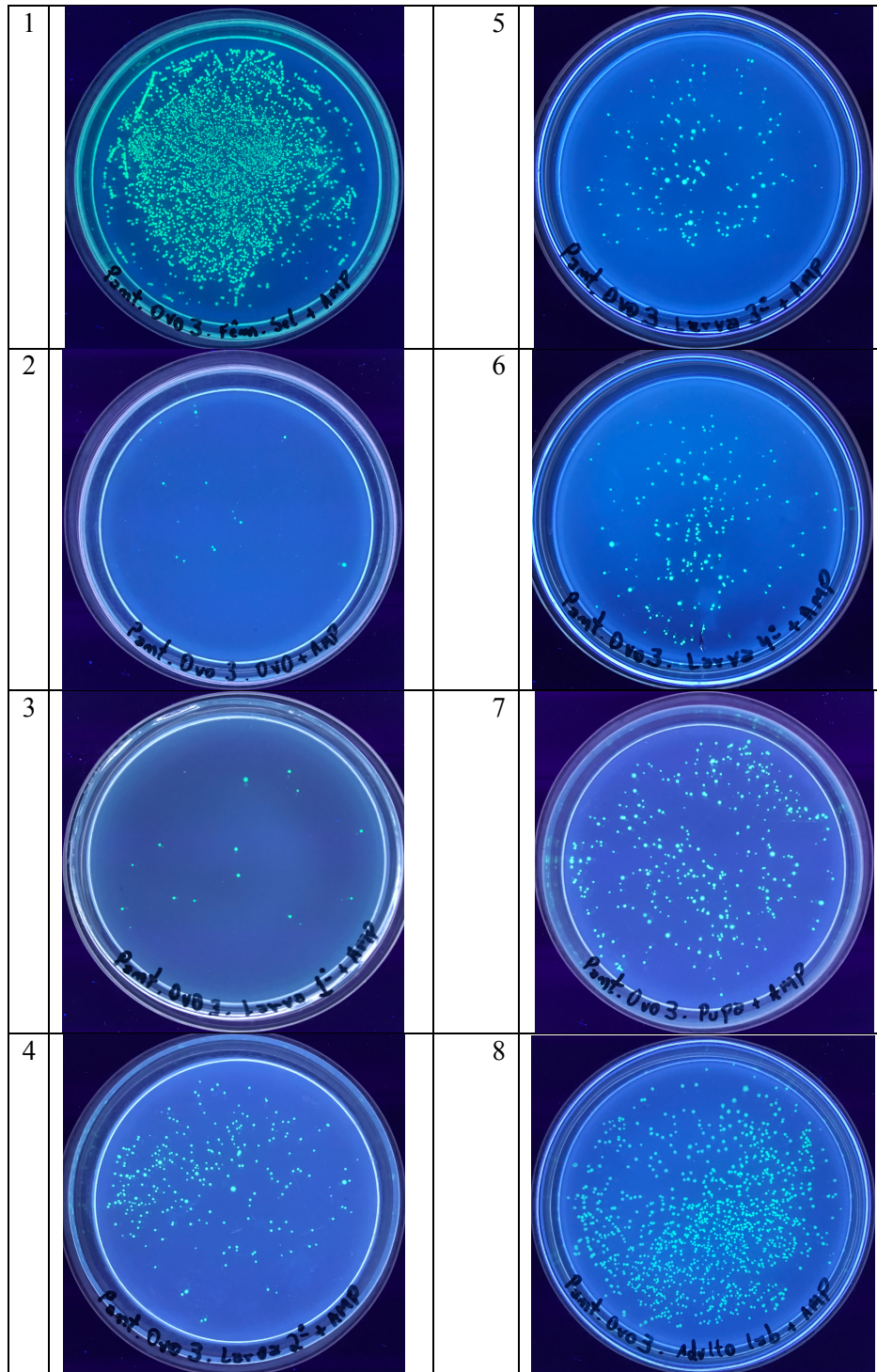
Tabela 13. Prevalência da cepa *S. marcescens*-Adu40 durante o teste de transmissão vertical e horizontal em *A. darlingi*



Legenda: 1- Fêmea selvagem; 2- ovo; 3 a 6 larvas de primeiro ao quarto estágio, respectivamente; 7- pupa e 8- adulto emergido em laboratório.

Na tabela 14, são apresentadas as placas de Petri, contendo as colônias fluorescentes da cepa *P. agglomerans*-Ovo3 detectada em todas as fases do ciclo de vida de *A. darlingi*

Tabela 14. Prevalência das cepas *P. agglomerans*-Ovo3 durante os testes de transmissão vertical e horizontal em *A. darlingi*

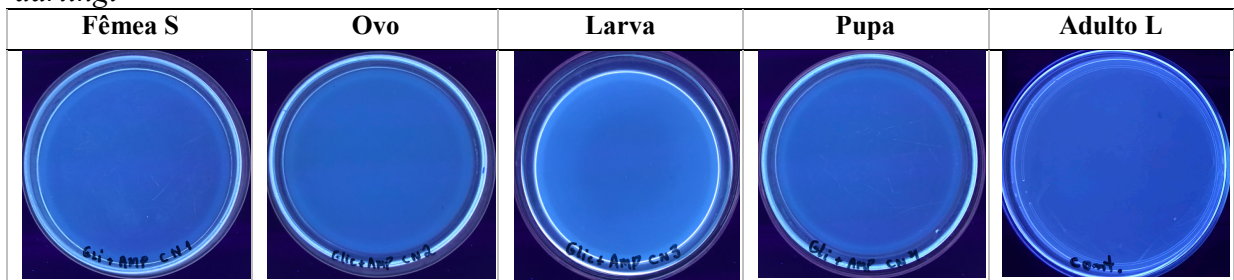


Legenda. 1) Fêmea selvagem; 2) ovo; 3 a 6 larvas de primeiro estágio ao quarto, respectivamente; 7) pupas; e 8) adulto emergido em laboratório.

Em todas as fases do ciclo de vida de *A. darlingi*, em que as genitoras selvagens tiveram contato com bactérias, foi possível a observar a presença de bactérias fluorescentes nas placas de Petri.

Nas fases do ciclo de vida de *A. darlingi*, em que as genitoras selvagens não tiveram contato com as cepas bacterianas transformadas com o plasmídeo pKS1-GFP, não foi observada a presença de nenhuma colônia bacteriana nas placas de Petri. Nesse experimento, foi administrada às fêmeas selvagens, apenas uma solução contendo glicose 10% e ampicilina (v/v) na concentração de 100 mg/ml. Foi observada a sensibilidade de todas as bactérias ao antibiótico (Tabela 15).

Tabela 15. Análise do grupo controle nos testes de transmissão vertical e horizontal em *A. darlingi*



O potencial de transmissão horizontal e vertical das cepas *S. marcescens*-Adu40 e *P. agglomerans*-Ovo3, foi detectado, tanto, quando as placas que foram expostas à luz UV, quanto na visualização da fluorescência do mosquito emergido em laboratório, sem necessidade de macerar e plaquear (Figura 37).

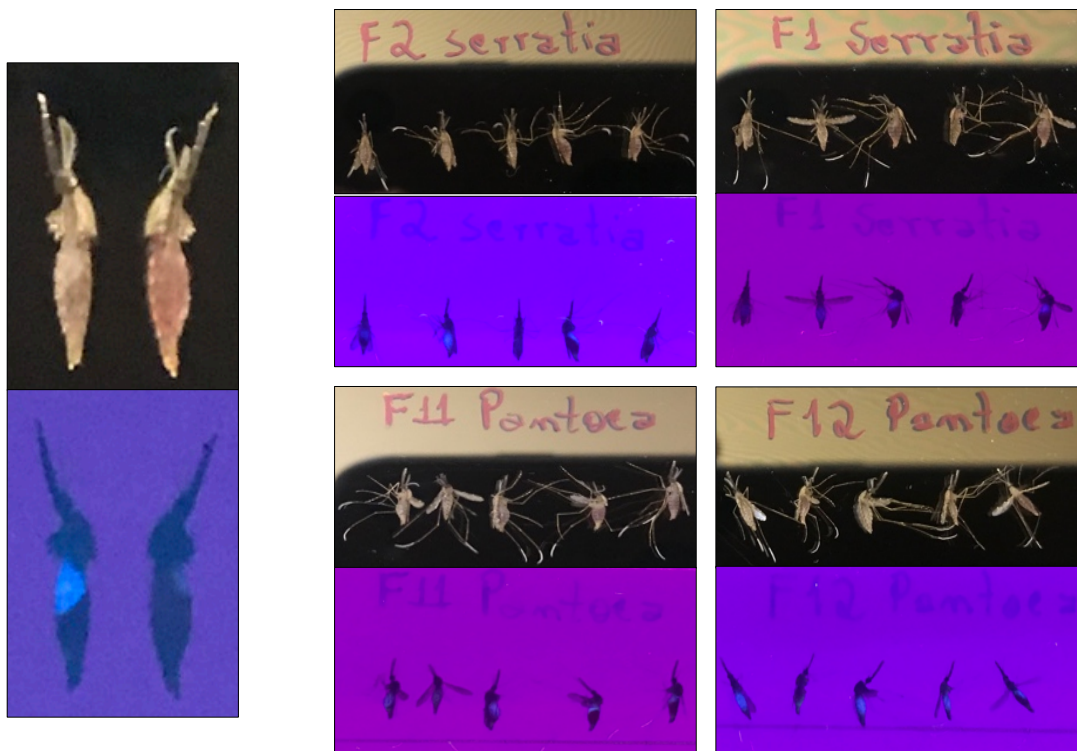


Figura 37: Mosquitos emergidos em laboratório, apresentando fluorescência em luz UV após 12h da alimentação com solução contendo glicose 10% e ampicilina v/v (100 mg/ml).

Embora o plasmídeo pKS1-GFP não tenha origem de replicação específicas para as cepas das espécies *S. marcescens*-Adu40 e *P. agglomerans*-Ovo3, estas se mostraram bem eficientes em assimilar e expressar as proteínas fluorescentes, e mesmo depois de passar por toda metamorfose do mosquito, essas cepas ainda continuaram expressando a proteína com bastante intensidade na presença do indutor ampicilina.

As colônias bacterianas, oriundas dos adultos emergidos em laboratório, que cresceram nas placas e expressaram a proteína fluorescente, foram submetidas a um novo sequenciamento do gene rRNA 16S.

O resultado desse sequenciamento mostrou que as cepas Sm1 e Pa1, isoladas dos adultos emergidos em laboratório cujas genitoras foram alimentadas com as cepas *S. marcescens*-Adu40 e *P. agglomerans*-Ovo3, respectivamente, foram também identificadas como sendo também das espécies *S. marcescens* e *P. agglomerans*, o que embasa ainda mais o potencial de transmissão vertical e horizontal das duas cepas monitoradas no ciclo de vida de *A. darlingi*.

As sequências gênicas das cepas Sm1 e Pa1 foram também depositadas no banco de dados gênicos do Genbank do NCBI, e podem ser acessadas com os registros MT102128 e MT102127, respectivamente.

Alguns trabalhos, com intuito paratransgênico, já foram realizados utilizando cepas de *S. marcescens* e *P. agglomerans*, em especial os trabalhos de Wang e colaboradores.

Uma cepa da espécie bacteriana *P. agglomerans* portando um gene anti-*Plasmodium* foi administrada por via de alimentação artificial em *A. gambiae*, infectado com *P. falciparum*. Os resultados confirmaram uma redução no número de oocistos de *P. falciparum* na parede do estômago do mosquito e a prevalência da cepa nas gerações seguintes do mosquito (WANG et al., 2012).

Em outro trabalho de Wang e colaboradores, foi avaliado o potencial de transmissão horizontal e vertical de uma espécie bacteriana do gênero *Serratia*, codando um gene efetor anti-*Plasmodium*, bem como a capacidade de reduzir o número de *P. falciparum* no intestino médio de *A. gambiae*. Ambos objetivos foram evidenciados com sucesso nos resultados do trabalho de Wang et al., (2017).

Os resultados do nosso trabalho configuram os primeiros relatos de testes de transmissão horizontal e vertical com cepas bacterianas do gênero *Pantoea* e *Serratia* na região norte do Brasil.

CONCLUSÃO

O interesse em detectar bactérias cultiváveis, associadas a mosquitos vetores de doenças, está voltado para um potencial gigantesco que muitas espécies bacterianas podem ter, sobretudo para bloquear os parasitas causadores de doenças que estes insetos transmitem.

Neste trabalho, foram realizadas buscas por cepas bacterianas da região amazônica do Brasil que apresentassem potencial para a sua utilização no controle da malária pela técnica de paratransgênese. Neste sentido, foram realizados isolamentos de colônias bacterianas de amostras associadas ao *A. darlingi* dos municípios de Coari e Manaus, no Estado do Amazonas, Brasil.

Uma grande diversidade de espécies bacterianas foram identificadas nas diferentes amostras, sendo que algumas, de mesma espécie, puderam ser detectadas compartilhando diferentes amostras. Partimos, então, para uma seleção dessas bactérias que pudessem ter relações estreitas com o ambiente de desenvolvimento larval dos mosquitos, como também colonizando seus intestinos.

As espécies predominantes em todas as amostras, de Coari e Manaus, foram: *A. nosocomialis*; *E. asburiae*; *K. pneumoniae*; *S. marcescens*; *B. cereus*; *Chromobacterium rhizoryzae*; *Pantoea dispersa*; *E. miricola*; *K. variicola*; *S. pavanii*; e *Pantoea agglomerans*. A partir de então, foi realizado um estudo para determinar o perfil dessas bactérias, a fim de selecionar os melhores candidatos para os testes de transmissão horizontal e vertical em *A. darlingi*.

Após análises de alguns critérios, fundamentais para a utilização em paratransgênese, como a não patogenicidade aos humanos, as cepas bacterianas *S. marcescens*-Adu40; *E. asburiae*-Adu24; *P. dispersa*-Adu38; e *P. agglomerans*-Ovo3, foram selecionadas para serem transformadas com um plasmídeo, contendo uma sequência gênica que expressa uma proteína verde fluorescente, quando exposta à luz UV.

Dessa forma, pôde ser revelado o potencial de duas cepas bacterianas que puderam ser analisadas quanto a capacidade de transferência horizontal e vertical em *A. darlingi*. Tais cepas foram *S. marcescens*-Adu40 e *P. agglomerans*-Ovo3. Os resultados dessas análises concluíram que estas cepas têm potencial para serem utilizadas no controle da malária por paratransgênese. Dessa forma, cria-se uma perspectiva para que testes, utilizando estas cepas, transformadas geneticamente com plasmídeos portadores de genes anti-*Plasmodium*, possam ser realizados em *A. darlingi*, bloqueando o desenvolvimento de *Plasmodium* spp, em um futuro próximo na região amazônica do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E.G & JACOBS-LORENA, M. (2004). **Mosquito midgut barriers to malaria parasite development**. *Insect Biochem Molec.* 34:667–671.
- AGOGUE, H; CASAMAYOR, E.O; JOUX, F; OBERNOSTERER, I; DUPUY, C; LANTOINE, F; CATALA, P; WEINBAUER, M.G; REINTHALER, T; HERNDL, G.J; LEBARON, P. (2004). **Comparison of samplers for the biological characterization of the sea surface microlayer**. *Limnol Oceanogr Meth* 2: 213–225.
- AL-ATROUNI, A; JOLY-GUILLOU, M.L; HAMZE, M; & KEMPF, M. (2016). **Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species**. *Frontiers in microbiology*, 7, 49.
- ALVES, A; RIESCO, R; CORREIA, A; TRUJILLO, M.E. (2015). ***Microbacterium proteolyticum* sp. nov. isolated from roots of *Halimione portulacoides***. *Int J Syst Evol Microbiol.* Jun; 65 Pt 6:1794-8.
- AMIR, A; RUSSELL, B; LIEW, J.W.K; MOON, R.W; FONG, M.Y; VYTHILINGAM, I; SUBRAMANIAM, V; SNOUNOU, G & LAU, Y.L. (2016). **Invasion characteristics of a *Plasmodium knowlesi* line newly isolated from a human**. *Scientific Reports*, v. 6, n. April, p. 24623.
- ANDRADE, B.G.N; RAMOS, N.V; MARIN, M.F.A; FONSECA, E.L; VICENTE, A.C.P. (2014). **The genome of a clinical *Klebsiella variicola* strain reveals virulence-associated traits and a p19-like plasmid**, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 360, Issue 1.
- ARCOS, A.N. (2012). **Caracterização de criadouros artificiais de *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) na área metropolitana da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). 118f.
- ARRUDA, A. (2017). **Identificação de microrganismos cultiváveis associados ao intestino de *Anopheles darlingi* (DIPTERA:CULICIDAE) com potencial à paratransgênese para o controle da malária**. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas. 170 f.
- BACKHED, F.L.R.E; SONNENBURG, J.L; PETERSON, D.A; GORDON, J.I; (2005). **Host-bacterial mutualism in the human intestine**. *Science* 307: 1915-1920.
- BANDO, H.I; KIYOSHI, O; WAMDAOGO, M.G; ATHANASE, B; HIROKA, A; BRYCE, N; SHINYA, F; XUENAN, X; N'FALE, S; HIROTAKA, K. (2013) **Intra-specific diversity of *Serratia marcescens* in *Anopheles* mosquito midgut defines *Plasmodium* transmission capacity**. *SCIENTIFIC REPORTS*. 3 : 1641. 2013.
- BARBOZA, H.T.G; NASCIMENTO, X.P.R; FREITAS-SILVA, O; SOARES, A.G; DA COSTA, J.B.N. (2018). **Compostos Organofosforados e seu Papel na Agricultura**. *Rev. Virtual Quim*, p. 172-193.
- BARRON, D.T; EADES, A.A; KANE, J. (2006). **A pseudo-outbreak of *Pantoea dispersa* in total joint replacement procedures**. *Am J Infect Control*. 34: E104.

BEARD, C.B; CORDON-ROSALES, C; DURVASULA, R.V. (2002). **Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission.** *Annu Rev Entomol.* 47:123-41.

BONGIO, N.J & LAMPE, D. J. (2015). **Inhibition of *Plasmodium berghei* Development in Mosquitoes by Effector Proteins Secreted from *Asaia* sp. Bacteria Using a Novel Native Secretion Signal.** *PLoS ONE* 10(12): e0143541. p. 1–17.

BRASIL, SIVEP-Malária/SVS-Ministério da Saúde. (2019). **Malária: Boletins e mapas interativos Região Amazônica de 2019.** Disponível em: “<https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/>”. Sujeito a alterações. Acesso: 23/02/2020.

CANHOS, V.P; MANFIO, G.P; VAZOLLER, R.F.; PELLIZARE, V.H. (1999). **Diversidade no Domínio Bactéria.** In: Joly, C. A.; Bicudo, C. E. M. (orgs). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX.** São Paulo: FAPESP.

CARDOSO, A.M; CLEMENTINO, M.M; VIEIRA, R.P; CALVACANTE, J.J.V, ALBANO, R,M; MARTINS, O.B. 2010. **Archaeal Metagenomics: Bioprospecting Novel genes and Exploring New Concepts.** In: MARCO, D. (Org). **Metagenomics: Theory, Methods, and Applications.** Wymondham: Caister Academic Press. 159-169.

Cardoso, A.M: Cavalcante, J.J.V; Vieira, R.P; Lima, J.L; Grieco, M.A.B; Clementino, M.M; Vasconcelos, A.T.R; Garcia, E.S; Souza, W; Albano, R.M; Martins, O.B. (2012). **Gut Bacterial Communities in the Giant Land Snail *Achatina fulica* and their Modification by Sugarcane-Based.** *Diet. PLoS ONE.* 7: e33440.

CARVALHO, M.P; ABRAHAM, W.R; MACEDO, A.J. (2008). **Microrganismos em favor da saúde humana.** *Revista Liberato, Novo Hamburgo* p. 77-81.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2018). **Biology parasites. About Malaria.** <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Acesso em 09/11/2018.

CEUPPENS, S; BOON, N; UYTENDAELE, M. (2013). **Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles.** *FEMS Microbiol Ecol* 84, 433–450.

CHANDEL, K; MENDKI, M.J; PARIKH, R.Y; KULKARNI, G; TIKAR, S.N; SUKUMARAN, D; PRAKASH, S; PARASHAR, B.D; SHOUCHE, Y.S; VEER, V. (2013). **Midgut Microbial Community of *Culex quinquefasciatus* Mosquito Populations from India.** *PLoS ONE* 8(11): e80453.

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 Tropical,* p.129–134.

CHEN, T.L; SIU, L.K; LEE, Y.T; CHEN, C.P; HUANG, L.Y; WU, R.C.C; CHO, W.L; FUNG, C.P. (2008). ***Acinetobacter baylyi* como um patógeno para a infecção oportunista.** *Jornal de Microbiologia Clínica.* 46 (9): 2938-2944. PMC 2546726 .

- CHEN, S; BAGDASARIAN, M; WALKER, E.D. (2015). ***Elizabethkingia anophelis*: molecular manipulation and interactions with mosquito hosts**. Appl Environ Microbiol; 81:2233–2243.
- CIRIMOTICH, C.M; DONG, Y; CLAYTON, A.M; SANDIFORD, S.L; SOUZA NETO, J.A; MULENGA, M; DIMOPOULOS, G. (2011). **Natural micróbio mediada por refratariedade ao *Plasmodium* infecção em *Anopheles gambiae***. Science. 332: 855-858. PMID: 21566196.
- COENYE, T; GEVERS, D; VANS DE PEER, Y; VANDAMME, P; SWINGS, J. (2005). **Towards a prokaryotic genomic taxonomy**. FEMS Microbiology Reviews. 29: 147-167.
- CONSOLI, R.A.G.B; OLIVEIRA, R.L (1994). **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- CONTE, J.E. (1997). **A novel approach to preventing insect borne diseases**. N Engl J Med 337: 785–786.
- CONTI, R; GUIMARÃES, D.O; PUPO, M. T. (2012). **Aprendendo com as Interações da Natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos**. *Ciência e Cultura*,v.64, n.3.
- CRUZ, A.T; CAZACU, A.C; ALLEN, C.H. (2007). ***Pantoea agglomerans*, um patógeno vegetal que causa doença humana** . Jornal de Microbiologia Clínica. 45 (6): 1989-1992. PMC-1933083.
- DAVIS, J.R; HALL, T; CHEE, E.M; MAJALA, A; MINJAS, J; SHIFF, C.J. (1995). **Comparison of sampling anopheline mosquitoes by light-trap and human-bait collections indoors at Bagamoyo, Tanzania**. Med Vet Entomol 9: 249-255.
- DELETOILE, A; DECRE, 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. 47:300-10.
- DE MAAGD, R.A; BRAVO, A; BERRY, C; CRICKMORE, N; SCHNEPF, H.E. (2003). **Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria**. *Annu. Rev. Genet.* 37, 409–433.
- DEANE, L.M. (1988). **Malaria studies and control in Brazil**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 38: 223-230.
- DREXLER, A.L; VODOVOTZ, Y; LUCKHART, S. (2008) ***Plasmodium* development in the mosquito: biology bottlenecks and opportunities for mathematical modeling**. Trends Parasitol. 24:333–336.
- DURVASULA, R.V; GUMBS, A; PANACKAL, A; KRUGLOV, O; AKSOY, S; MERRIFIELD, R.B; RICHARDS, F.F; BEARD, C.B. (1997). **Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. p.3274-3278, 1997.

- DUTKIEWICZ, J; MACKIEWICZ, B; KINGA, L.M; GOLEC, M; MILANOWSKI, J. (2016). ***Pantoea agglomerans*: Uma misteriosa bactéria do mal e do bem. Parte III. Efeitos deletérios: Infecções de humanos, animais e plantas.** Anais da Medicina Agrícola e Ambiental. 23 (2): 197-205. PMID 27294620.
- EL-KERSH, T.A; AHMED, A.M; AL-SHEIKH, Y.A; TRIPET, F; IBRAHIM, M.S; & METWALLI, A.A. (2016). **Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.).** Parasites & vectors, 9(1), 647.
- ENAYATI, A; HEMINGWAY, J. (2010). **Malaria management: past, present, and future.** Annu. Rev. Entomol. 55, 569-591.
- ENGEL, P; KWONG, W.K; MORAN, N.A. (2013). ***Frischella perrara* gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honey bee, *Apis mellifera*.** Int J Syst Evol Microbiol.
- FERREIRA, M.U; FORRONDA, A.S; SCHUMAKER, T.T.S. (2003). **Fundamentos Biológicos da Parasitologia Humana.** Editora Manole. Barueri – SP.
- FUEHRER, H.P; NOEDL, H. (2014). **Recent advances in detection of *Plasmodium ovale*: implications of separation into the two species *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*.** J Clin Microbiol. 52:387–91.
- GLARE, T; CARADUS, J; GELERNTER, W; JACKSON, T; KEYHANI, N; KOHL, J; MARRONE, P; MORIN, L; STEWART, A. (2012). **Have biopesticides come of age?** Trends Biotechnol. 30, 250–258.
- 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(3): 371D374 .
- GUIMARÃES, D,O; MOMESSO, L,S; PUPO, M,T. (2010). **Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** Quim. Nova. Nº 3, p. 667-679.
- GUPTA, P; ZAMAN, K; MOHAN, B; TANEJA, N. (2017). ***Elizabethkingia miricola*: A rare non-fermenter causing urinary tract infection.** World journal of clinical cases, 5(5), 187-190.
- GUSMÃO, D.S; SANTOS, A.V; MARINI, D.C; BACCI M, J.R; 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 Tropical. p.275–281.
- HEJAZI, A & FALKINER, F.R. (1997). ***Serratia marcescens*.** Journal of Medical Microbiology 46: 903-912.

HIWAT, H & BRETAS, G. (2011). **Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review.** Parasites & Vectors. p. 177.

HURWITZ, I; FIECK, A; READ, A; HILLESLAND, H; KLEIN, N; KANG, A; DURVASULA, R. (2011). **Paratransgenic Control of Vector Borne Diseases.** International Journal of Biological Sciences, 7(9), 1334–1344.

ITO, J; GHOSH, A; MOREIRA, L.A; WIMMER, E.A; JACOBS-LORENA, M. (2002). **Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite.** Nature 417, 452–455.

ITURBE-ORMAETXE, I; WALKER, T; O'NEILL, S.L. (2011). ***Wolbachia* and the Biological Control of Mosquito-Borne Disease.** *EMBO Reports*. p.508–518.

JANDA, J.M & ABBOTT, S.L. (2007). **16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls.** J Clin Microbiol. 45(9):2761-4.

KÄMPFER, P; MATTHEWS, H; GLAESER, S.P; MARTIN, K; LODDERS, N; FAYE, I. (2011). ***Elizabethkingia anophelis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Anopheles gambiae*.** Int J Syst Evol Microbiol; 61:2670–2675.

KLINDWORTH, A; PRUESSE, E; SCHWEER, T; PEPLIES, J; QUAST, C; HORN, M; GLÖCKNER, F.O. (2013). **Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies.** Nucleic Acids Res. 41(1):e1.

KOTH, K; JAMES, B; ELISHA, A.C; MARINA, C.H. (2012). ***Enterobacter absuriae* and *Aeromonas hydrophila*: Soft Tissue Infection Requiring Debridement.** Orthopedics Vol. 35, Issue 6. (2012): 996-999.

KURZ, C.L; CHAUVET, S; ANDRÈS, E; AUROUZE, M; VALLET, I; MICHEL G.P.F; UH, M; CELLI, J; FILLOUX, A; BENTZMANN, S; STEINMETZ, I; HOFFMANN, J.A; FINLAY, B.B; GORVEL, J.P; FERRANDON, D; EWBANK, J.J. (2003). **Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivoscreening.** The EMBO Journal (2003). p. 1451-1460.

LACEY, L.A; FRUTOS, R; KAYA, H.K; VAIL, P. (2001). **Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?** *Biol. Control*, 21, 230–248.

LEWINSOHN, T.M & PRADO, P.I. (2005). **How many species are there in Brazil?** Conservation Biology; 19(3):619-624.

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.** *Applied and Environmental Microbiology*. p.7217–7223.

LINDH, J.M; BORG-KARLSON, A.K; FAYE, I. (2008). **Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* and oviposition response to bacteria-containing water.** Acta Trop; 107:242–250.

LUXANANIL, P; ATOMI, H; PANYIM, S; IMANAKA, T. (2001). **Isolation of bacterial strains colonizable in mosquito larval guts as novel host cells for mosquito control.** Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol, 92. Pg, 342-345.

MALAJOVICH, M. A. (2009). **Biotecnologia: Fundamentos.** Edições Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, Rio de Janeiro. Appl. Environ. Microbiol.

MANCINI, M.V; SPACCAPELO, R; DAMIANI, C; ACCOTI, A; TALLARITA, M; PETRAGLIA, E; ROSSI, P; CAPPELLI, A; CAPONE, A; PERUZZI, G; VALZANO, M; PICCIOLINI, M; DIABATÉ, A; FACCHINELLI, L; RICCI, I; FAVIA, G. (2016). **Paratransgenesis to control malaria vectors: a semi-field pilot study.** Parasit Vectors. 10;9:140.

MANGUIN, S; NGO, C.T; TAINCHUM, K; JUNTARAJUMNONG, W; CHAREONVIRIYAPHAP, T; MICHON, A.L; JUMAS-BILAK, E. (2013). **Bacterial Biodiversity in Midguts of *Anopheles* Mosquitoes, Malaria Vectors in Southeast Asia.** *Anopheles* mosquitoes- New insights into malaria vectors. 549-576.

MEHAR, V; YADAV, D; SANGHVI, J; GUPTA, N; SINGH, K. (2013). ***Pantoea dispersa*: An unusual cause of neonatal sepsis.** The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 17(6): 726-728.

MCAULEY, D. (2016). **Enterobacter Species - Bacterial Strain, Organism; Enterobacter Species.** GlobalRPh.

MILLER, R.A; BENO, S.M; KENT, D.J; CARROLL, L.M; MARTIN, N.H; BOOR, K.J; KOVAC, J. (2016). ***Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66, 4744–4753.

MITREVA, M. (2017). **The Microbiome in Infectious Diseases.** Infectious Diseases, 68–74.e2.

MUELLER, I; GALINSKI, M.R; BAIRD, J.K; CARLTON, J.M; KOCHAR, D.K; ALONSO, P.L; DEL PORTILLO, H.A. (2009). **Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite.** The Lancet Infectious Diseases. p. 555–566.

MWADONDO, E.M; GHILAMICHAEL, A; ALAKONYA, A.E; KASILI, R.W. (2017). **Midgut bacterial diversity analysis of laboratory reared and wild *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Kenya.** African Journal of Microbiology Research. pp. 1171-1183.

NAKASHIMA, T; KURACHI, M; KATO, Y; YAMAGUCHI, K; ODA, T. (2005). **Characterization of bacterium isolated from the sedimenta t Coastal área of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolated.** Microbiol. Immunol; 49: 407-415.

NARTEY, R; OWUSU-DABO, E; KRUPPA, T; BAFFOUR-AWUAH, S; ANNAN, A; OPPONG, S; BECKER, N; OBIRI-DANSO, K. (2013). **Use of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* as a viable option in an Integrated Malaria Vector Control Programme in the Kumasi Metropolis, Ghana.** Parasit Vectors 6: 116.

NEMEC, A; KRIZOVA, L; MAIXNEROVA, M; VAN DER REIJDEN, T.J; DESCHAGHT, P; PASSET, V; VANECHOUTTE, M; BRISSE, S; DIJKSHOORN, L. (2011). **Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU).** Res. Microbiol. 162:393–404. PubMed.

NEVES, D. P. (2005). **Parasitologia Humana.** Ed.11. Atheneu.

OLIVEIRA-FERREIRA, J; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R; DEANE, L.M; DANIEL-RIBEIRO, C.T. (1992). **Feeding preference of *Anopheles darlingi* in malaria endemic areas of Rondônia state - Northwestern Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87: 601-602.

OLIVEIRA-FERREIRA, J; LACERDA, M. V. G; BRASIL, P; LADISLAU, J. L. B; TAUIL, P. L; DANIEL-RIBEIRO, C. T. (2010). **Malaria in Brazil: An overview.** Malaria Journal. p. 115.

OLIVEIRA; M.R. (2015). **Avaliação da biodiversidade de bactérias não cultiváveis associadas a anofelinos e seu habitat.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). 76f.

PATEL, J.B. (2001). **16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory.** Mol. Diagn. 6:313-321. [PubMed].

PORTUONDO, I.P. (2012). ***Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias.** Revista Cubana de Salud Pública. 38(1) 98-108.

PELEG, A.Y; SEIFERT, H; PATERSON, D.L. (2008). ***Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen.** Clin. Microbiol. Rev. 21:538–582.

PIDIYAR, V.J; JANGID, K; PATOLE, M.S; SHOUCHE, Y.S. (2014). **Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis.** Am J Trop Med Hyg. 70 (6): 597-603.

RAGHAVENDRA, K; BARIK, T.K; SHARMA, P; BHATT, R.M; SRIVASTAVA, H.C; SREEHARI, U; DASH, A.P. (2011). **Chlorfenapyr: A new insecticide with novel mode of action can control pyrethroid resistant malaria vectors.** Malar J.;10:1475-80.

RAHME, L.G; TAN, M.W; LE, L; WONG, S.M; TOMPKINS, R.G; CALDERWOOD, S.B; AUSUBEL, F.M. (1997). **Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors.** Proc. Nati Acad. Sci. USA 94, 13245-13250.

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: 96. PMID: 19450290.

REY, L. (2001). **Parasitologia.** Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. p. 335-347.

RIEHLE, M.A; MOREIRA, C.K; LAMPE, D; LAUZON, C; JACOBS-LORENA, M. (2007). **Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut.** Int J Parasitol 37:595–603.

RYAN, R.P; MONCHY, S; CARDINALE, M; TAGHAVI, S; CROSSMAN, L; AVISON, M.B; BERG, G; VAN DER LELIE, D; DOW, J.M. (2009). **The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*.** Nat. Rev. Microbiol. 7 514–525. 10.1038/nrmicro2163.

SEIBERT, G; HÖRNER, R; MENEGHETTI, B.H; RIGHI, R.A; DAL FORNO, N.L.F; SALLA, A. (2014). **Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola.** Einstein. 12(3):282-6

SINGH, B; KIM SUNG, L; MATUSOP, A; RADHAKRISHNAN, A; SHAMSUL, S.S; COX-SINGH, J; THOMAS, A; CONWAY, D.J. (2004). **A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings.** Lancet 363:1017–1024.

SINKA, M.E; BANGS, M.J; MANGUIN, S; RUBIO-PALIS, Y; CHAREONVIRIYAPHAP, T; COETZEE, M; MBOGO, C.M; HEMINGWAY, J; PATIL, A.P; TEMPERLEY, W.H; GETHING, P.W; KABARIA, C.W; BURKOT, T.R; HARBACH, R.E; HAY, S.I. (2012). **A global map of dominant malaria vectors.** Parasites & vectors. p. 69.

SMITH, R.C; CHRISTOPHER, K; JASON, L.R; JACOBS-LORENA, M. (2013) **Transgenic Mosquitoes Expressing a Phospholipase A₂ Gene Have a Fitness Advantage When Fed *Plasmodium falciparum*-Infected Blood.** Published: 8(10): e76097.

SUTHERLAND, C.J; TANOMSING, N; NOLDER, D; OGUIKE, M; JENNISON, C; PUKRITTAYAKAMEE, S; DOLECEK, C; HIEN, T.T; DO ROSÁRIO, V.E; AREZ, A.P; PINTO, J; MICHON, P; ESCALANTE, A.A; NOSTEN, F; BURKE, M; LEE, R; BLAZE, M; OTTO, T.D; BARNWELL, J.W; PAIN, A; WILLIAMS, J; WHITE, N.J; DAY, N.P; SNOUNOU, G; LOCKHART, P.J; CHIODINI, P.L; IMWONG, M; POLLEY, S.D. (2010). **Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally.** J Infect Dis. 201:1544–50.

TADEI, W.P; SANTOS, J.M.M; COSTA, W.L.S; SCARPASSA, V. M. (1988). **Biologia de Anofelinos Amazônicos. Ocorrência de Espécies de *Anopheles*, Dinâmica da Transmissão e Controle da Malária Na Zona Urbana de Ariquemes (Rondônia).** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. p. 221–251.

TADEI, W.P; SANTOS, J.M.M; RODRIGUES, I.B; RAFAEL, M.S. (2010). **Malária e Dengue na Amazônia: vetores e estratégias de controle.** Pesquisa Científica e Tecnologia em Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília. Cap. MCT-INPA. p.112-125.

TADEI, W. P; RODRIGUES, I.B; RAFAEL, M.S; SAMPAIO, R.T.M; MESQUITA, H.G; PINHEIRO, V.C.S; ZEQUI, J.A.C; ROQUE, R.A; DOS SANTOS, J.M.M (2017). **Adaptative processes, control measures, genetic background, and resilience of malaria vectors and environmental changes in the Amazon region.** Hydrobiologia. p. 179–196.

TAYLOR, L.H. (1999) **Infection rates in, and the number of *Plasmodium falciparum* genotypes carried by *Anopheles* mosquitoes in Tanzania.** Ann Trop Med Parasitol; 93:659–662. [PubMed: 10707111].

TERENIUS, O; OLIVEIRA, C.D; PINHEIRO, W.D; TADEI, W.P; JAMES, A.A; MARINOTTI, O. (2008). **16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes.** J Med Entomol. p. 172–175.

Vega-Rodríguez, J; Ghosh, A.K; Kanzok, S.M; Dinglasan, R.R; Wang, S; Bongio, N.J; Kalume, D.E; Miura, K; Long, C.A; Pandey, A; Jacobs-Lorena, M. (2014). **Multiple pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. p. E492-500.

VERHULST, N.O; BEIJLEVELD, H; KNOLS, B.G; TAKKEN, W; SCHRAA, G; BOUWMEESTER, H.J; SMALLEGANGE, R.C. (2009). **Cultured skin microbiota attracts malaria mosquitoes.** Malaria Journal.; 8(1):302.

VILLEGAS L.M & PIMENTA, P.F. (2014). **Metagenomics, paratransgenesis and the *Anopheles* microbiome: a portrait of the geographical distribution of the anopheline microbiota based on a meta-analysis of reported taxa.** Mem Inst Oswaldo Cruz.

VILCINSKAS, A. (2010). **Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects.** *Virulence* 1, 206–214.

WANG, S; GHOSH, A.K; BONGIO, N; STEBBINGS, K.A; LAMPE, D.J; JACOBS-LORENA, M. (2012). **Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes.** Proc Natl Acad, Sci, USA; 109:12734–12739.

WANG, S & JACOBS-LORENA, M. (2013). **Genetic approaches to interfere with malaria transmission by vector mosquitoes.** Trends Biotechnol: 185–193.

WANG, S; DOS-SANTOS, A; HUANG, W; LIU, K.C; OSHAGHI, M.A; WEI, G; AGRE, P; JACOBS-LORENA, M. (2017). **Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria.** Science. Issue 6358, pp. 1399-1402v.

WANG Y; GILBREATH, T.M; KUKUTLA, P; YAN, G; XU, J. (2011). **Dynamic Gut Microbiome across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya.** PLoS ONE 6(9): e24767.

WEISS, B. AKSOY, S. (2011). **Microbiome influences on insect host vector competence.** Trends Parasitol 27: 514-522.

WHITTEN, M.M.A; SHIAO, S.H; LEVASHINA, E.A. (2006). **Mosquito midguts and malaria: Cell biology, compartmentalization and immunology.** Parasite Immunol 28:121–130.

WHO - World Health Organization. (2016). **Welcomes support from Gavi for malaria vaccine pilot programme.** Disponível em: <https://www.who.int/malaria/news/2016/gavi-malaria-vaccine/en/>. Acesso em 23 de Dezembro de 2018.

WHO - World Health Organization. (2017). **World malaria report.** Geneva: 162 p.

WHO - World Health Organization. (2018). **World Malaria Report**. Geneva: 210 p.

WHO - World Health Organization. (2019). **World malaria report**. Geneva: 232 p.

WILKERSON, R.C; LINTON, Y.M; FONSECA, D.M; SCHULTZ, T.R; PRICE, D.C; STRICKMAN, D.A. (2015). **Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships**. PLOS ONE 10 (7): e0133602.

WOLFARTH, B. R. (2011). **Análise epidemiológica espacial, temporal e suas relações com as variáveis ambientais sobre a incidência da malária no período de 2003 a 2009 em 4 municípios do estado do Amazonas, Brasil**. Manaus. 116 f. Dissertação (mestrado)-INPA.

YADAV, K.K; DATTA, S; NAGLOT, A; BORA, A; HMUAKA, V; BHAGYAWANT, S; HEMANTA K; GOGOI, H.K; V.V; RAJU, P.S. (2016). **Diversity of Cultivable Midgut Microbiota at Different Stages of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* from Tezpur, India**. PLoS ONE 11(12): e0167409.

YANG, B; WANG, Y; QIAN, P.Y. (2016). **Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis**. BMC Bioinformatic. p. 135, 2016.

YIN, Y.L; WAI-FONG, Y; KOK-GAN, C. (2016). ***Enterobacter asburiae* Strain L1: Complete Genome and Whole Genome Optical Mapping Analysis of a Quorum Sensing Bacterium**. Sensors, Vol. 14 (8): 13913-13924.

YOSHIDA, S; IOKA, D; MATSUOKA, H; ENDO, H; ISHII, A. (2001). **Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes**. Mol Biochem Parasitol 113:89–96.

ZDZIARSKI, P; PAŚCIAK, M; ROGALA, K; KORZENIOWSKA-KOWAL, A; GAMIAN, A. (2017). ***Elizabethkingia miricola* as an opportunistic oral pathogen associated with superinfectious complications in humoral immunodeficiency: a case report**. BMC infectious diseases, 17(1), 763.