

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Análise Comparativa da Secreção de Proteases e Quitinases do Fungo
Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* na Presença de Diferentes
Cutículas de Artrópodes**

Dissertação de Mestrado

TANARA DA SILVA RIBEIRO

**PORTO ALEGRE
OUTUBRO DE 2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Análise Comparativa da Secreção de Proteases e Quitinases do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* na Presença de Diferentes Cutículas de Artrópodes

Tanara da Silva Ribeiro

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para obtenção do grau de mestre.

Orientadora

Profª. Dra. Marilene Henning Vainstein

PORTO ALEGRE
OUTUBRO DE 2006

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo à pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICO

À minha mãe e ao Gustavo.

AGRADECIMENTOS

À minha fé, companheira inseparável.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela excelência do curso.

À professora Dra. Marilene Henning Vainstein pela orientação e paciência.

Aos colegas dos laboratórios dos professores Dr. Carlos Termignoni, Dr. Jorge Guimarães e Dr. Henrique Ferreira, pelo uso de equipamentos, e pela disposição e paciência durante a utilização dos mesmos.

Aos laboratórios das professoras Dra. Célia Carlini (Centro de Biotecnologia - UFRGS) e Dra. Neiva Monteiro de Barros (Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul) pela concessão dos insetos utilizados neste trabalho.

Aos professores Dr. Carlos Termignoni e Dra. Célia Carlini, membros da comissão de acompanhamento.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia sempre muito atenciosos e prestativos.

Aos colegas Melissa Franceschini, Irina Lübeck, César Baratto, Roberta Bussamara, Paulo Marcos Pinto, Juliano Boldo, e principalmente Felipe Zambelli os quais me ajudaram de maneira especial durante a execução desse trabalho.

E às adoráveis colegas Bianca Bittencourt, Josiane Faganelo, Simone Virtuoso, Ana Lusía Leal, Juliana Crestani, Cristine Goebel, Márcia Polese, Lenise Palma, Letícia Goulart e Lívia Kmetzsch, companheiras de tantas batalhas trilhadas durante a formação de todos nós.

Ao meu pai por tomar conta dos cachorros na minha ausência.

Ao Gustavo por todos os colos nos momentos difíceis, às madrugadas em claro me ajudando e apoiando, pelos conselhos, por estar comigo nos momentos em que mais precisei, pela imensa paciência comigo durante essa jornada.

E à minha mãe, por todos os conselhos nos momentos de angústia e dificuldade, por todos os abraços e todas as palavras de apoio e incentivo, por ser pra mim um exemplo de coragem, perseverança e sucesso. Obrigada pela confiança, dedicação e paciência, sem você eu não teria conseguido. É com muito orgulho e amor que dedico minhas vitórias a ti!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. JUSTIFICATIVA.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. O controle biológico e o fungo <i>M. anisopliae</i>	15
2.2. O fungo <i>M. anisopliae</i>	18
2.2.1. Aspectos gerais.....	18
2.2.2. Mecanismo de infecção	18
2.3. Quitinases	21
2.4. Proteases.....	23
2.5. Os artrópodes praga	29
2.5.1. O percevejo <i>D. peruvianus</i>	29
2.5.2. O carrapato <i>B. microplus</i>	30
2.5.3. A lagarta <i>A. gemmatalis</i>	30
3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Linhagem utilizada, cultivo e manutenção de <i>M. anisopliae</i>	33
4.2. Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i>	33
4.3. Condições de cultivo de <i>M. anisopliae</i> para a indução de quitinases e proteases	34
4.4. Preparação de cutículas de <i>D. peruvianus</i>	34
4.5. Preparação de cutículas de <i>B. microplus</i>	34
4.6. Preparação de cutículas de <i>A. gemmatalis</i>	35

4.7. Quantificação de proteínas totais	35
4.8. Detecção de atividade enzimática quitinolítica	35
4.9. Detecção de atividade enzimática proteolítica.....	36
4.10. Preparação da amostra para SDS-PAGE.....	36
4.11. SDS-PAGE	37
4.12. Zimograma em gelatina	37
4.13. Eletroforese Bi-Dimensional	38
5. RESULTADOS	40
5.1. Análise da secreção de proteínas totais	40
5.2. Análise da secreção de proteases	52
5.3. Análise da secreção de quitinases	55
6. DISCUSSÃO	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	porcento
°C	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µmol	micromol
BSA	albumina sérica bovina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]- 1-propanesulfonate
DTT	ditiotreitól
g	gramas
h	hora
IEF	Focalização Isoelétrica
kDa	quilodalton
LB	Luria-Bertani
M	molar
mA	miliampere
MCC	meio de Cove completo
MM	meio mínimo
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MU	metilumbeliferona
nm	nanômetro
p/v	peso/volume
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
pH	potencial de hidrogênio iônico
pI	ponto isoelétrico
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	dodecilsulfato de sódio
TCA	Ácido Tri-cloro Acético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamine
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
Tween	polisorbitano
U	unidade
V	volts
v/v	volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Secreção de proteínas totais por <i>M. anisopliae</i> cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono.....	40
Figura 2: Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono	42
Figura 3: Perfil eletroforético em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono	43
Figura 4: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono (<i>B. microplus</i> x Quitina cristalina)	46
Figura 5: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono (<i>A. gemmatalis</i> x Quitina cristalina)	47
Figura 6: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono (<i>D. peruvianus</i> x Quitina cristalina).....	47
Figura 7: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono (<i>D. peruvianus</i> x <i>B. microplus</i>)	48
Figura 8: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono (<i>A. gemmatalis</i> x <i>B. microplus</i>).....	48
Figura 9: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono (<i>A. gemmatalis</i> x <i>D. peruvianus</i>).....	49
Figura 10: Comparativo entre mesmas faixas de pH e massa de 55 a 74 kDa entre os géis	51
Figura 11: Comparativo entre mesmas faixas de pH e massa de 33 a 57 kDa entre os géis	52
Figura 12: Secreção de proteases por <i>M. anisopliae</i> cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono.....	53
Figura 13: Atividade específica para a secreção de proteases por <i>M. anisopliae</i> cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono	53
Figura 14: Perfil proteolítico unidimensional (SDS-PAGE 15%) dos sobrenadantes de cultivo	54
Figura 15: Secreção de quitinases por <i>M. anisopliae</i> cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono.....	55
Figura 16: Atividade específica de secreção de quitinases por <i>M. anisopliae</i> cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Combinações de <i>Spots</i> (ID) identificados pela análise computacional e manual	44
Tabela 2: Taxa de identidade combinatória entre os quatro diferentes géis 2D	46

RESUMO

Metarhizium anisopliae é um fungo filamentosso entomopatogênico muito versátil que infecta, aproximadamente, 300 espécies de artrópodes, e também é adaptado à vida na rizosfera de plantas, sendo de extrema importância para o controle biológico de pragas na agricultura e pecuária. De acordo com o comportamento promíscuo desse fungo, pesquisadores têm identificado um grande número de genes relacionados à interação com o hospedeiro, e que são regulados de acordo com a sua indução. Em sua maioria, são genes que codificam para enzimas hidrolíticas. O número e a diversidade desses genes podem ser a chave para a habilidade desse patógeno em infectar uma larga variedade de artrópodes, podendo expressar genes diferentemente para cada tipo de hospedeiro. *M. anisopliae* secreta, entre outros, complexos quitinolítico e proteolítico para a degradação da quitina e proteínas presentes na cutícula do hospedeiro. Desse modo, o estudo da regulação dessas enzimas é de fundamental importância para o entendimento do processo de infecção; sendo assim, através desse trabalho foi observada e analisada a especialização na expressão de proteínas, especialmente de quitinases e proteases, secretadas por uma linhagem selvagem de *M. anisopliae*, na presença de cutículas de diferentes artrópodes, particularmente, de *Dysdercus peruvianus*, *Boophilus microplus*, *Anticarsia gemmatalis* e de quitina cristalina, através de ensaios de detecção enzimática e eletroforese uni e bidimensional. Em todos os experimentos, variando-se as condições de fonte de carbono e tempo de cultivo, a secreção de proteínas se mostrou altamente diferenciada, demonstrando comportamento diferencial do fungo a vários hospedeiros, o que seria um sinal da versatilidade do entomopatógeno, aqui estudado, para a capacidade de infectar centenas de hospedeiros.

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is a very versatile entomopathogenic filamentous fungus that infects, approximately, 300 species of arthropods, and is also adapted to the life in the rhizosphere of plants, being of extreme importance for the biological control of pests in agriculture and pecuary. In accordance with this promiscuous behavior of this fungus, researchers have identified a great number of genes related to the interaction with the host, and that they are regulated in accordance with its induction. In their majority, these genes encode for hydrolytic enzymes. The diversity of these genes can be the key for the ability of this pathogen in infect a wide variety of arthropods, being able to differently express genes for each type of host. *M. anisopliae* secretes chitinolytic and proteolytic complexes for the degradation of the chitin and proteins present in the cuticle of the host. In this way, the study of the regulation of these enzymes is of up fundamental importance for the understanding of the infection process. Through this research, the specialization in the expression of proteins, especially chitinases and proteases, secreted by a wild strain of *M. anisopliae*, in the presence of cuticles of different arthropods, particularly, of *Dysdercus peruvianus*, *Boophilus microplus*, *Anticarsia gemmatalis* and crystalline chitin, was observed and analyzed through enzymatic assays and one- and two-dimensional electrophoresis. In all the experiments, the conditions of the carbon source and time of culture, the protein secretion showed highly differentiated, demonstrating distinguishing fungus behavior to various hosts, which would be a sign of the versatility of this entomopathogen for the capacity of infecting hundreds of hosts.

1. JUSTIFICATIVA

Na agricultura e pecuária, as infestações de pragas são controladas principalmente por produtos químicos, que além de provocarem a seleção de populações resistentes, acarretam problemas de permanência de resíduos tóxicos nos produtos de origem animal, vegetal e no meio ambiente. Por isso, nos últimos anos, tem aumentado a preocupação da população consumidora em relação aos prováveis danos que esses resíduos tóxicos possam causar à sua saúde e ao meio ambiente. É nesse contexto que o controle biológico de pragas tem sido uma alternativa promissora, pois utiliza mecanismos naturais de combate às pragas.

Além disso, o interesse, pelos programas de controle biológico de pragas, tem crescido consideravelmente no mundo em função do novo direcionamento internacional da produção agrícola de favorecer a conservação e o uso sustentável dos recursos biológicos, requisitos básicos da Convenção da Biodiversidade.

A tendência do uso do controle biológico de pragas é aumentar em âmbito global, atendendo às demandas internacionais na utilização de práticas agrícolas menos agressivas ao meio ambiente.

No Brasil o controle biológico é utilizado desde a década de 20, através da atuação pioneira do Instituto Biológico de São Paulo – SP (FUNDAG - 2006).

O primeiro relato de controle natural foi feito em 1924, quando apareceu a chamada broca do café nas lavouras paulistas. O Instituto Biológico identificou a praga e trouxe o primeiro método de controle ecológico para o Brasil. A vespinha de Uganda foi usada com sucesso no combate à broca do café. Esse foi apenas o primeiro passo para a evolução do controle biológico no País. Desde então, têm sido estudados novos agentes de combate a pragas. Hoje o Brasil tem importantes programas de controle biológico, como a utilização de bactérias, vírus, fungos e nematóides no combate a pragas e doenças que atacam rebanhos e culturas de importância econômica, como a cana-de-açúcar (FUNDAG - 2006).

Entre os agentes de controle de artrópodes que estão sendo utilizados no País destacam-se os fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Sporothrix insectorum*, os agentes de natureza viral *Baculovirus anticarsia*, *Baculovirus erinnyis* e *Baculovirus spodoptera* e os agentes bacterianos *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* (FUNDAG - 2006).

Contudo, a pesquisa relacionada ao uso de microrganismos para o controle de pragas ainda é incipiente; no entanto, vários pesquisadores têm-se dedicado ao estudo de infecções experimentais de artrópodes com bactérias, vírus e fungos, dentre esses, usando *M. anisopliae* como biocontrolador.

M. anisopliae é um fungo filamentosso entomopatogênico muito versátil que infecta, aproximadamente, 300 espécies de artrópodes (Alves, 1998), e também é adaptado à vida na rizosfera de plantas (Hu & St. Leger, 2002), sendo de extrema importância para o controle biológico de pragas na agricultura e pecuária. De acordo com esse comportamento promíscuo do fungo em questão, pesquisadores têm identificado um grande número de genes relacionados à interação com o hospedeiro, e que são regulados de acordo com a sua indução. Em sua maioria, são genes que codificam para enzimas hidrolíticas. O número e a diversidade desses genes podem ser a chave para a habilidade desse patógeno em infectar uma larga variedade de artrópodes, pois enquanto a composição da procutícula desses hospedeiros pareça similar, os componentes presentes na epicutícula dos mesmos são extremamente heterogêneos, mesmo dentro de um único gênero, e assim podendo expressar genes diferentemente para cada tipo de hospedeiro (Freimoser *et al.*, 2003, 2005; Wang & St. Leger, 2005).

O entendimento da relação entre o fungo e o hospedeiro tem permitido o conhecimento da natureza da patogenicidade, possibilitando a introdução de genes específicos, altamente expressos, visando aumentar a velocidade do processo de infecção, diminuindo o intervalo de tempo existente entre a aplicação a campo do fungo biocontrolador e a morte das pragas. Estudos demonstraram que *M. anisopliae* secreta, entre outros, complexos quitinolítico e proteolítico para a degradação da quitina e proteínas presentes na cutícula do hospedeiro (St. Leger *et al.*, 1986a, 1996c). Desse modo, o estudo da regulação dessas enzimas é de fundamental importância para o entendimento do processo de infecção, sendo assim através desse trabalho buscou-se observar e analisar a diferenciação na expressão de proteínas, especialmente de quitinases e proteases, secretadas por uma linhagem selvagem de *M. anisopliae*, na presença de cutículas de diferentes artrópodes, particularmente, de *Dysdercus peruvianus*, *Boophilus microplus*, *Anticarsia gemmatalis* e de quitina cristalina, através de ensaios de detecção enzimática e eletroforese uni e bidimensional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O controle biológico e o fungo *M. anisopliae*

Alternativas aos defensivos agrícolas têm sido estudadas em virtude de que esses produtos químicos representam grandes custos aos agricultores e pecuaristas e, grandes danos ao meio ambiente e à saúde humana, apesar de serem vantajosos em relação à eficiência e rapidez na morte das pragas. Todavia esses produtos causam sérios efeitos negativos no equilíbrio da microbiota do solo, do clima, da fauna e flora, além de favorecerem a seleção de pragas resistentes, resultantes da forte pressão seletiva por eles exercida. É nesse contexto, que o controle biológico de pragas tem sido uma alternativa promissora, pois além de utilizar mecanismos naturais de combate às pragas, apresenta grandes vantagens quanto ao impacto ambiental, aos custos, à especificidade e ao desenvolvimento de resistência (Alves, 1998; Milner, 2000; Shah & Pell, 2003).

Entre os microrganismos patogênicos, com potenciais aplicações no controle biológico, destacam-se os fungos filamentosos entomopatogênicos. Em âmbito mundial, fungos entomopatogênicos são inimigos comuns naturais de artrópodes, atraindo atenção como agentes potenciais para o controle biológico (Hajek & St. Leger, 1994; Shah & Pell, 2003). Fungos entomopatogênicos produzem conídios infectivos que germinam e penetram a cutícula de seus hospedeiros sem a necessidade da ingestão. Uma vez dentro do hospedeiro, eles proliferam com uma progressão de estruturas como as hifas, explorando as fontes nutricionais de seus hospedeiros, o que resulta na morte do hospedeiro e na produção de mais conídios infectivos para a transmissão de estruturas resistentes que persistam no ambiente. A atividade fúngica é fortemente influenciada pelas condições bióticas e abióticas, umidade de aproximadamente 95% é necessária para a germinação do conídio, infecção e esporulação, sendo que a velocidade de morte do hospedeiro é modulada pela temperatura ambiente. Sua ecologia, fisiologia, e ciclos de vida são altamente variáveis, refletindo adaptação para superar limitações ambientais e as defesas dos hospedeiros (Inglis *et al.*, 2001; Pell *et al.*, 2001).

Além disso, os fungos patogênicos apresentam outras vantagens em relação aos outros sistemas de microrganismos utilizados no controle biológico (bactérias, protozoários, vírus e nematóides) como por exemplo: possuem uma ampla gama de

hospedeiros, se encontram amplamente distribuídos no solo, apresentam uma melhor dispersão de um hospedeiro infectado para outro não infectado, não são infecciosos para humanos ou qualquer outro animal vertebrado, e também são de fácil manipulação e armazenamento (Milner, 2000; Gindin *et al.*, 2002; Kamp & Bidochka, 2002; Sun *et al.*, 2003; Wang & Powell, 2004).

Porém, existem problemas para a aprovação e aceitação de fungos filamentosos no mercado do controle biológico, sendo que o principal deles é o maior tempo necessário entre a aplicação do biopesticida e a morte dos hospedeiros em comparação aos pesticidas químicos. Durante este período de tempo, que compreende entre dois ou três dias, as pragas ainda podem causar sérias perdas na produtividade, problema esse que tem levado a diversos estudos, visando aumentar a velocidade de morte dos hospedeiros para melhorar a eficiência do biocontrolador. O entendimento das características básicas da relação entre o fungo e o hospedeiro permite o conhecimento da natureza da patogenicidade, possibilitando o aumento na expressão de genes específicos relacionados à infectividade, diminuindo o tempo entre a aplicação do biopesticida e a morte do hospedeiro (St. Leger *et al.*, 1996c; Screen *et al.*, 2001; Hu & St. Leger, 2002).

Outro problema encontrado na utilização dos biocontroladores é a necessidade de condições ambientais favoráveis como temperatura, umidade e luminosidade para que sejam totalmente eficientes. Estudos, na área do melhoramento genético, têm sido realizados no sentido de melhorar a produção em massa, a estabilidade, a formulação e a aplicação de inóculos desses fungos (Alves, 1998; Hallworth & Magan, 1999; Hong *et al.*, 1999; Inglis *et al.*, 1999; Vänninen *et al.*, 2000; Arthurs & Thomaz, 2001; Pell *et al.*, 2001; Wraight *et al.*, 2001; Batta, 2003; Liu *et al.*, 2003; Shah & Pell, 2003; Kassa *et al.*, 2004).

Dentre os fungos utilizados no controle biológico destacam-se espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Entomophthora*, *Hirsutella*, *Nomurea*, *Sporothrix* e *Trichoderma*. Esses fungos apresentam uma ampla gama de hospedeiros, embora exista considerável diversidade genética dentro de espécies, demonstrando alto grau de especificidade (Milner, 2000; Shah & Pell, 2003).

M. anisopliae foi o primeiro microrganismo utilizado no controle biológico, testado para o controle de uma praga da beterraba (Alves, 1998). Seu habitat natural é o solo, no qual seu crescimento saprofítico ocorre geralmente sobre cadáveres de

hospedeiros. No entanto, sobrevive na forma de conídios dormentes que, em condições favoráveis, infectam hospedeiros suscetíveis por contato (Milner, 2000; Vänninen *et al.*, 2000).

O fungo *M. anisopliae* infecta mais de 300 espécies de artrópodes, em especial insetos e ácaros (Alves, 1998). Segundo esse autor, os principais projetos de controle de pragas envolvendo *M. anisopliae* no Brasil são o controle biológico das cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *Mahanarva frimbriolata*); das cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*), do cupim das pastagens (*Cornitermes cumulans*), do cupim da cana-de-açúcar (*Heterotermes* sp.), da broca da bananeira (*Cosmopolites sordidus*) e da broca dos citros (*Diploschema rotundicolle*). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para alguns vetores de doenças humanas, como o vetor da doença de Chagas (*Triatoma infestans*), da malária (*Anopheles gambiae*) e da filariose (*Culex quinquefasciatus*) (Juarez *et al.*, 2000; Scholte *et al.*, 2003). *M. anisopliae* é capaz de infectar carrapatos de diferentes gêneros e espécies (Kaaya *et al.*, 1996; Zhioua *et al.*, 1997; Correia *et al.*, 1998; Bittencourt *et al.*, 1999, 2003; Bittencourt, 2000; Samish & Rehacek, 1999; Milner *et al.*, 2000; Frazzon *et al.*, 2000; Kaaya, 2000; Costa *et al.*, 2001; Onofre *et al.*, 2001; Samish *et al.*, 2001; Benjamín *et al.*, 2002; Gindin *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2004; Kirkland *et al.*, 2004).

Vários inseticidas biológicos a base de *M. anisopliae* são comercializados em diferentes países como Bioblast[®], para o controle de cupins, Biostop[®] e MetaGuard[®], para a proteção de madeira contra cupins, Green-Muscle[®] e GreenGuard[™], para o controle de gafanhotos, BioGreen[™], para o controle de coleópteros de pastagens, BioCane[™], para o controle de coleópteros de cana-de-açúcar, e Tick-EX, para o tratamento contra carrapatos (Quarles, 1995; Cabi Bioscience, 1999; Milner, 2000; Kassa *et al.*, 2004, U.S. Environmental Protection Agency, 2006). No Brasil, existem formulações registradas como Metabiol[®], Biotech[®], Biomax[®], Metaquino[®] e Itaforte[®], utilizadas principalmente para o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar e das pastagens (Alves, 1998).

2.2. O fungo *M. anisopliae*

2.2.1. Aspectos gerais

M. anisopliae é um ascomiceto (Liu *et al.*, 2001) pertencente à classe Sordariomicete, ordem Hipocreales, família Clavicipitaceae (Roy *et al.*, 2006). Foi descrito pela primeira vez em 1878, por Metschnikoff, na Rússia, parasitando larvas do besouro do grão de trigo (*Anisopliae austriaca*; Alves, 1998). Tulloch (1976) revisou a taxonomia do gênero *Metarhizium* e, baseado em critérios morfológicos, manteve duas espécies: *Metarhizium flavoviride* e *M. anisopliae*; essa última apresentando duas variedades, *minus* e *majus*. Driver *et al.* (2000), com base em critérios morfológicos e moleculares, reconheceram três espécies para *Metarhizium*: *M. anisopliae*, variedades *anisopliae*, *majus*, *lepidiotum* e *acridum*; *M. flavoviride*, variedades *flavoviride*, *minus*, *novazealandicum*, *pemphigum* e Tipo E; e *M. álbum*; resultados que foram confirmados por Pantou *et al.* (2003).

Em seus aspectos morfológicos, *M. anisopliae* se apresenta como um fungo filamentoso de micélio hialino e septado, com conidióforos característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas. As suas formas de reprodução conhecidas compreendem a assexual, própria do desenvolvimento vegetativo da espécie, e a parassexual, caracterizada por fenômenos como heterocariose e a recombinação somática (Alves, 1998; Roberts & St. Leger, 2004).

O desenvolvimento vegetativo ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C (Driver *et al.*, 2000) e pH entre 2,0 e 8,5, sendo que a temperatura e pH ótimos são entre 24 e 30°C e 6,9, respectivamente. Existindo pouca exigência nutricional *in vitro*, podendo-se utilizar como fonte de carbono o amido, a glicose, a maltose, o glicerol, a sacarose e a quitina (Alves, 1998).

2.2.2. Mecanismo de infecção

A infecção no hospedeiro é iniciada pela produção dos conídios, produzidos assexuadamente pelo fungo, que se dispersam no ambiente. Em contato com a cutícula do hospedeiro suscetível, o conídio se fixa e germina o que dá início a uma cascata de reações de reconhecimento entre fungo e hospedeiro, pela ação de reações enzimáticas

entre ambos (Shah & Pell, 2003). O mecanismo de infecção de *M. anisopliae*, em seus hospedeiros, inicia pela germinação, seguido pela diferenciação, penetração, colonização, reprodução e se finaliza pela disseminação dos conídios (Schrank *et al.*, 1993; Alves, 1998).

O início do mecanismo de infecção se dá com a fixação dos conídios na cutícula do hospedeiro por interação hidrofóbica, intermediada pelas hidrofobinas presentes na parede celular do conídio (Bidochka *et al.*, 1997a). Enzimas como proteases e N-acetilglicosidases, lipases e outras esterases foram detectadas na superfície do conídio, as quais são capazes de adquirir nutrientes, causando modificações superficiais na camada mais externa da cutícula do hospedeiro (St. Leger *et al.*, 1990; Bidochka *et al.*, 1997a). O conídio germina formando o tubo germinativo, o qual se diferencia por dilatação da extremidade das hifas para a formação do apressório, uma estrutura especializada de penetração estimulada pelo contato físico com a cutícula do hospedeiro (St. Leger *et al.*, 1991b; Milner, 2000; Arruda *et al.*, 2005). Esse estímulo também é sensível às características da superfície, como dureza e grau de esclerotização, umidade e nutrientes, indicando um possível mecanismo pelo qual o patógeno reconhece seu hospedeiro (St. Leger *et al.*, 1990; Bidochka *et al.*, 1997a).

Logo após a formação do apressório, ocorre o desenvolvimento de estruturas denominadas grampos de penetração, que são caracterizadas por uma alteração na parede celular da região do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais fina e saliente (St. Leger *et al.*, 1991b; Clarkson & Charnley, 1996). Evidências, obtidas por microscopia eletrônica e histoquímica, sugerem que a etapa de penetração ocorre por uma combinação de pressão mecânica e degradação enzimática (Bittencourt *et al.*, 1999; Arruda *et al.*, 2005), na qual são produzidas enzimas como quitinases, proteases e lipases (Kucera, 1980; St. Leger *et al.*, 1986b, 1986b, 1988, 1991a; Pinto *et al.*, 1997; Alves, 1998; Barreto *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005). Em um período inferior a 24 horas após o início da formação do tubo germinativo, as proteases são detectadas antes das enzimas quitinolíticas. É sugerido que o aparecimento tardio das quitinases é, provavelmente, devido à indução pela quitina existente na cutícula dos artrópodes, que só é exposta ao fungo após a digestão das proteínas a ela complexadas (St. Leger *et al.*, 1986b). Os principais constituintes da cutícula de artrópodes são as proteínas (55-80%) e, desse modo, as proteases provavelmente têm o papel principal durante a sua degradação (St. Leger *et al.*, 1986c).

Ao final do processo de penetração, o fungo coloniza o hospedeiro. As hifas que atravessam a cutícula do hospedeiro sofrem um espessamento e se ramificam inicialmente na hemocele. Na hemolinfa, a qual é composta por água, carboidratos, proteínas e aminoácidos (Bidochka *et al.*, 1997b), ocorre a produção de metabólitos secundários como o ácido oxálico e ácido cítrico, e de toxinas fúngicas, denominadas destruxinas, que afetam os canais de transporte de íons envolvidos na resposta muscular e na integridade da membrana celular. O hospedeiro mostra sintomas como inquietação, perda da coordenação motora e parada da ingestão de alimento (Vey *et al.*, 2002). Embora suas propriedades inseticidas tenham sido demonstradas, a função das destruxinas na patogenicidade do fungo ainda não foi completamente entendida, (Kershaw *et al.*, 1999; Vey *et al.*, 2002).

Entre quatro e cinco dias depois da infecção ocorre a morte do hospedeiro e, dentro desse período as hifas se desenvolvem e invadem os diversos órgãos internos, hidrolisando e absorvendo nutrientes. Com o esgotamento desses, as hifas emergem do corpo do hospedeiro formando um micélio que cobre a superfície do tegumento, resultando na mumificação. Dependendo do hospedeiro e das condições ambientais, o tempo de colonização pode variar de 76 a 120 horas, que é finalizado pela produção de conídios de coloração verde oliva que poderão ser disseminados pelo vento para infectar outros indivíduos (Shah & Pell, 2003).

Clarkson & Charnley (1996) sugerem que a complexidade da cutícula dos artrópodes indica que a sua penetração requer a ação conjunta de várias enzimas. A cutícula é constituída por três camadas principais: a cutícula externa, a camada celular ou epiderme e a membrana basal. A cutícula externa é composta por duas camadas relativamente distintas: a epicutícula e a procutícula, as quais são consideradas a principal barreira de proteção dos artrópodes ao ataque de microrganismos. A epicutícula é a camada mais externa, de espessura delgada, estruturada por lipoproteínas e cadeias de ácidos graxos embebidas em um complexo de proteínas e polifenóis. A procutícula constitui a maior parte da cutícula e contém fibras de quitina embebidas em uma matriz protéica associada a lipídeos e quinonas, podendo apresentar composição variada em diferentes artrópodes e em diferentes regiões do corpo de um mesmo artrópode. Em várias partes do corpo do artrópode, a procutícula estratifica-se em uma região mais rígida e externa, a exocutícula; e em uma região mais flexível e interna, a endocutícula. A diferenciação da procutícula envolve um processo químico que ocorre após a muda, denominado esclerotização, durante a qual, moléculas individuais de

proteínas são ligadas por quinonas, criando placas rígidas do exoesqueleto. Essas ligações cruzadas de quinonas não ocorrem na presença de altas concentrações de proteínas elásticas, ou seja, na endocutícula (Andersen, 1979; Meyer, 2006). A cutícula pouco ou não esclerotizada apresenta alto conteúdo de proteína (que tende ser hidrofílica e ter ponto isoelétrico ácido) menor quantidade de lipídeos e quitina. A concentração de quitina e proteína (que tende a apresentar caráter hidrofóbico, e ponto isoelétrico alcalino e ser carregada positivamente em pH fisiológico) aumenta com o processo de desidratação e esclerotização (Schaefer *et al.*, 1987; Andersen *et al.*, 1995). A cutícula pouco ou não esclerotizada é mais suscetível à atividade proteolítica (Gillespie *et al.*, 1998). Minúsculas projeções, semelhantes a pêlos, as microtríqueas, cobrem a cutícula. Essas estruturas acelulares consistem de um sólido núcleo de exocutícula coberto por uma fina camada de epicutícula. Também são encontradas grandes cerdas, as macrotríqueas, produzidas por células epidermais especializadas e espinhos, projeções multicelulares do exoesqueleto contendo procutícula e epicutícula (Meyer, 2006).

2.3. Quitinases

A quitina é um dos componentes majoritários da cutícula dos artrópodes. Ela também está presente no exoesqueleto de crustáceos e na parede celular da maioria dos fungos (Cabib, 1987), sendo o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose. A quitina, nos artrópodes, existe como uma cadeia organizada de poli-N-acetilglicosamina, formando a cutícula e representando uma barreira potencial contra a invasão de patógenos (Andersen, 1979). Análises, por difração de raios X, revelaram que existem diferentes associações intercadeia entre as moléculas de quitina estabilizadas por pontes de hidrogênio, originando três diferentes formas: α -quitina, que consiste de cadeias antiparalelas de poli-NAcGlc; β -quitina, a qual se caracteriza pela presença de duas cadeias paralelas; e a γ -quitina, que apresenta duas cadeias paralelas e uma antiparalela. Na natureza, essas cadeias de distribuem de maneira que a α -quitina é encontrada na parede celular de fungos, as outras duas formas são encontradas em organismos aquáticos e em artrópodes (Patil *et al.*, 2000).

Além da disponibilização da quitina como nutriente, as quitinases fúngicas estão envolvidas na modificação da quitina estrutural constituinte da parede celular, composta

basicamente de quitina e glicanas, na liberação de conídios, na diferenciação e na morfogênese das hifas (Gooday *et al.*, 1992), além de estarem envolvidas na virulência durante o parasitismo de fungos fitopatogênicos, micopatogênicos e entomopatogênicos (Hassan & Charnley, 1989; Ulhoa & Peberdy, 1991, 1992; De La Cruz *et al.*, 1992; St. Leger *et al.*, 1998; Kishimoto *et al.*, 2002; Barreto *et al.*, 2004).

Coordenadamente induzidas pelos componentes de quitina que sincronicamente se apresentam na cutícula do hospedeiro, o fungo *M. anisopliae* produz vários tipos de enzimas com atividade quitinolítica, capazes de hidrolisar completamente a quitina em monômeros de N-acetilglicosamina (NAcGlc; St. Leger *et al.*, 1986a). As endoquitinases clivam aleatoriamente a quitina, gerando polímeros ou oligômeros de NacGlc, como a quitotetraose, a quitotriose e a di-acetilquitobiose (Sahai & Manocha, 1993). As exoquitinases são divididas dentro de duas subcategorias: as quitobiosidases (Harman *et al.*, 1993), que atuam liberando unidades de diacetilquitobiose a partir da extremidade não-redutora da quitina, e as 1,4- β -N-acetilglicosaminidases, que clivam oligômeros produzidos pela atividade de endoquitinases e quitobiosidases, liberando monômeros de NAcGlc (Sahai & Manocha, 1993).

As quitinases são produzidas em níveis basais nas estruturas de infecção e durante a fase inicial de penetração do fungo *M. anisopliae* na cutícula do hospedeiro, e em altos níveis em áreas de degradação proteolítica (St. Leger *et al.*, 1996b), sendo que a maior parte das quitinases produzidas pelo fungo é ácida e mais de uma isoenzima pode ser codificada por um mesmo gene (St. Leger *et al.*, 1996b).

Para *M. anisopliae* foram descritas quitinases com atividade de endoquitinase, com massas moleculares de 33 kDa, 43,5 kDa, 45 kDa e pIs de 5,4, 4,8 e 4,8, respectivamente; exoquitinase (N-acetilglicosaminidase), com massa molecular de 110 kDa e pI de 5,0 (St. Leger *et al.*, 1991a, 1996a); e duas quitinases de 30 kDa e 60 kDa com pIs de 5,4 e 5,0, ambas com atividades de endo e exoquitinase (Kang *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2005); porém, foram clonados apenas três genes que codificam quitinases de *M. anisopliae*. O gene *chit1*, isolado e caracterizado por Bogo *et al.* (1998), que codifica uma proteína madura de massa molecular de 42 kDa e pI 5,8, denominada CHIT42, caracterizada por ser uma endoquitinase que atua no processo de nutrição e no crescimento celular (Baratto *et al.*, 2003), sendo que também foi demonstrado que essa proteína não teve efeito sobre a virulência do fungo em *Manduca sexta* (Screen *et al.*, 2001); o gene *chi2*, isolado e caracterizado por Baratto *et al.* (2006), o qual codifica uma quitinase com massa molecular de 42 kDa e com um suposto pI de

4,8, do qual, os autores detectaram transcritos depois de 48 h de cultivo, quando quitina era a fonte de carbono, e depois de 72 h, transcritos também foram detectados em cultivos na presença de NAcGlc e cutícula de *B. microplus*, enquanto que não foram detectados na presença de glicose; e por fim o gene *chi3*, o qual codifica para uma proteína madura de 30 kDa e pI 5,4, denominada CHIT30, com atividades de exo e endoquitinase, encontrada *in vivo* durante o processo de penetração do fungo no carrapato *B. microplus* (Silva *et al.*, 2005).

A secreção de quitinases em *M. anisopliae* é controlada por um sistema de indução/repressão, na qual produtos de degradação de quitina, incluindo NAcGlc, servem como indutores. Desse modo, níveis basais são suficientes para iniciar a degradação da quitina e liberar indutores (St. Leger *et al.*, 1986a; Pinto *et al.*, 1997; Franceschini *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005). O pH também desempenha papel na regulação de quitinases, independente da presença de substrato indutor, quitinases ácidas somente são expressas em pH ácido (St. Leger *et al.*, 1998).

Foi sugerido que a penetração do fungo e posterior colonização do inseto seriam facilitadas por um complexo multienzimático, do qual fariam parte as quitinases, as quais provocariam a degradação da procutícula (Patil *et al.*, 2000). Porém, apesar dos estudos já realizados, pouco se sabe quanto aos tipos, a regulação, a localização, a secreção e a participação do complexo de quitinases secretado por *Metarhizium* no processo de infecção de hospedeiros.

2.4. Proteases

A cutícula dos artrópodes é composta principalmente de microfibras de quitina embebidas numa matriz protéica (Hepburn, 1985); portanto, enzimas proteolíticas atacam a cutícula antes das enzimas quitinolíticas desmascarando e expondo as microfibras de quitina (Smith *et al.*, 1981; Fukamizo & Kramer, 1985). A habilidade dos fungos entomopatogênicos de produzir enzimas extracelulares com atividade para hidrolisar os constituintes da cutícula de insetos foi primeiramente conhecida por Gabriel (1968), o qual demonstrou que certas espécies de entomopatógenos são capazes de produzir enzimas quitinolíticas, proteolíticas e lipolíticas.

Alta atividade proteolítica e ampla variedade de proteases e peptidases foram detectadas por St. Leger *et al.* (1987a, b, c) em filtrados de culturas de *M. anisopliae*

(linhagem ME1) suplementadas com cutícula de artrópodes, sugerindo um papel chave para esse tipo de enzima na penetração da cutícula.

Atualmente, sabe-se que *M. anisopliae* produz pelo menos 11 subtilisinas (Bagga *et al.*, 2004), mas somente duas tripsinas (Freimoser *et al.*, 2003).

Embora ainda não esteja claro qual protease é específica para que atividade, nem mesmo suas relações com a patogenicidade ou na procura por nutrientes, evidências confirmam que elas não são redundantes, ou seja, que cada uma tem o seu papel específico (Bagga *et al.*, 2004).

M. anisopliae secreta diversas proteases, sendo que as denominadas PR1 e PR2, foram primeiramente identificadas (St. Leger *et al.*, 1987a, c). PR1 corresponde a uma família de enzimas (Pr1A, Pr1B, Pr1C, Pr1D, Pr1E, Pr1F, Pr1G, Pr1H, Pr1I, Pr1J, Pr1K) com alta homologia à classe das subtilisinas das serino-proteases. A protease PR1A é a isoforma melhor caracterizada, capaz de hidrolisar vários tipos de substratos como elastina, caseína e cutícula de inseto (St. Leger *et al.*, 1987a). Essa protease tem participação marcante na penetração da cutícula do hospedeiro pelo fungo, e sua importância no processo de infecção foi sugerida pela sua alta concentração no sítio de penetração antes e durante a fase de hidrólise das proteínas da cutícula (St. Leger *et al.*, 1989). Foi demonstrado que inibidores e anticorpos específicos para PR1A limitaram a penetração do fungo na cutícula da lagarta do tabaco (*M. sexta*) e reduziram a infecção, indicando que a regulação da sua expressão pode determinar a patogenicidade do fungo (St. Leger *et al.*, 1988). PR1A foi classificada como uma protease quimoelastase do tipo subtilisina em função da sua ação sobre substrato para elastases e quimotripsinas e sítio ativo característico de subtilisinas, sendo caracterizada por ser uma proteína madura com massa molecular de 29 kDa e pI > 8 (St. Leger *et al.*, 1992). Seu gene, denominado *pr1A*, foi identificado sendo altamente regulado e somente expresso durante a fase de penetração (St. Leger *et al.*, 1992).

O grande número de isoenzimas do fungo pode sugerir desempenho em diferentes papéis na patogenicidade, na variedade de hospedeiros suscetíveis, na capacidade de adaptação para a sobrevivência em vários ambientes fora de hospedeiro. As isoformas da família PR1 de *M. anisopliae* são indistinguíveis em sua especificidade primária, mas apresentam diferenças na especificidade secundária ao substrato, nas propriedades de absorção à cutícula, na estabilidade alcalina e na expressão. Essas diferenças são conhecidas por causar mudança de comportamento funcional de proteases (Bagga *et al.*, 2004). Gillespie *et al.* (1998) correlacionaram a variação na

quantidade de enzimas proteolíticas, do tipo subtilisinas, produzidas por diferentes espécies de *Metarhizium* spp., em presença de cutícula de inseto, à habilidade das PR1s em hidrolisar diferentes tipos de cutícula, sendo que a indução dessas diferentes subtilisinas, é controlada por um sistema regulatório múltiplo que permite sua adaptação a diferentes hospedeiros, o que concorda com seu estilo de vida oportunista (Freimoser *et al.*, 2005).

As isoenzimas da família PR1 apresentaram variações em características como a massa molecular, que variou entre 35,1 a 57 kDa, e o pI, variando de 5,2 a 8,5; sendo que cada gene está representado por cópia única no genoma de *M. anisopliae*. Todas as isoformas apresentam região codificadora de peptídeo-sinal de 15 a 22 aminoácidos, contendo seqüência de secreção característica de fungos, com exceção da PR1H, indicando que é uma enzima endocelular. Em PR1E e PR1F, não foi encontrada a região do propeptídeo, que variou entre 60 a 80 aminoácidos nas demais isoenzimas. Os resíduos da tríade catalítica, característica das subtilisinas da família PR1, são completamente conservados (Bagga *et al.*, 2004).

As proteases PR1C e PR1H, por serem expressas em menos de duas horas após contato com cutícula de inseto e reprimidas em meios rico e mínimo, são proteínas de adaptação à cutícula de hospedeiro. Enquanto, PR1G, sob as mesmas condições, não foi expressa em presença de cutícula de inseto e sim em meio mínimo. PR1J foi expressa na presença de cutículas de *M. sexta*, de borboletas da espécie *Lymantria dispar* e de baratas da espécie *Blaberus giganteus*, mas não foi expressa na presença de cutícula do besouro *Popilla japonica*. As demais isoformas de PR1 foram diferentemente reguladas conforme o meio de cultivo do fungo e o tempo de análise. PR1A e PR1B apresentaram expressão basal em meio mínimo e o aumento da sua produção em meio suplementado com cutícula (Freimoser *et al.*, 2005).

A classe de endoproteases PR2, detectada no cultivo *in vitro* de *M. anisopliae* em cutículas de insetos, pertence às serino-proteases relacionadas com tripsinas. PR2 apresenta capacidade de degradar caseína e albumina, mas não elastina. Como PR1, PR2 é uma protease alcalina com preferência a substratos peptídicos de cadeia longa, sendo seu pH ótimo 9.0 (St. Leger *et al.*, 1987a).

Segundo estudos de regulação, a produção de PR2 e PR1 é muito semelhante, sendo controladas pela desrepressão de fonte de carbono e nitrogênio, produzidas de forma basal, mas reprimíveis pela presença de metabólicos facilmente utilizáveis. Entretanto, a regulação não é idêntica, pois níveis basais de PR2 são produzidos em

meio mínimo, sob condições de desrepressão, sua indução acontece tanto por proteínas insolúveis como solúveis de uma ampla gama de substratos protéicos; e, encontra-se quantidade menor de PR2 no exterior da célula e muito maior no interior (St. Leger *et al.*, 1988; Paterson *et al.*, 1993, 1994a, b; Samuels & Paterson, 1995).

A secreção de PR2 de *M. anisopliae* no início da germinação dos conídios ocorre para fornecer nutrientes e ativar proteínas que se encontram na forma de zimogênio no conídio. Segundo Samuels & Paterson (1995), a formação de estruturas de infecção do fungo foram reprimidas pelo tratamento com inibidores de PR2, a qual pode estar envolvida no mecanismo de controle celular, catalisando processos de ativação e inativação proteolítica específica e estar menos sujeita aos efeitos da repressão catabólica que PR1 (St. Leger *et al.*, 1987c, 1988). Frações semipurificadas de cutícula de inseto digerida por PR2 são capazes e suficientes para induzir atividade de PR1A quando adicionadas *in vitro* ao micélio de *M. anisopliae* (Paterson *et al.*, 1994b). Além disso, PR1 é produzida como uma proenzima, requerendo processamento para ser ativada, e PR2 pode ter papel na sua ativação (Smithson *et al.*, 1995).

Em cultura de *M. anisopliae*, foi detectada, na presença de cutícula de barata, a produção de três isoenzimas de PR2, com pIs de 4,4, 4,9 e pI 5,2 (St. Leger *et al.*, 1994a). Estudos de localização ultraestrutural das isoformas de pI 4,4, de massa molecular de 30 kDa, e pI 4,9, com massa molecular de 27 kDa, mostraram que ambas são secretadas pelas estruturas de infecção (apressório) na superfície da cutícula, sugerindo que essas enzimas estão disponíveis durante os estágios iniciais da colonização; e na parede celular do fungo durante a penetração da hifa na cutícula do hospedeiro, inativando e/ou protegendo enzimas. Seu papel no suporte e no transporte de enzimas que degradam cutícula até o seu alvo é sugerido por sua presença na mucilagem extracelular. A marcação intracelular foi esparsa (St. Leger *et al.*, 1996a). Ambas isoformas de PR2 são expressas de forma similar durante o crescimento do fungo, na cutícula do hospedeiro, sugerindo que qualquer papel biológico específico tenha origem nas suas diferenças de especificidade ao substrato. A protease PR2 de pI 4,4 hidrolisa aminoácidos carregados positivamente, preferencialmente Arg, enquanto a PR2 de pI 4,9 prefere Lys. A isoforma de pI 4,4 apresenta baixa atividade contra proteínas insolúveis de cutícula, quando comparada com proteases PR1, e degrada muitas proteínas solúveis de *M. sexta*, preferindo as alcalinas de alta massa molecular (St. Leger *et al.*, 1996a).

De outros fungos filamentosos como *Aspergillus flavus*, *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Nomurea rileyi*, *Aschersonia aleyrodris*, *Entomophthora coronata*, *Trichoderma harzianum*, *Laganidium giganteum*, *Paecilomyces farinosus* e *Arthrobotrys oligospora*, entre outros, também têm sido isoladas proteases com propriedades similares às pertencentes às famílias PR1 e PR2 (Samuels & Paterson, 1995; Segers *et al.*, 1995; Clarkson & Charnley, 1996; Åhman *et al.*, 2002).

Uma terceira classe de proteases, denominada PR3, produzida por isolados de *Metarhizium*, foi identificada em filtrado de cultura de cinco dias, na presença de cutícula de inseto, a qual demonstrou sensibilidade a inibidores de tripsina. Seu pH ótimo varia entre 5,0 e 5,5 e sua contribuição na proteólise de cutícula de hospedeiro correspondeu a 36% da atividade total. Apesar de ter sido descrita, PR3 não foi caracterizada (St. Leger *et al.*, 1987a, c).

Uma cisteíno-protease com atividade de degradar cutícula de hospedeiro foi identificada em filtrados de cultura de *M. anisopliae*, sendo denominada PR4, a qual apresenta pI de 4,6, massa molecular de 27 kDa e pH ótimo de 8,0. Ela demonstrou preferência a substrato específico de tripsinas ao mesmo tempo que nenhuma atividade contra substrato de quimotripsinas ou elastases. Estudos com inibidores e promotores de atividade demonstraram que seu sítio ativo apresenta topografia semelhante às tripsinas; no entanto, PR4 foi suscetível aos inibidores de cisteíno-proteases, sendo assim classificada. PR2 exibiu 21% ao passo que PR4 exibiu 51% da atividade de PR1, a qual permaneceu sendo a mais efetiva contra cutícula (Cole *et al.*, 1993).

PR4, a qual não é produzida sob as mesmas condições que PR1 e PR2, foi purificada de uma cultura de cutícula de seis dias, com pouca atividade detectada a partir do terceiro dia, o que implica que PR4 pode ser produzida na fase final do processo de infecção. A combinação de PR1, PR2 e PR4 parece ser um arsenal que habilita o fungo a degradar uma ampla gama de substratos protéicos, que agindo sobre a cutícula libera muitos peptídeos ricos em Ala e Pro, que podem ser excelentes substratos para exopeptidases. A ação sinérgica de endo e exopeptidases pode resultar na hidrólise completa da cutícula do hospedeiro pelo fungo *M. anisopliae* (Samuels & Paterson, 1995). Exopeptidases foram detectadas em filtrado de cultura do fungo, cultivado em presença de cutícula, antes das 24 horas de cultivo e aumentam rapidamente após 48 horas (St. Leger *et al.*, 1986a).

Uma aminopeptidase, com pI 4,5, massa molecular 45 kDa e pH ótimo de 7,0; e uma prolil-dipeptidilpeptidase, com pI 4,0, massa molecular 74 kDa e pH ótimo de 8,0; foram caracterizadas a partir do cultivo *in vitro* de *M. anisopliae* na presença de cutícula de inseto. A dipeptidilpeptidase foi secretada em altos níveis durante o cultivo do fungo em caseína, entretanto a produção de ambas é reprimida por fontes de nitrogênio facilmente utilizáveis (St. Leger *et al.*, 1993).

St. Leger *et al.* (1994b) identificaram uma carboxipeptidase produzida por *M. anisopliae* durante o cultivo do fungo em cutícula de inseto. A proteína se caracteriza por ser uma serino-carboxipeptidase de 29 kDa, ter pI 9,9 e pH ótimo 6,8. Na solubilização das proteínas da cutícula, o aumento da produção de endoproteases e carboxipeptidases durante a desrepressão de carbono e nitrogênio e a indução pela cutícula de inseto indicam que a carboxipeptidase atua após PR1, PR2 e PR4.

Uma metaloproteinase foi caracterizada por St. Leger *et al.* (1994a) como uma metaloenzima neutra contendo zinco e semelhante à termolisina, com pI estimado de 7,3. A enzima é ativa contra substrato específico de PR1, e não é tão abundante quanto as serino-proteases, sendo sugerido que a metaloproteinase de *M. anisopliae* atue como um sistema de apoio no caso das serino-proteases serem inibidas.

Durante a busca de genes envolvidos na patogenicidade de *M. anisopliae*, Joshi & St. Leger (1999) clonaram e expressaram a primeira metalocarboxipeptidase isolada de fungos, a qual foi denominada MeCPA, para a qual, em análise por *Southern blot*, foi identificado que o gene está presente no genoma do fungo em cópia única. A massa molecular para a proteína madura foi de 35 kDa. Foi sugerida para a enzima uma função na identificação de nutrientes durante a digestão protéica, devido à alta expressão em presença de cutícula de inseto e outras proteínas como fonte de carbono e nitrogênio.

Foi relatada a identificação de uma quimotripsina em *M. anisopliae*, CHY1 (Screen & St. Leger, 2000) caracterizada por ser uma proteína madura com massa molecular de 18 kDa, sendo similar às quimotripsinas de bactérias. A região promotora do gene, correspondente à proteína, apresentou sítios de regulação em resposta a desrepressão de carbono e nitrogênio e ao pH.

Smithson *et al.* (1995) clonaram o gene *try1* de *M. anisopliae* que codifica uma serino-protease do tipo tripsina, denominada TRY1, caracterizada como uma proteína madura de 23 kDa e pI 5,26. A análise por *Southern blot* indicou que o gene estaria presente no genoma do fungo em cópia única.

Fatos concretos para a existência de uma grande variedade de enzimas proteolíticas para *M. anisopliae* ainda não são palpáveis. A grande lacuna existente na determinação das diferentes funções, condizentes com a natureza saprofítica de *M. anisopliae*, que as mais variadas enzimas desempenham na patogênese, na adaptabilidade a diversos hospedeiros, na sobrevivência do fungo em outros habitats, ainda está para ser preenchida (Screen & St. Leger, 2000).

2.5. Os artrópodes praga

2.5.1. O percevejo *D. peruvianus*

Dysdercus peruvianus (Guérin-Méneville, 1831; Hemiptera: Pyrrhocoridae) é um inseto praga das culturas de algodão (*Gossypium* spp.), popularmente conhecido por percevejo-manchador, o qual suja as fibras do algodão causando perdas na qualidade do produto, além de ser vetor de bactérias e fungos fitopatogênicos, e assim, conseqüentemente, gerando prejuízos econômicos nas plantações de algodão (Gallo *et al.*, 1988).

Os percevejos do algodoeiro passaram despercebidos por muito tempo, pois eram controlados simultaneamente com a aplicação de inseticidas para eliminar as principais lagartas dessa cultura, o curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea*), a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*) e a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) (Gallo *et al.*, 1988). Com a adoção de técnicas de Manejo de Pragas no algodoeiro, reduzindo-se a aplicação de agroquímicos, os percevejos manchador e rajado passaram a ocorrer com frequência, causando, algumas vezes, prejuízos consideráveis, especialmente pelo desconhecimento da sua bio-ecologia. No caso de *Dysdercus*, tais prejuízos relacionam-se à perda de peso da semente e redução do teor de óleo, além dos danos indiretos, pela transmissão de microrganismos patogênicos e, principalmente, por mancharem as fibras do algodão (Brisolla *et al.*, 1992). Verificada a ocorrência desses insetos na lavoura, o controle ocorre, normalmente, por pulverização das lavouras com produtos químicos registrados para seu controle (Schetino, 2005).

2.5.2. O carrapato *B. microplus*

B. microplus (Canestrini, 1887; Acari: Ixodidae), conhecido como o carrapato do gado, é encontrado particularmente no gado bovino, mas também em outros mamíferos que podem ser usados como hospedeiros alternativos (Gonzales, 1975). No Brasil, o impacto econômico causado pelo parasitismo do *B. microplus* alcança dois milhões de dólares por ano (Grisi *et al.*, 2002). Os maiores prejuízos causados pelo carrapato se devem a sua habilidade em transmitir protozooses e viroses, além de inviabilizar o aproveitamento do couro em 80%.

O controle de carrapatos é baseado primeiramente no uso de produtos químicos, mas linhagens resistentes devem surgir independentemente do desenvolvimento de novos acaricidas químicos (Wharton, 1967). Atualmente, métodos de controle de linhagens resistentes são baseados no uso de *overdoses* de produto químico, do qual a linhagem tenha se tornado resistente, ou na substituição do acaricida (Furlong & Martins, 2000). Com o objetivo de estabelecer estratégias de controle mais racionais e eficientes, diversos estudos têm sido realizados no uso de patógenos como controladores biológicos de parasitas. Fungos entomopatogênicos são importantes inimigos naturais de artrópodes e podem ser usados como controladores biológicos (Bittencourt, 1999; Chandler *et al.*, 2000). *M. anisopliae* tem sido considerado um dos mais promissores agentes para o controle biológico de carrapatos (Bittencourt *et al.*, 1994; Bittencourt, 1999; Samish & Rehacek, 1999; Frazzon *et al.*, 2000; Paião *et al.*, 2001; Prette *et al.*, 2005).

2.5.3. A lagarta *A. gemmatalis*

A larva de *A. gemmatalis* (Hübner, 1818; Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta da soja, é uma das principais pragas que ataca a cultura de soja, sendo economicamente importante em função das grandes perdas que ocasiona a esta lavoura (Gallo *et al.*, 2002).

Durante todo o seu ciclo, a cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas. Insetos, principalmente em seu estágio larval, podem atacar as plântulas e posteriormente atacar a planta durante a fase vegetativa e em alguns casos, até a floração. Com o início da fase reprodutiva da planta, insetos surgem e podem causar

danos desde a formação das vagens até o final do desenvolvimento das sementes. Assim, os insetos representam um importante fator que afeta a planta e a semente, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, caso não seja efetuado nenhum tratamento para o controle dessa população, que poderá tornar-se excessiva e causar perdas significativas no rendimento da cultura (Turnipseed & Kogan, 1987).

Dentre as pragas da soja, a lagarta da soja, *A. gemmatalis* destaca-se como o principal inseto desfolheador, podendo causar diminuição significativa na produção (Gallo *et al.*, 2002). Os principais danos causados à cultura da soja ocorrem na fase larval de *A. gemmatalis*, que pode durar até 25 dias (Barbara, 2000), período no qual as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja e causam prejuízos consideráveis à medida que crescem. Comem tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100% de desfolhamento até atingir o seu desenvolvimento máximo, para tornar-se pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm² de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24h (Gallo *et al.*, 2002).

Dentre os métodos de controle biológico da lagarta da soja, destacam-se o uso de produtos à base de vírus, principalmente os baculovírus (Souza *et al.*, 2002). Porém, o início do processo de infecção é dependente da ingestão do vírus pelo inseto.

3. OBJETIVO GERAL

Analisar a diferenciação na secreção de enzimas, especialmente de quitinases e proteases, de uma linhagem selvagem de *M. anisopliae*, cultivado em presença de cutículas de *Dysdercus peruvianus*, *Boophilus microplus*, *Anticarsia gemmatalis* e de quitina cristalina.

Objetivos específicos

- ❖ Induzir a secreção de quitinases e proteases em *M. anisopliae* durante cultivo líquido em meio mínimo em presença de cutículas de *D. peruvianus*, ou *B. microplus*, ou *A. gemmatalis*, ou quitina cristalina, ou glicose até 72h.
- ❖ Inferir na suposta presença, por ensaios enzimáticos, das diferentes quitinases secretadas, e quantificar as proteases.
- ❖ Sugerir, a partir dos dados de zimograma, a presença das proteases secretadas nas diferentes condições de cultivo do fungo.
- ❖ Diferenciar as proteínas secretadas nos diferentes cultivos por eletroforese uni- e bi-dimensional.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagem utilizada, cultivo e manutenção de *M. anisopliae*

Foi utilizada a linhagem E6S2 do fungo filamentosso *M. anisopliae* var. *anisopliae* (METSCH) SOROKIN, isolada de *Deios flavopicta* (Homóptera, Cercopidea) no Espírito Santo, gentilmente cedida pelo professor João Lúcio de Azevedo (Coleção da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – ESALQ – USP).

O cultivo e a manutenção do fungo foram realizados em Meio Cove completo (MCc) (nitrate de sódio 0,6%; glicose 1%; extrato de levedura 0,05%; peptona 0,2%; Agar 1,5%; pH 6,0), com adição, após autoclavado, de 2% de Solução de Sais (KCl 2,6%; MgSO₄ 2,6%; KH₂PO₄ 7,6% (p/v)) e 0,04% de Solução de Elementos Traços (Na₂B₄O₇ 0,004%; CuSO₄ 0,04%; FeSO₄ 0,001%; MgSO₄ 0,08% e ZnSO₄ 0,08% (p/v)) previamente preparadas e autoclavadas a 120°C durante 15 min. As culturas foram incubadas em estufa a 28°C por até vinte dias.

4.2. Suspensão de esporos de *M. anisopliae*

A suspensão de conídios foi preparada a partir de culturas esporuladas em meio MCc em placas de Petri incubadas a 28°C por 15 – 20 dias. Os conídios foram coletados em, aproximadamente, 1 mL de solução 0,01% (v/v) Tween 80 autoclavada, com auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão obtida foi centrifugada por 30 min a 5000 rpm (centrífuga CENTRA MP4 *International Equipment Company*). O sobrenadante da centrifugação foi descartado e os conídios foram lavados com 10 mL de água destilada autoclavada, passando por nova centrifugação por 15 min a 5000 rpm. Os conídios foram ressuspensos em, aproximadamente, 2 mL de água destilada autoclavada, contados em câmara de Neubauer, e sua contaminação testada por incubação em meio LB líquido comercial (*Sigma*) 2% a 28°C *overnight*. As suspensões de conídios foram estocadas a 4°C até o uso, por no máximo uma semana.

4.3. Condições de cultivo de *M. anisopliae* para a indução de quitinases e proteases

M. anisopliae foi cultivado em Erlenmeyers de 500 mL, em 100 mL de Meio Mínimo, MM (NaNO₃ 0,6%; KH₂PO₄ 0,05%; MgSO₄ 0,05%, pH 6,5) em presença de cutícula de *D. peruvianus*, ou *B. microplus*, ou *A. gemmatalis*, ou quitina cristalina (*Sigma*) a 0,8%, e como controle foi utilizado o mesmo meio acrescido de 1% de glicose, como única fonte de carbono. Após a esterilização em autoclave por 15 min, foram adicionadas 2% de Solução de Sais e 0,04% de Solução de Elementos Traços (descritos no item 4.1). O inóculo foi de 10⁶ esporos/mL e a incubação foi de 24, 48 e 72 h com agitação de 120 rpm a 28°C. As culturas foram filtradas a vácuo em papel filtro Whatman n.º 1 para separar o sobrenadante da cultura do micélio do fungo. Tanto o micélio quanto o sobrenadante foram armazenados a -20°C.

4.4. Preparação de cutículas de *D. peruvianus*

Indivíduos adultos vivos foram obtidos junto à criação de insetos da Professora Célia Carlini no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Primeiramente, os insetos foram imobilizados a frio a -20°C por no mínimo 2 h, e então dissecados um a um, com o auxílio de lupa e instrumentos cirúrgicos, sendo que, apenas a parte da cutícula que revestia tórax e abdômen foi aproveitada nos experimentos. Posteriormente, as carcaças foram triplamente lavadas com água em abundância e secas em temperatura ambiente. O armazenamento se deu a -20°C até que fossem utilizadas.

4.5. Preparação de cutículas de *B. microplus*

Fêmeas ingurgitadas do carrapato *B. microplus* congeladas, com o auxílio de uma tesoura, foram cortadas em duas partes e, ambas exaustivamente lavadas em água corrente, e posteriormente autoclavadas a 120°C durante 15 min e armazenadas. Antes da preparação do meio de cultivo, as cutículas foram secas em estufa a 50°C por 2 h ou até que ficassem secas.

4.6. Preparação de cutículas de *A. gemmatalis*

Lagartas de último instar vivas foram obtidas junto à criação de insetos da Professora Neiva Monteiro de Barros no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Primeiramente, os insetos foram resfriados a -20°C por no mínimo 2 h, e então dissecadas com o auxílio de pinça e bisturi, sendo que, a cabeça foi descartada e o corpo esmagado a fim de que o conteúdo fosse expelido. Posteriormente, as carcaças foram exaustivamente lavadas com água em abundância, autoclavadas a 120°C durante 15 min e secas em estufa a 50°C por 2 h ou até que ficassem secas. O armazenamento se deu a -20°C até que fossem utilizadas.

4.7. Quantificação de proteínas totais

Para quantificar as proteínas secretadas no meio de cultivo líquido foi utilizado o método de Bradford (1976). Utilizando-se microplaca de 96 poços, a cada 40 μL de reagente de Bradford (BioRad) concentrado foram adicionados e misturados 160 μL de amostra e procedida a leitura, a 595 nm entre 5 a 30 min após a mistura, em espectrofotômetro *Spectramax*. A curva padrão foi feita com albumina sérica bovina (BSA) numa concentração que variou de 2 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.8. Detecção de atividade enzimática quitinolítica

A atividade enzimática quitinolítica foi determinada pela quantificação de 4-metilumbeliferona (4-MU) formada a partir da degradação dos substratos sintéticos fluorescentes 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosamina (dímero), 4-metilumbeliferil- β -D-NN-diacetilquitobiose (trímero), 4-metilumbeliferil- β -D-NNN-triacetilquitotriose (tetramero) (*Sigma*) pela ação de quitinases. O protocolo dos ensaios enzimáticos foi utilizado conforme McCreath & Gooday (1992) com modificações. Fazendo uso de microplaca apropriada para fluorímetro, com 96 poços, para cada amostra foram micropipetados 95 μL de Tampão McIlvaine pH 6,0 (Ácido cítrico 0,1 M + Na_2HPO_4 0,1 M até o pH chegar a 6.0) e 5 μL de substrato 0,8 mM, seguido de incubação a 37°C por 5 min. A seguir, foram adicionados 10 μL de amostra e a reação foi incubada a 37°C por 30 min e interrompida pela adição de 100 μL de Tampão 1 M glicina/NaOH

pH 10,6, seguida por incubação a 37°C por 5 min. No controle, foi utilizada água no lugar da amostra. A leitura foi realizada em fluorímetro com excitação de 355 nm e emissão de 460 nm. Uma unidade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μ mol de 4-MU por minuto a 37°C. A curva padrão foi realizada com 4-MU numa concentração que variou de 0,1 a 4 μ molar.

4.9. Detecção de atividade enzimática proteolítica

A atividade proteolítica total foi detectada em ensaio enzimático conforme Busconi *et al.* (1984), utilizando-se como substrato a azocaseína (*Sigma*). A mistura de reação, inclusive os brancos, continha 200 μ L de Tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,9, 100 μ L de azocaseína 2%, 800 μ L de TCA aquoso 20% somente nos brancos e 100 μ L de amostra. A mistura foi incubada a 50°C por 15 min, e a seguir, foram adicionados 800 μ L de TCA aquoso 20% às amostras, exceto nos brancos, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. A absorbância do sobrenadante da reação foi determinada por espectrofotometria a 400 nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como os valores de absorbância detectados multiplicados por 40 correspondendo a $1U = A_{400}/\text{mL}/\text{hora}$. (Sangorrin *et al.*, 2001).

4.10. Preparação da amostra para SDS-PAGE

As proteínas dos sobrenadantes de cultura foram precipitadas utilizando-se ácido tricloroacético (TCA) em acetona para análise em SDS-PAGE. Para cada volume de amostra, correspondente à determinada quantidade de proteína requerida, foi adicionado TCA 20% numa proporção de 1:1 (v/v), seguido de incubação a 4°C por 16 horas. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo as proteínas, foi lavado 2 vezes com acetona gelada, por centrifugação, a 13.000 rpm por 15 min. Após o descarte da acetona e a evaporação total da mesma, cerca de 5 min, o sedimento protéico foi ressuscitado em 15 μ L de água Milli-Q e 10 μ L de tampão amostra (Tris-HCl 0,05 M pH 6,8; SDS 2% (p/v); β -mercaptoetanol 4% (v/v); glicerol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,01% (p/v)), incubado a 100°C por 3 min e aplicado no gel.

4.11. SDS-PAGE

As proteínas preparadas, segundo o item 4.10, foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida, segundo Laemmli (1970). A solução do gel separador a 11% foi composta por Tris-HCl 375 mM pH 8,8; SDS 0,1%; acrilamida-bisacrilamida 11% (29:1 p/v); TEMED 0,05% (v/v); persulfato de amônio 0,05% (p/v) e, a solução de gel concentrador a 4%: Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 0,1%; acrilamida-bisacrilamida 4% (29:1 p/v); TEMED 0,05% (v/v); persulfato de amônio 0,05% (p/v). Após a polimerização, o sistema foi montado em uma cuba (*Mini Protean II BioRad*) preenchida com tampão de corrida 1x (Tris base 0,18% (p/v); glicina 0,864% (p/v); SDS 0,06% (p/v)). Logo após a eletroforese, a qual ocorreu numa voltagem de 150V por um tempo aproximado de 2 horas, as proteínas foram coradas com Coomassie coloidal (Coomassie Brilliant Blue – G250 0,05% (p/v); sulfato de amônio 10% (p/v); metanol 20% (v/v); ácido fosfórico 2 %) por 16 horas, seguido por lavagem em água destilada.

4.12. Zimograma em gelatina

O gel para de detecção de atividade proteolítica foi preparado de acordo com o protocolo descrito por St. Leger *et al.* (1996a), utilizando-se como substrato 0,02% de gelatina.

A solução do gel separador 15% continha Tris-HCl 225 mM pH 8,8; SDS 0,1%; acrilamida-bisacrilamida 15% (29:1 p/v); gelatina 0,02%, TEMED 0,05% (v/v); persulfato de amônio 0,05% (p/v) e, a solução de gel concentrador a 4%: Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 0,1%; acrilamida-bisacrilamida 4% (29:1 p/v); TEMED 0,05% (v/v); persulfato de amônio 0,05% (p/v). Após a polimerização, o sistema foi montado em uma cuba (*Mini Protean II BioRad*) preenchida com tampão de corrida 1x (Tris base 0,18% (p/v); glicina 0,864% (p/v); SDS 0,06% (p/v)). As amostras foram aplicadas no gel em seu estado bruto, porém acrescidas de H₂O Milli-Q, para completar o volume de 20 µL, e de 7 µL de tampão amostra (Tris-HCl 0,05 M pH 6,8; SDS 2% (p/v); glicerol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,01% (p/v)). Logo após a eletroforese, a qual ocorreu numa voltagem de 150 V por um tempo aproximado de 3 horas, sendo que após a saída do corante sinalizador do gel, cronometrou-se mais 75 min de migração, o gel foi

gentilmente agitado por 1 h a 30°C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 / Triton X-100 2,5% e corado com Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue – R250 0,25% (p/v); metanol: água (1:1) (v/v) 90% / ácido acético glacial 10 %) por 16 horas, seguido por lavagem em água destilada para retirar o excesso de corante. As regiões com hidrólise de gelatina foram visualizadas pela não coloração dessas áreas devido à hidrólise do substrato.

4.13. Eletroforese Bi-Dimensional

Para essa etapa, as proteínas foram preparadas conforme anteriormente descritas no item 4.10; porém, primeiramente, os sobrenadantes das amostras foram dialisados a 4°C contra água destilada num total de 3 trocas de água a cada 4 h.

A focalização isoeletrica foi realizada no focalizador *Protean IEF Cell* (*Bio-Rad*), no qual foram utilizadas tiras com pH imobilizado (pH 5 – 8, 18 cm, *Bio-Rad*) hidratadas por 16 h com 400 µg de proteína solubilizadas em tampão (uréia 7 M, Tiouréia 2 M, CHAPS 4%, DTT 1%, anfólito 0,2%). A focalização iniciou a 250 V por 15 min, seguido por 10.000 V até quase atingir uma taxa de 50.000 V/H (5 h aproximadamente). Posteriormente, as tiras foram equilibradas com tampão (uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, Tris pH 8,8 0,375 M e azul de bromofenol 0,002%); primeiramente 15 min contendo 130 mM DTT, seguido por 15 min contendo 135 mM iodoacetoamida. As tiras foram colocadas junto ao gel 12% de poliacrilamida (20 x 20 cm). A solução do gel separador a 12% foi composto por Tris-HCl 375 mM pH 8,8; SDS 0,1%; acrilamida-bisacrilamida 12% (29:1 p/v); TEMED 0,05% (v/v); persulfato de amônio 0,05% (p/v) e, a solução de gel concentrador a 4%: Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 0,1%; acrilamida-bisacrilamida 4% (29:1 p/v); TEMED 0,05% (v/v); persulfato de amônio 0,05% (p/v). Após a polimerização, o sistema foi montado em uma cuba *PROTEAN II xi Cell* (*Bio-Rad*) preenchida com tampão de corrida 1x (Tris base 0,18% (p/v); glicina 0,864% (p/v); SDS 0,06% (p/v)). A eletroforese ocorreu, primeiramente, a 40 mA (até que a amostra passasse da porção concentradora para a separadora) passando a assumir 50 mA por um tempo aproximado de 3 – 6 horas, e por fim, as proteínas foram coradas com Coomassie coloidal (descrito no item 4.11) e coloração por Nitrato de prata, na qual os géis ficaram incubados em solução de fixação (50% metanol e 5% ácido acético) por no mínimo 1 h, seguindo uma lavagem com 50%

metanol por 20 min com leve agitação, outra lavagem com H₂O Milli-Q por 20 min, sensibilização com 0,02% tiosulfato de sódio por 5 min, duas lavagens de 2 min cada com H₂O Milli-Q, incubação em 0,1% nitrato de prata por 40 min a 4°C, duas lavagens de 10 s cada com H₂O Milli-Q, e finalmente revelou-se a coloração com 2% carbonato de sódio acrescido, no momento, de 0,04% formaldeído. A reação foi interrompida retirando-se a solução anterior e lavando-se o gel com solução 1% ácido acético.

O programa ImageMaster™ 2D Platinum 6.01 (*GeneralEletrics*) foi utilizado para a análise dos géis 2D.

5. RESULTADOS

No presente estudo, foram analisadas a secreção de quitinases e proteases utilizando diferentes experimentos, nos quais o fungo *M. anisopliae* foi cultivado em presença de cutículas de diferentes artrópodes, avaliando-se quantitativamente e qualitativamente a secreção de proteínas totais e as atividades das enzimas no sobrenadante das culturas.

5.1. Análise da secreção de proteínas totais

A secreção de proteínas totais aumentou progressivamente com o tempo, demonstrando o desenvolvimento do fungo em todos os cultivos. A análise quantitativa das proteínas totais secretadas no sobrenadante dos diferentes cultivos de *M. anisopliae* revelou diferenças marcantes em relação ao substrato utilizado no meio de cultura (Figura 1). Quando cutícula de *D. peruvianus* foi utilizada nos meios de cultivo, em todos os tempos ocorreu uma maior secreção de proteínas comparada aos outros cultivos com cutículas dos outros artrópodes, quitina cristalina ou glicose. O meio de cultivo com glicose foi o que induziu a menor secreção de proteínas totais (Figura 1).

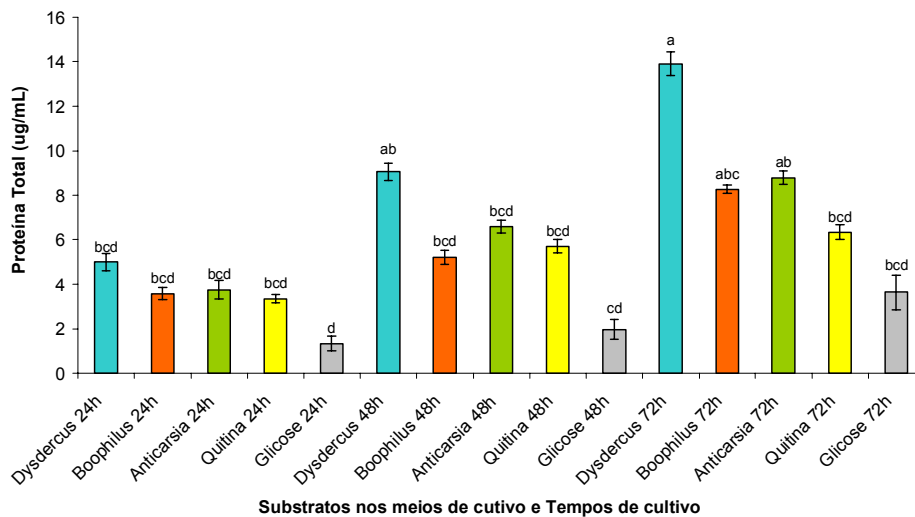


Figura 1: Secreção de proteínas totais por *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. Foram coletadas e analisadas alíquotas de cada uma das culturas do primeiro ao terceiro dia de cultivo. As proteínas totais foram determinadas em triplicatas. As barras, acima das colunas, indicam o desvio padrão. Colunas seguidas por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

A análise das amostras em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostra, claramente, a expressão diferencial de proteínas entre as diversas condições de fonte de carbono e tempo de cultivo (Figura 2), sendo que foram aplicadas, num gel 11%, 60 µg de proteína de cada amostra, precipitadas a partir de volumes diferentes de cada cultivo. As setas vermelhas indicam as grandes diferenças quantitativas e qualitativas nas proteínas expressas nas diferentes condições. Cabe salientar as proteínas, de tamanho aproximado de 50 e 45 kDa, altamente secretadas na presença de quitina cristalina em 72 h de cultivo, perfil que se apresenta muito diverso dos perfis apresentados pelas amostras dos cultivos na presença de *D. peruvianus*, *B. microplus* ou *A. gemmatalis*. Outro destaque fica com a proteína de tamanho aproximado de 30 kDa, secretada na presença de *D. peruvianus* em 72 h de cultivo, a qual é muito mais expressa nessa condição do que nas outras; outra proteína é a de tamanho aproximado de 22 kDa, presente em *A. gemmatalis*, em 24 e 72 h de cultivo (canaletas 5 e 6 Figura 2), também presente em *B. microplus* em 72 h de cultivo, mas ausente em quitina cristalina (canaletas 7 e 8 Figura 2); outro exemplo, é a proteína de tamanho aproximado de 20 kDa, que está presente, praticamente, em todos os tempos, porém é muito mais expressa na presença de quitina cristalina em 72 h de cultivo. O cultivo líquido em glicose não apresentou quantidade de proteína suficiente para constar nesse experimento (Figura 2).

Nos géis bidimensionais, *M. anisopliae* se mostrou ainda mais versátil no que diz respeito à variação e quantidade de proteínas secretadas frente aos diferentes substratos. Pode-se observar diferenças em tamanho e pI dessas proteínas, conforme o meio de cultivo utilizado (Figura 3).

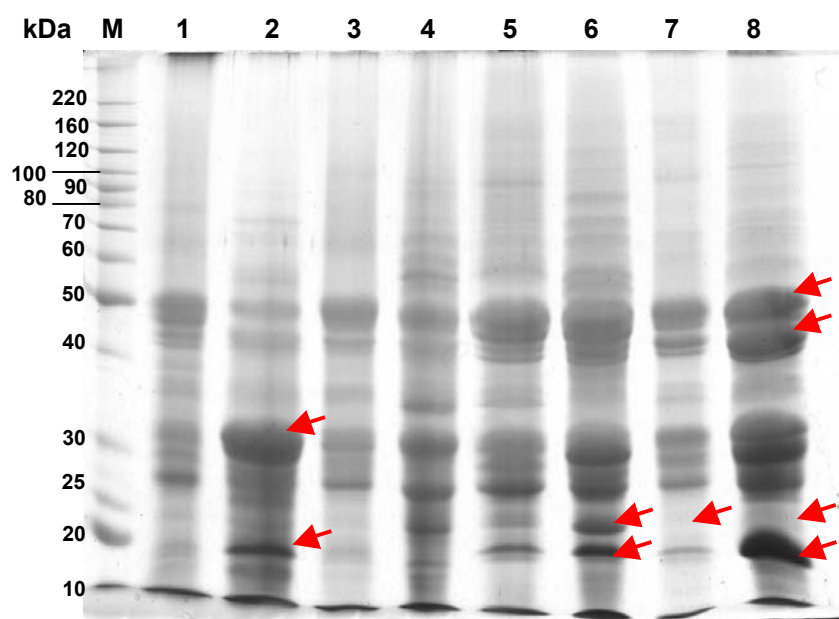


Figura 2: Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. M: marcador de massa molecular (kDa). Canaletas ímpares, proteínas do sobrenadante de 24 h de cultivo (1 dia) e canaletas pares, de 72 h de cultivo (3 dias). Canaletas 1 e 2 proteínas precipitadas do sobrenadante de cultura suplementado com cutícula de *D. peruvianus*; 3 e 4, *B. microplus*; 5 e 6, *A. gemmatilis* e; 7 e 8, quitina cristalina. Os volumes dos sobrenadantes dos cultivos concentrados e aplicados no gel foram respectivamente; 4,15mL (1); 0,66 mL (2); 17,95 mL (3); 7,38 mL (4); 18,73 mL (5); 11,15 mL (6); 15,90 mL (7); e, 8,99 mL (8); nos quais, em cada volume, existiam 60 µg de proteínas.

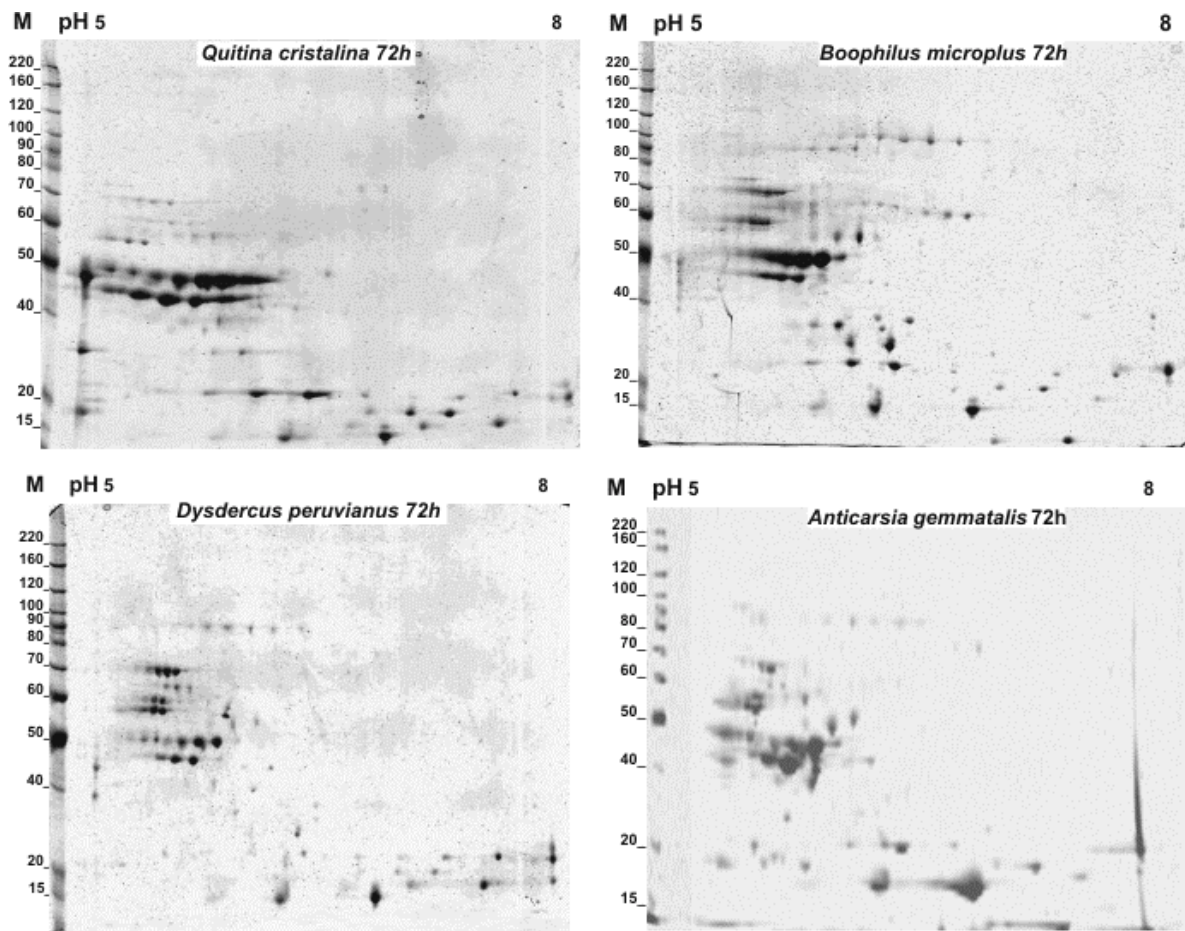


Figura 3: Perfil eletroforético em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. M: marcador de massa molecular (kDa). Os volumes dos sobrenadantes dos cultivos concentrados contendo 400 µg de proteínas e aplicados no gel foram respectivamente: 59,91 mL (Quitina cristalina); 49,23 mL (*B. microplus*); 29,89 mL (*D. peruvianus*); e, 32,77 mL (*A. gemmatalis*).

Através da análise dos géis 2D, realizada através da utilização do programa ImageMaster™ 2D Platinum 6.01 (*GeneralElectric*), foram encontrados 71 *spots* na condição de *D. peruvianus*, 79 em quitina cristalina, 130 em *B. microplus*, e 212 em *A. gemmatalis*; e 109 combinações entre eles foram possíveis (Tabela 1). Embora existam valores de pI e tamanho para cada *spot* identificado, esses são relativos, por serem valores aproximados, baseados em pontos de referência, fornecidos ao programa. A taxa

de identidade das combinações entre os géis não se mostrou muito variável, apesar da grande diferença entre o número de *spots* encontrados nos géis (Tabela 2).

Tabela 1: Combinações de *Spots* (ID) identificados pela análise computacional e manual como sendo correspondentes entre si nas 4 condições de fonte de carbono (em linha). Segue, juntamente com as IDs, respectivos pI e tamanho aproximados determinados pelo programa de análise.

COMBINAÇÕES											
<i>D. peruvianus</i>			<i>A. gemmatalis</i>			<i>B. microplus</i>			Quitina cristalina		
Spot ID	pI	kDa	Spot ID	pI	kDa	Spot ID	pI	kDa	Spot ID	pI	kDa
394	5,82	90	501	5,83	86	276	5,87	89			
395	5,95	90	505	5,98	85	277	5,99	89			
396	6,10	89	506	6,13	85	274	6,12	89			
397	6,42	89	507	6,45	85						
398	6,24	88	504	6,27	85	275	6,26	89			
						286	6,89	74	50	6,89	72
404	5,39	70	561	5,38	66	292	5,35	69	57	5,38	68
405	5,46	69	563	5,43	66				58	5,47	67
406	5,51	69	564	5,49	65	294	5,50	69			
408	5,57	68	567	5,55	64						
			570	5,83	64	291	5,87	70			
409	5,69	69	571	5,68	64	296	5,69	68			
410	5,63	68	572	5,61	62	295	5,61	68	59	5,56	67
412	5,58	67	578	5,56	62						
413	5,57	64	593	5,54	59						
			598	5,93	59	299	6,08	64			
			602	6,12	58	301	6,17	64			
			603	6,21	58	303	6,27	64			
			594	6,31	59	305	6,35	63			
414	5,63	63	599	5,60	58	306	5,60	63	61	5,58	60
415	5,72	63	601	5,69	58	307	5,69	64	62	5,70	60
			596	6,43	58	308	6,43	61			
418	5,43	60	624	5,39	55						
419	5,49	59	621	5,46	55						
420	5,54	59	615	5,53	55						
			616	5,71	55				64	5,72	57
421	5,83	59	620	5,83	54	311	5,88	61	63	5,83	57
423	5,96	57	630	5,96	53	313	5,98	61			
424	5,43	57	638	5,40	53	318	5,44	59	67	5,41	55
425	5,49	57	637	5,46	52	317	5,51	58			
426	5,54	56	636	5,51	52	323	5,60	56			
427	5,28	57	627	5,28	53	316	5,36	59	66	5,31	55
430	6,14	54	646	6,14	50	326	6,15	54			
			652	5,39	50				70	5,41	51
			658	5,83	49	325	5,87	55			
431	5,99	53	660	6,00	48	324	6,02	54			
			663	5,19	48				73	5,21	49
			664	6,59	48	334	6,50	50	75	6,54	48
			665	5,24	47	332	5,27	50			
433	5,34	51	666	5,32	47	335	5,37	51	74	5,34	48
435	5,51	50	672	5,48	46	331	5,52	50	78	5,49	47
436	5,43	50	670	5,41	46	330	5,44	50			
437	5,67	49	682	5,70	45	336	5,71	48			
438	5,58	49	679	5,54	45						
439	5,77	49	678	5,75	44	341	5,81	48	80	5,76	46
440	5,89	49	677	5,80	43	339	5,92	48	81	5,89	46
			680	5,62	45	333	5,62	49	79	5,62	46
			681	6,12	45	337	6,13	50	85	6,11	46

441	6,01	49	683	6,04	45	340	6,04	49	82	6,03	46
442	5,12	48				343	5,08	48	77	5,06	47
			689	5,38	43	346	5,44	46	91	5,39	43
			691	6,13	43				94	6,12	43
444	5,53	46	694	5,49	43	347	5,59	45			
			695	5,19	43				88	5,21	44
445	5,62	45	696	5,58	41	349	5,69	45	95	5,55	42
			698	5,24	42				90	5,26	44
			699	5,33	41				93	5,35	43
			701	5,69	41	348	5,92	45	99	5,89	42
446	5,74	45	707	5,73	40	350	5,79	44	100	5,72	42
447	5,12	44				352	5,08	44	92	5,05	43
448	6,06	44	709	6,09	41	353	6,08	44	103	6,12	41
			710	5,81	40				101	5,80	42
			714	5,97	40				98	5,94	43
449	6,23	44	702	6,25	41	461	6,22	44	102	6,22	42
450	5,12	42	723	5,25	38						
			729	7,99	38	363	7,88	35			
451	5,86	41	734	5,88	35	357	5,95	42	107	5,87	38
			748	5,77	33				108	5,78	35
453	6,12	40	749	6,24	32	364	6,26	35			
454	5,11	38				361	5,08	37	111	5,03	29
455	6,51	35	763	6,48	30	365	6,44	34			
457	6,00	33	766	6,01	29	366	6,02	33	112	6,01	29
			778	5,71	26	368	5,77	32	113	5,83	29
			771	6,29	27	370	6,28	31			
458	6,40	29				372	6,34	29			
459	6,40	27	793	6,41	23	376	6,33	27			
			796	6,32	23	379	6,26	26			
			790	7,01	23	380	6,94	25			
461	8,01	24	800	7,98	21	388	7,98	22	115	8,00	22
462	6,10	24	808	6,11	21	381	6,10	23	121	6,11	20
			810	6,34	20	383	6,28	23			
464	6,44	23	811	6,45	20	385	6,36	23	122	6,42	20
465	6,78	23	813	6,79	20	390	6,71	22	127	6,76	20
			815	5,83	20	382	5,86	24	119	5,84	21
			816	6,59	20	389	6,46	22	131	6,55	20
466	7,67	22	826	7,69	20	393	7,66	21	120	7,69	21
467	7,33	22				392	7,31	21	129	7,35	20
469	7,88	22							128	7,91	20
470	8,01	22	820	7,98	19				126	8,00	20
471	5,29	21				394	5,30	21	124	5,31	20
						398	6,70	19	134	6,79	18
473	7,27	20	849	7,31	17	399	7,24	19	136	7,29	17
475	7,03	20	843	7,06	17	397	6,98	19	135	7,04	18
			850	5,84	17	400	5,94	16			
			854	6,34	16	401	6,26	18	139	6,30	16
476	8,02	18	856	7,98	16	403	7,98	17			
478	7,58	18	859	7,60	15	402	7,56	17	138	7,59	16
			864	6,91	15	404	6,82	17	142	6,89	16
			866	6,35	15	405	6,26	17			
			870	6,67	14				141	6,89	16
479	7,11	18	874	7,11	15	410	7,05	16	140	7,12	16
482	6,89	16	876	6,90	13	412	6,81	16	144	6,89	14
483	6,29	16	883	6,30	14	409	6,24	16	146	6,28	14
489	5,89	16	881	5,84	15	407	5,89	16	145	5,87	14
			880	7,06	15	411	6,99	16			
			936	7,02	10	420	6,95	12			
			937	7,94	10	433	7,83	11			
			942	7,48	10	419	7,38	12			
			943	7,38	10	421	7,25	12			

Tabela 2: Taxa de identidade combinatória entre os quatro diferentes géis 2D.

	<i>D. peruvianus</i>	<i>A. gemmatalis</i>	<i>B. microplus</i>	Quitina cristalina
<i>D. peruvianus</i>	-	41%	53%	50%
<i>A. gemmatalis</i>	41%	-	45%	36%
<i>B. microplus</i>	53%	45%	-	45%
Quitina cristalina	50%	36%	45%	-

Muitos *spots* foram identificados como sendo os mesmos entre os géis, pelo programa ImageMaster, sendo a maioria das proteínas secretadas diferentemente. A combinação entre géis é ilustrada nas Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9, nas quais os *spots* realçados em verde estão presentes, simultaneamente, nos géis colocados lado a lado.

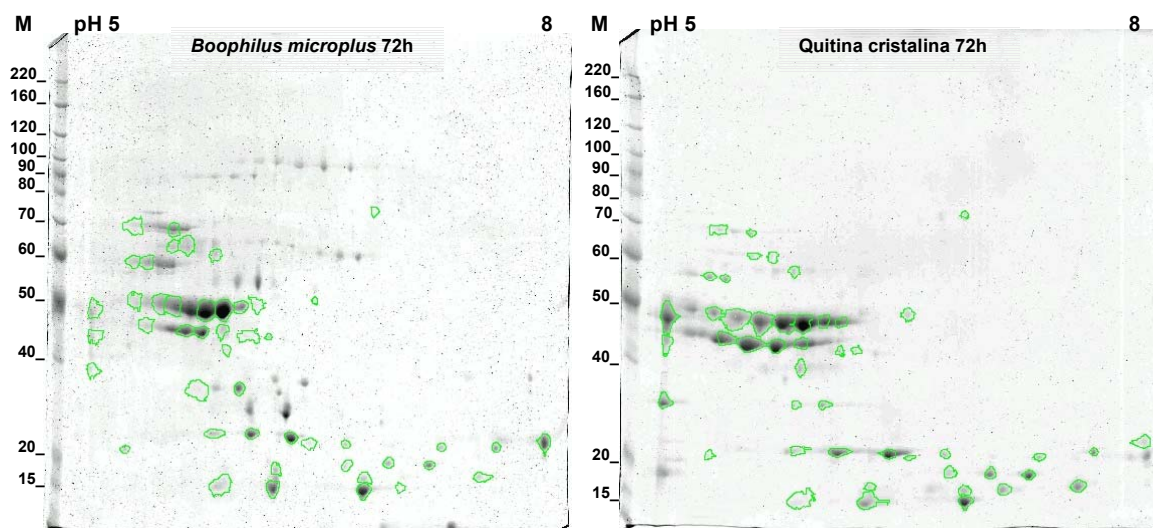


Figura 4: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. M: marcador de massa molecular (kDa). *Spots* marcados em verde estão presentes em ambas as condições. Os volumes dos sobrenadantes dos cultivos concentrados contendo 400 µg de proteínas e aplicados nos géis foram respectivamente: 49,23 mL (*B. microplus*) e 59,91 mL (Quitina cristalina).

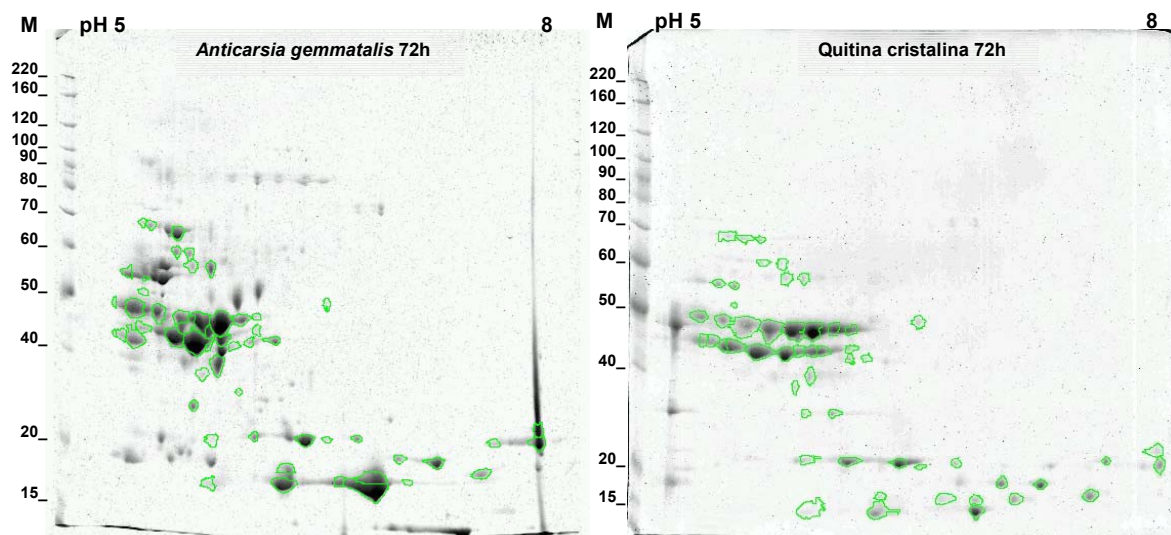


Figura 5: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. M: marcador de massa molecular (kDa). Spots marcados em verde estão presentes em ambas as condições. Os volumes dos sobrenadantes dos cultivos concentrados contendo 400 µg de proteínas e aplicados nos géis foram respectivamente: 32,77 mL (*A. gemmatalis*) e 59,91 mL (Quitina cristalina).

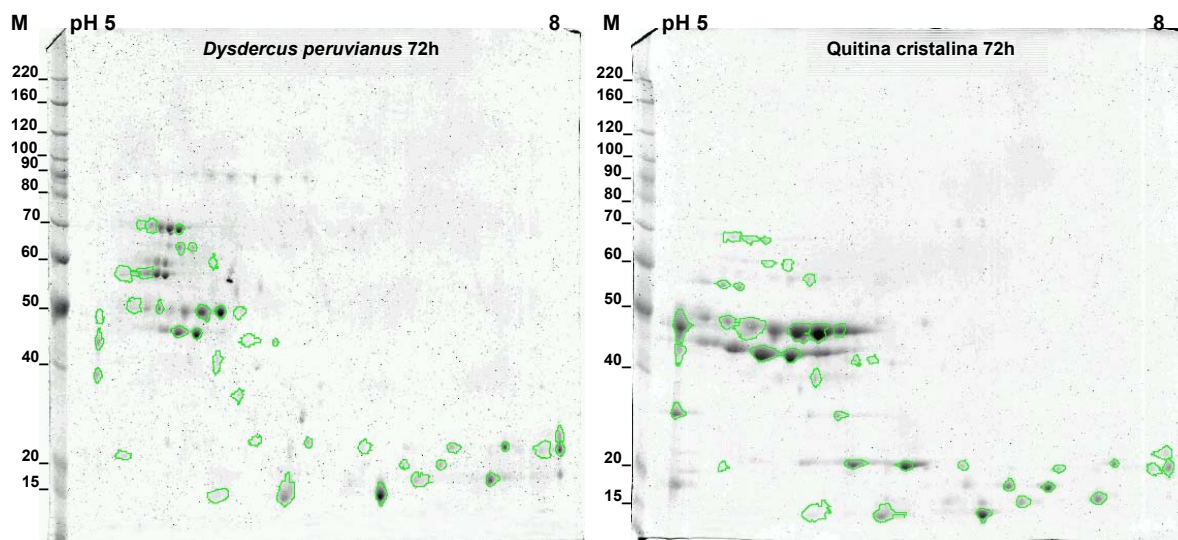


Figura 6: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. M: marcador de massa molecular (kDa). Spots marcados em verde estão presentes em ambas as condições. Os volumes dos sobrenadantes dos cultivos concentrados contendo 400 µg de proteínas e aplicados nos géis foram respectivamente: 29,89 mL (*D. peruvianus*) e 59,91 mL (Quitina cristalina).

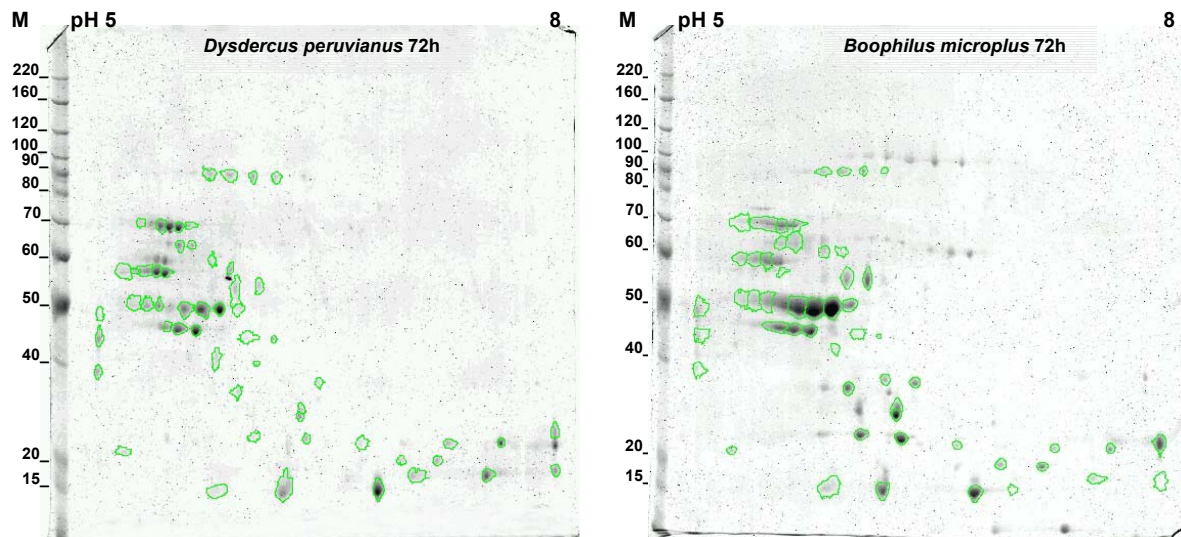


Figura 7: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. M: marcador de massa molecular (kDa). Spots marcados em verde estão presentes em ambas as condições. Os volumes dos sobrenadantes dos cultivos concentrados contendo 400 µg de proteínas e aplicados nos géis foram respectivamente: 29,89 mL (*D. peruvianus*) e 49,23 mL (*B. microplus*).

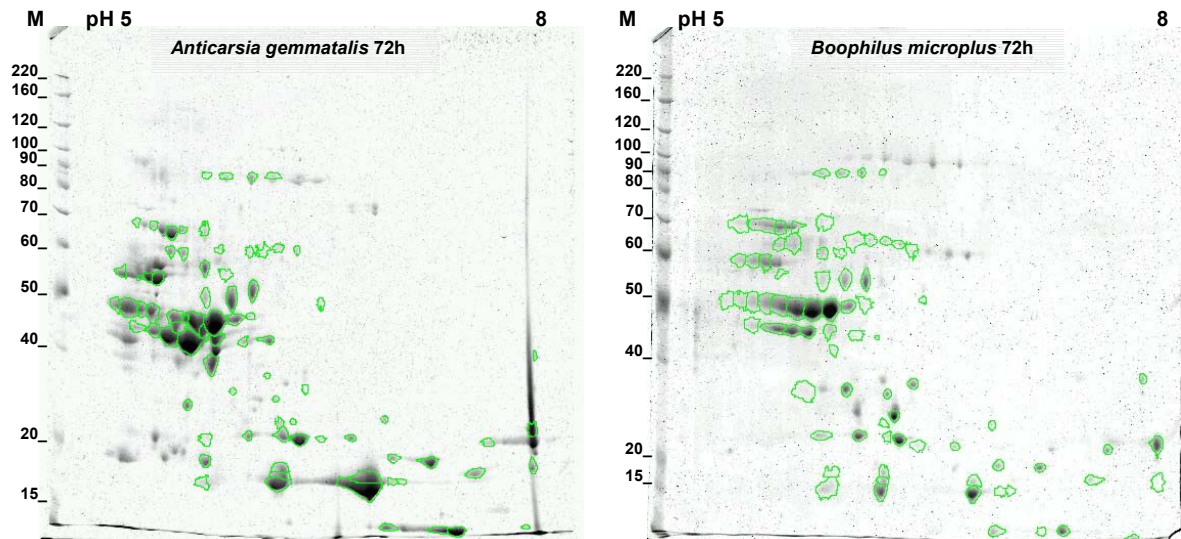


Figura 8: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. M: marcador de massa molecular (kDa). Spots marcados em verde estão presentes em ambas as condições. Os volumes dos sobrenadantes dos cultivos concentrados contendo 400 µg de proteínas e aplicados nos géis foram respectivamente: 32,77 mL (*A. gemmatalis*) e 49,23 mL (*B. microplus*).

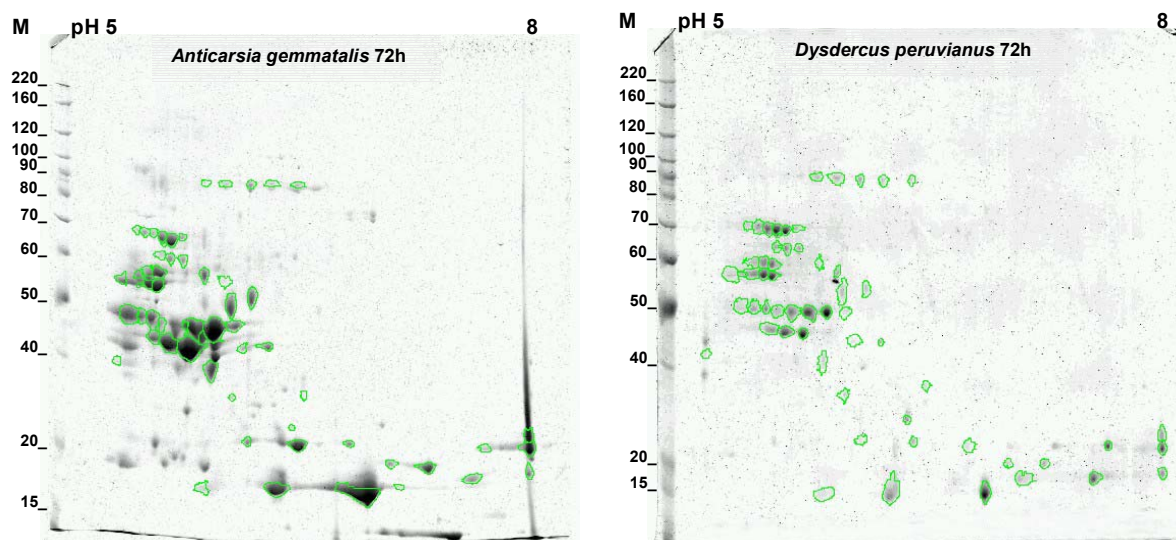


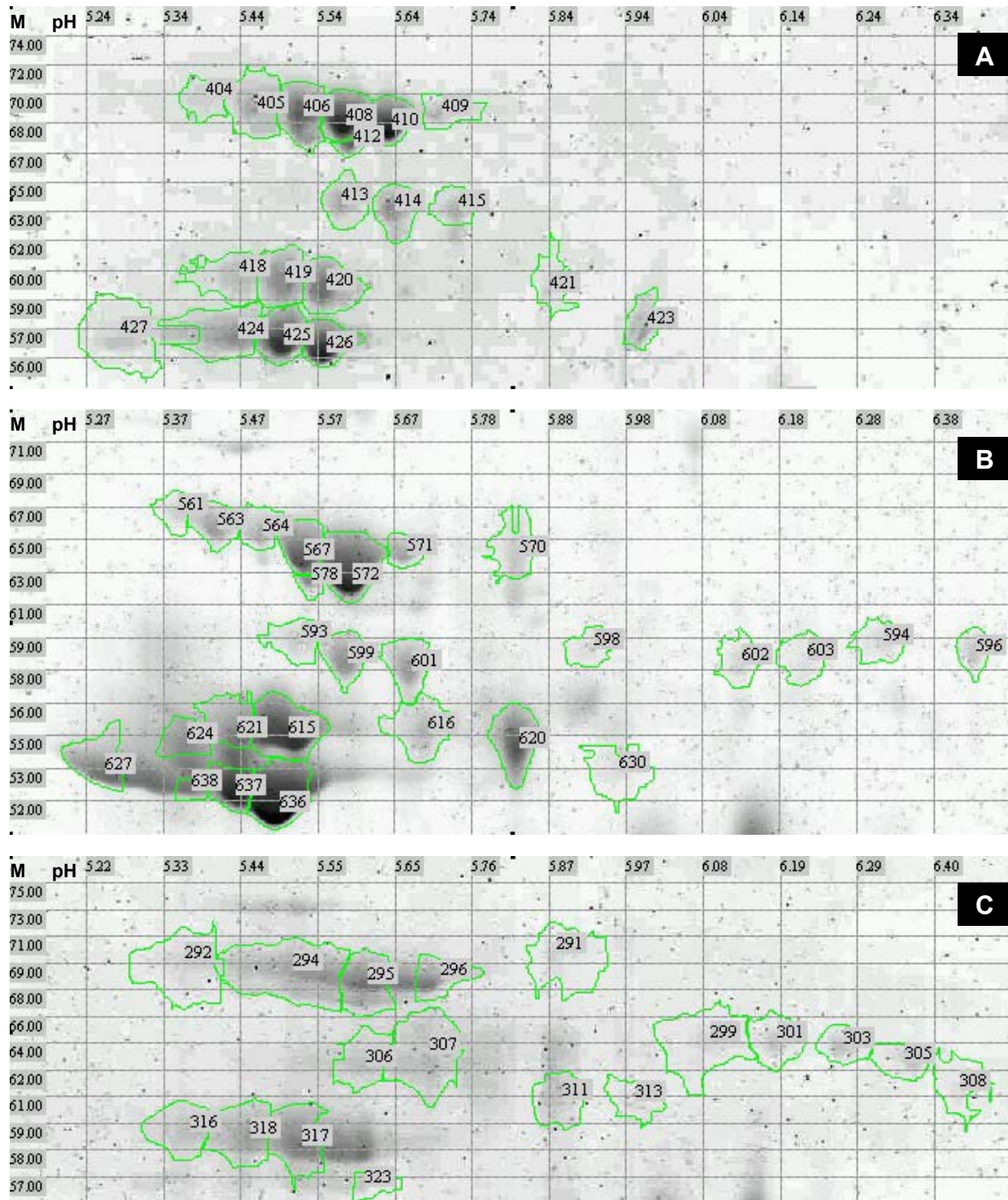
Figura 9: Comparativo entre os perfis eletroforéticos em gel bi-dimensional das proteínas secretadas por *M. anisopliae* cultivado por três dias em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. M: marcador de massa molecular (kDa). *Spots* marcados em verde estão presentes em ambas as condições. Os volumes dos sobrenadantes dos cultivos concentrados contendo 400 µg de proteínas e aplicados nos géis foram respectivamente: 32,77 mL (*A. gemmatalis*) e 29,89 mL (*D. peruvianus*).

Nas figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9, estão evidenciados grandes aumentos na secreção de determinadas proteínas, assim como também é possível a observação da ausência de vários *spots*, no gel do cultivo no qual *D. peruvianus* foi a fonte de carbono, e a presença variada desses nos outros géis, como em *A. gemmatalis* e *B. microplus*. Também se pode notar a presença de uma maior quantidade de proteínas de pI maior ou igual a 8 no gel em que a fonte de carbono foi *A. gemmatalis*.

As diferenças se tornam ainda mais evidentes se observarmos as figuras 10 e 11, nas quais áreas comuns entre os géis foram aumentadas. Apesar disso muitas proteases e quitinases, as quais apresentam pIs menores ou iguais a 5, não poderiam ser identificadas, assim como as de pI maior ou igual a 8, localizadas fora da escala de pH 5 a 8 utilizada nos géis bidimensionais, é o caso de várias proteases, incluindo a PR1A, e quitinases como as endoquitinases de massa correspondente a 43,5, 45 kDa, a exoquitinase de 110 kDa, a endo e exoquitinase de 60 kDa e, a endoquitinase constitutiva de 42 kDa.

Entretanto, a endoquitinase de 45 kDa e pI 4,8 poderia ser sugerida como sendo identificada pelos *spots* de números 92 (em Quitina cristalina), 352 (em *B. microplus*) e

447 (em *D. peruvianus*); a endoquitinase de 42 kDa e pI 5,8 pelos *spots* de números 101 (em Quitina cristalina) e 710 (em *A. gemmatalis*); e a protease codificada pelo gene *try1* e caracterizada por ter uma massa de 23 kDa e pI 5,26 pelos *spots* de números 124 (em Quitina cristalina), 394 (em *B. microplus*) e 471(em *D. peruvianus*) (Figura 11).



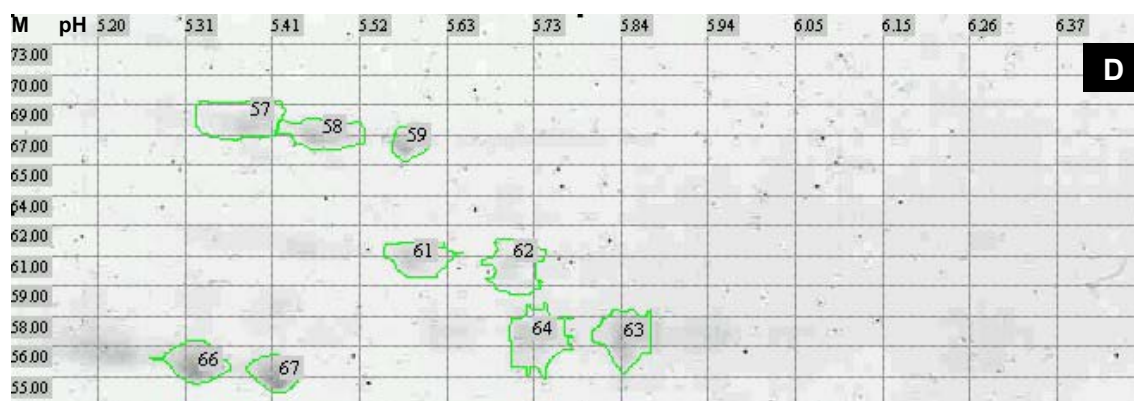
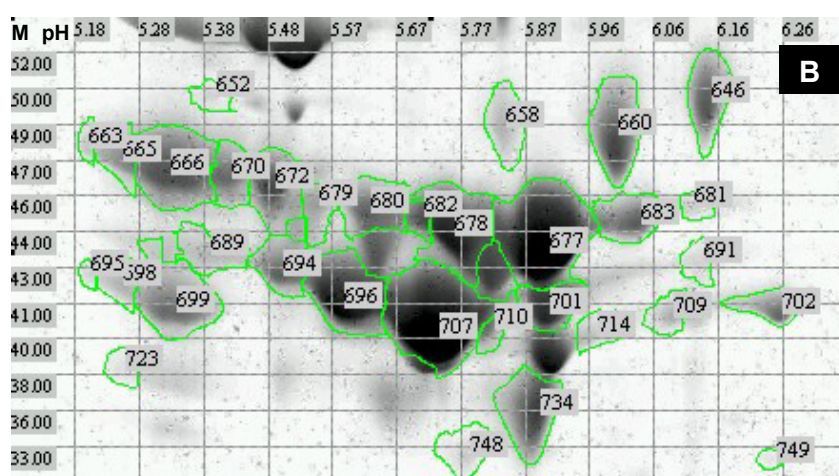
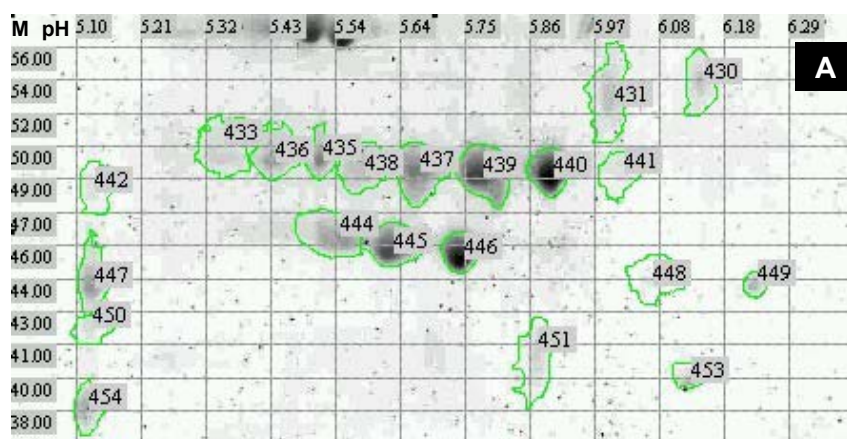


Figura 10: Comparativo entre mesmas faixas de pH e massa de 55 a 74 kDa entre os géis. Área comum em maior escala. M: marcador de massa molecular (kDa). **A:** *D. peruvianus*, **B:** *A. gemmatalis*, **C:** *B. microplus*, e **D:** Quitina cristalina.



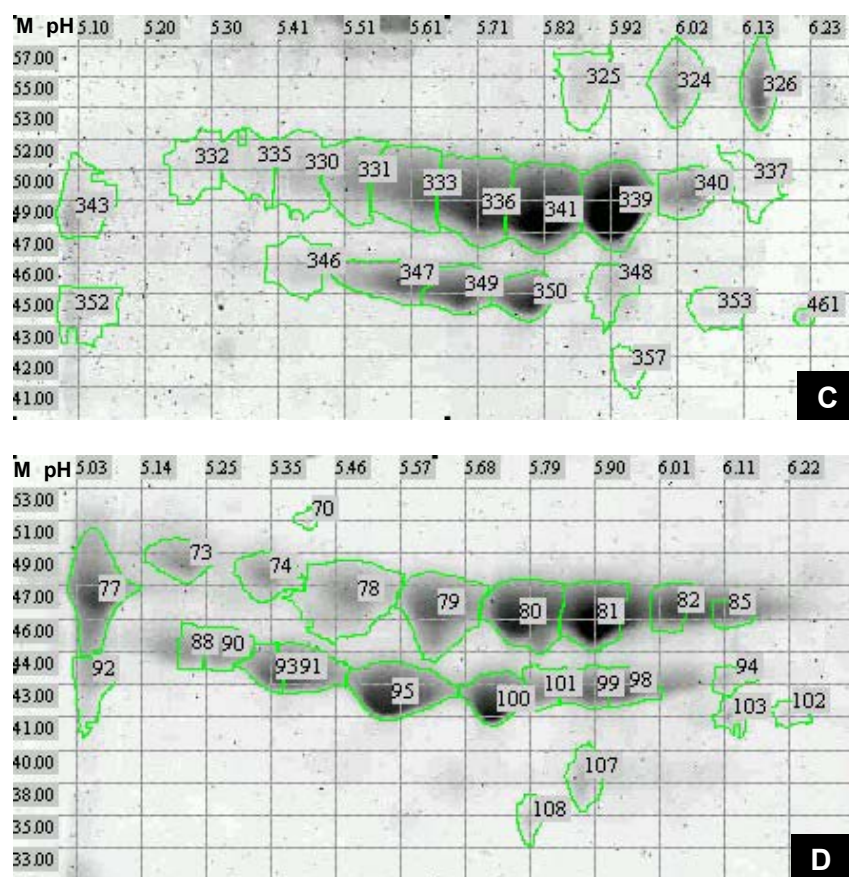


Figura 11: Comparativo entre mesmas faixas de pH e massa de 33 a 57 kDa entre os géis. Área comum em maior escala. M: marcador de massa molecular (kDa). **A:** *D. peruvianus*, **B:** *A. gemmatalis*, **C:** *B. microplus*, e **D:** Quitina cristalina.

5.2. Análise da secreção de proteases

Na análise de atividade proteolítica, constatou-se um aumento de 6 vezes na atividade enzimática na presença de *D. peruvianus*, e 4 vezes na presença de *A. gemmatalis* e quitina cristalina de 24 para 72 h de cultivo, em relação à atividade proteolítica na presença de *B. microplus*, a qual se mostrou, praticamente, constante durante os três tempos de cultivo, mostrando pequena queda em 48 h de cultivo (Figura 12). A atividade de proteases na presença de glicose foi praticamente nula durante todos os tempos; porém, apresentando leve aumento de 48 a 72 h.

O gráfico de atividade específica, para atividade proteolítica, demonstra altos índices na presença de *D. peruvianus*, *A. gemmatalis* e, especialmente, de quitina cristalina após as 24 h de cultivo, os quais indicariam uma maior quantidade de proteases com relação ao total de proteínas secretadas (Figura 13).

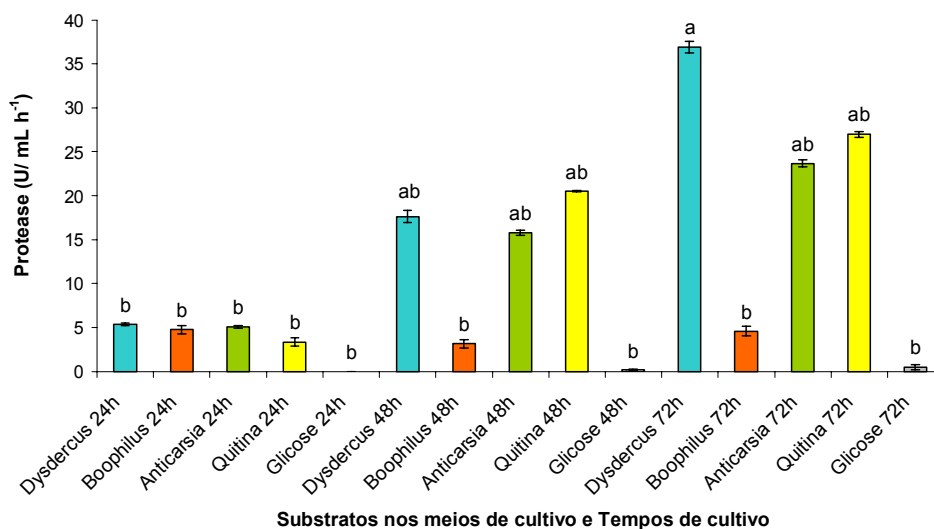


Figura 12: Secreção de proteases por *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. Foram coletadas e analisadas alíquotas de cada uma das culturas do primeiro ao terceiro dia de cultivo. A atividade protéica foi determinada em triplicata. As barras, acima das colunas, indicam o desvio padrão. Colunas seguidas por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

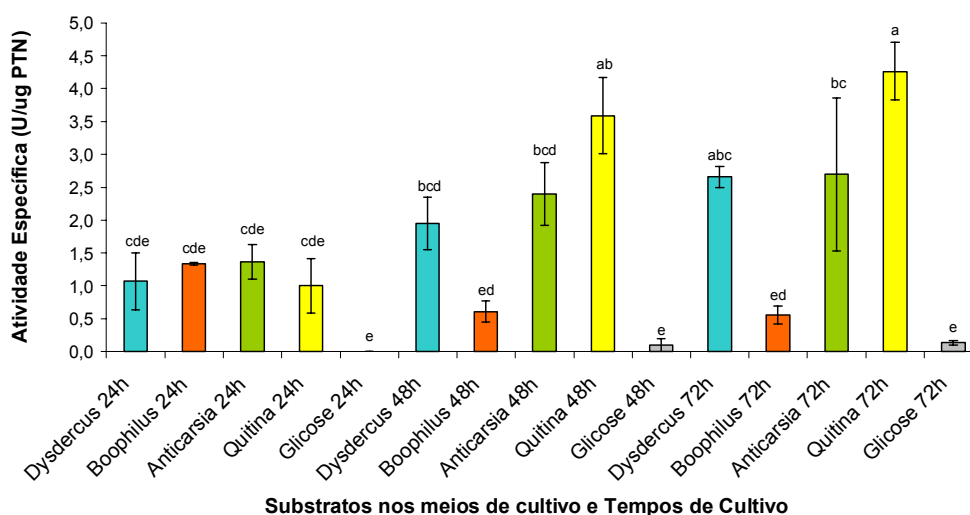


Figura 13: Atividade específica para a secreção de proteases por *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. As barras, acima das colunas, indicam o desvio padrão. Colunas seguidas por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

As amostras também foram analisadas em zimograma, tendo como substrato para atividade proteolítica 0,02% de gelatina (Figura 14), no qual é percebida a expressão diferencial de proteases entre as diversas condições de fonte de carbono e tempo, considerando que, 8µl de cada amostra de cultivo foram aplicadas num gel 15%. Todas as amostras apresentam, basicamente, as mesmas bandas de atividade, porém, com diferentes intensidades. O perfil de bandas de atividade na presença de *D. peruvianus* e *A. gemmatalis* é similar; porém, na presença de *B. microplus* a intensidade de bandas de maior tamanho é ligeiramente menor e, também, a banda de tamanho aproximado de 29 kDa é mais intensa e a de 23 kDa é menos intensa. O perfil de bandas para o cultivo na presença de quitina cristalina não apresenta uma banda de tamanho aproximado de 65 kDa e uma maior intensidade na banda de 23 kDa, se comparado com as outras condições. O cultivo líquido em glicose não apresentou atividade proteolítica significativa para constar nesse experimento.

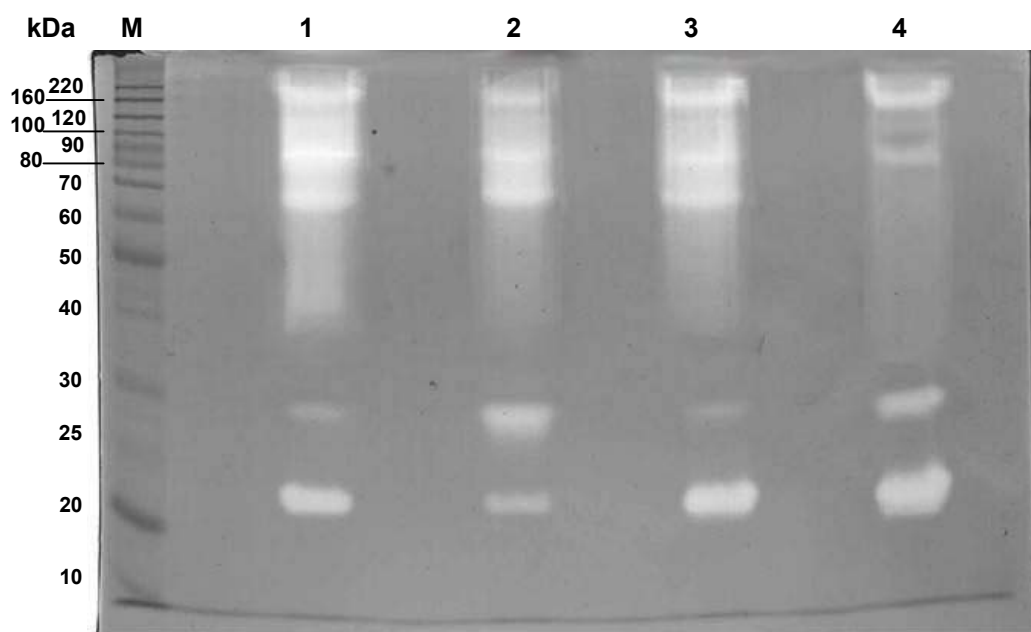


Figura 14: Perfil proteolítico unidimensional (SDS-PAGE 15%) dos sobrenadantes de cultivo, tendo como substrato para atividade proteolítica 0,02% de gelatina. Regiões claras correspondem à degradação da gelatina pela ação de enzimas proteolíticas. **M** – Marcador de massa molecular (kDa), **1** – *D. peruvianus* 72h, **2** – *B. microplus* 72h, **3** – *A. gemmatalis* 72h, **4** - Quitina cristalina 72h.

5.3. Análise da secreção de quitinasas

No ensaio para detecção de atividade quitinolítica foram utilizados três substratos, através dos quais se identificam os três tipos de atividade quitinolítica: atividade de N-acetilglicosaminidase (hidrolisa preferencialmente dímeros), atividade de quitobiosidase (hidrolisa trimeros) e, atividade de endoquitinase (identificada pela digestão de tetrâmeros) (Haran *et al.*, 1995). Na detecção de atividade quitinolítica (Figura 15), observa-se que em todos os tempos as três atividades desse complexo enzimático estão presentes e com maior atividade em meio de cultivo com *D. peruvianus*, se comparado entre os substratos indutores. Observa-se uma maior secreção de enzimas com atividade de N-acetilglicosaminidase em todas as diferentes condições testadas.

A atividade quitinolítica, observada na presença de glicose, indica a secreção de quitinasas altamente específicas e reativas, pois a quantidade de proteína total secretada nessa condição é consideravelmente baixa.

A alta especificidade da atividade enzimática em glicose 48 e 72h (Figura 16) reflete a baixíssima quantidade de proteína secretada nessa condição e, por conseguinte indicam a secreção de quitinasas constitutivas.

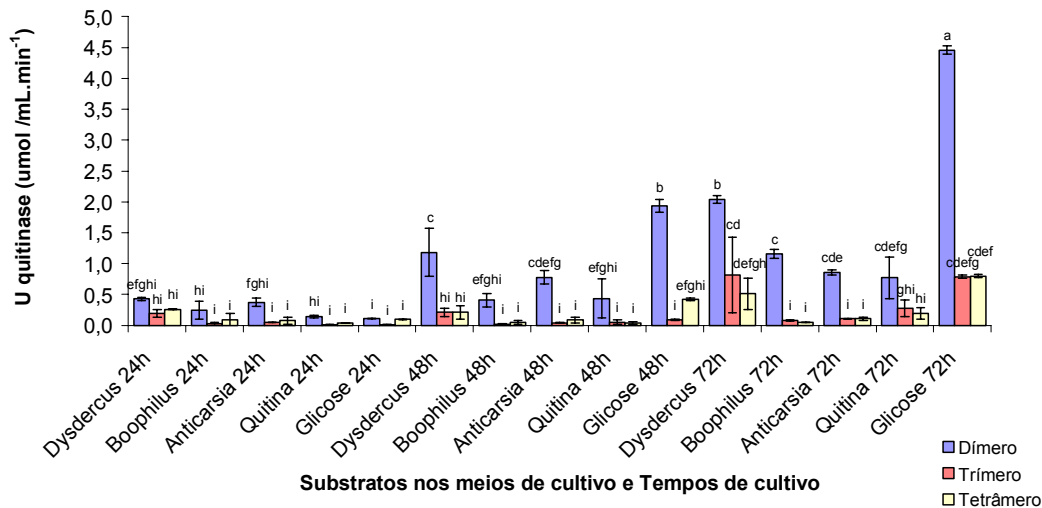


Figura 15: Secreção de quitinasas por *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. Foram coletadas e analisadas alíquotas de cada uma das culturas do primeiro ao terceiro dia de cultivo. A atividade quitinolítica foi determinada em triplicata. As barras, acima das colunas, indicam o desvio padrão. Colunas seguidas por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

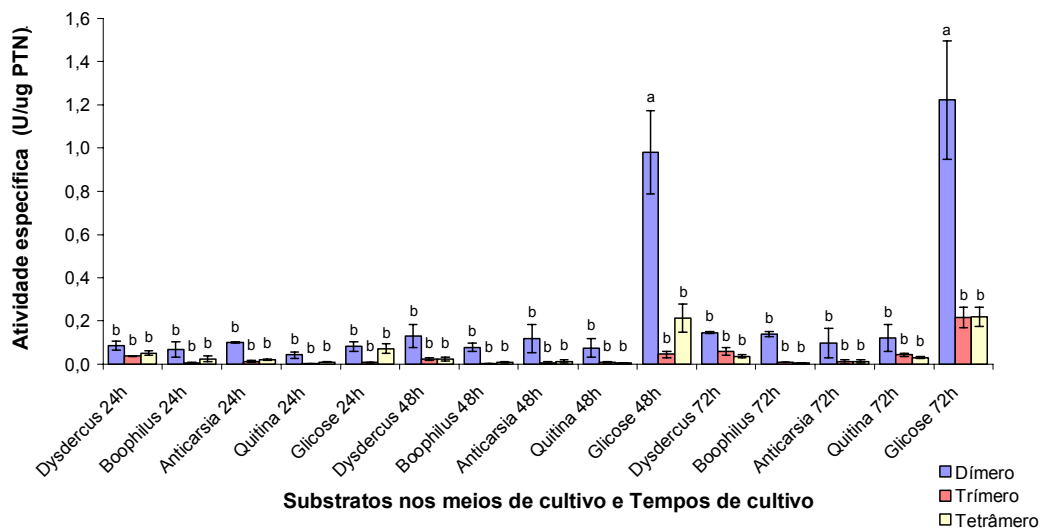


Figura 16: Atividade específica de secreção de quitinases por *M. anisopliae* cultivado em meio suplementado com diferentes fontes de carbono. As barras, acima das colunas, indicam o desvio padrão. Colunas seguidas por letras iguais não são estatisticamente diferentes.

6. DISCUSSÃO

Estudos demonstraram que *M. anisopliae* secreta complexos quitinolítico e proteolítico para a degradação da quitina e proteínas presentes na cutícula de centenas de hospedeiros (Bagga *et al.*, 2004; Baratto *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2005; St. Leger *et al.*, 1987a, b e c). No atual trabalho, foi possível observar e analisar diferenças na expressão de proteínas, especialmente de quitinases e proteases, secretadas pelo fungo *M. anisopliae*, através do cultivo do fungo em presença de cutículas de três artrópodes e quitina cristalina. A partir do sobrenadante das culturas foram avaliadas, quantitativamente e qualitativamente, a secreção de proteínas totais e as atividades das enzimas. Murad *et al.* (2006) demonstraram diferenças nas proteínas secretadas em cultivo líquido de *M. anisopliae* na presença e ausência de cutícula de *Callosobruchus maculatus*, porém os resultados foram obtidos a partir de cultivo líquido inoculado com o micélio do fungo.

Na análise de proteína total secretada (Figura 1), os dados demonstraram, em meio líquido pobre suplementado com fontes de carbono *in natura* ou cristalizada, no caso da quitina, que *M. anisopliae* secretou até 2,5 vezes mais proteína que em meio suplementado com glicose em 72 h de cultivo, produzindo 14 µg/mL de proteína em presença de *D. peruvianus* e um valor médio de 8 µg/mL na presença das outras fontes indutoras, uma vez que o valor obtido para a secreção de proteínas na presença de glicose aumentou de 2 µg/mL em 24 h para 4 µg/mL em 72 h; sendo que em 24 h de cultivo o perfil de secreção já mostrava essa tendência diferencial (Figura 1).

Em gel SDS-PAGE as amostras se mostraram altamente diferentes entre as fontes indutoras e os tempos de cultivo (Figura 2). O perfil eletroforético mostrou uma grande variedade em número, tamanho e intensidade de bandas em todas as condições analisadas. Em função desses dados, é possível inferir na possível presença de algumas quitinases e proteases nas amostras. Bandas correspondentes possivelmente às quitinases de 30, 43,5, 45 e 42 kDa, já relatadas (St. Leger *et al.*, 1991a; Pinto *et al.*, 1997; Baratto *et al.*, 2006) estão fortemente representadas, principalmente a de 30 kDa em *D. peruvianus*, banda que pode estar sobreposta a proteínas de quase mesmo tamanho como a protease PR1A de 29 kDa (St. Leger *et al.*, 1992). A presença de uma banda de aproximadamente 20 kDa em todas as canaletas, especialmente em quitina cristalina (canaleta 8 Figura 2), porém fracamente presente em *B. microplus* (canaletas 3

e 4 Figura 2), sugere uma semelhança com a quimotripsina CHY1 de 18 kDa (Screen & St. Leger, 2000) ou a serino-protease do tipo tripsina TRY1 de 23 kDa (Smithson *et al.*, 1995). Essa banda chama a atenção no zimograma (canaletas 1, 2, 3 e 4 Figura 9), no qual a mesma aparece igualmente intensa nas zonas de hidrólise de gelatina correspondente, sendo de fraca intensidade em *B. microplus* (canaleta 2) e forte intensidade em quitina cristalina (canaleta 4). Ainda no zimograma, a amostra referente à quitina cristalina (canaleta 4 Figura 9), não apresentou uma banda de aproximadamente 65 kDa, a qual foi comum às cutículas dos artrópodes *D. peruvianus*, *B. microplus* e *A. gemmatalis* (canaletas 1, 2 e 3 Figura 9), porém apresentou maior intensidade nas bandas de 29 e 23 kDa (canaleta 4 Figura 9), se comparada às outras amostras (canaletas 1, 2 e 3 Figura 9). A amostra, na qual a fonte de carbono foi quitina cristalina, também se destacou por um valor médio maior em atividade proteolítica específica de 4,3 U/ μ g PTN, em relação às outras condições de cultivo (Figura 13). O zimograma ainda apresenta uma banda de aproximadamente 29 kDa (Figura 9), a qual mostra diferentes intensidades entre às amostras (canaletas 1, 2, 3 e 4 Figura 9), essa banda supostamente poderia ser a subtilisina PR1A, uma tripsina PR2 ou a cisteíno-protease PR4 encontradas no início da infecção do fungo no hospedeiro (St. Leger *et al.*, 1987a, 1992; Cole *et al.*, 1993).

O cultivo em presença de *A. gemmatalis* também induziu a secreção de proteínas com pI > 8 (Figuras 5, 8, 9), fora da escala de pI utilizada nos géis bidimensionais do presente estudo. Nesse pI se localizaria a protease mais importante encontrada durante a infecção do fungo em insetos, a PR1A (St. Leger *et al.*, 1992), o que corroboraria com a evidente importância dessa protease na infecção de *A. gemmatalis* observada por Franceschini (2005). Pelo mesmo motivo, outras proteínas não poderiam ser identificadas nesse e nos outros géis bidimensionais, é o caso de várias proteases, incluindo PR1A, PR2, PR4 (St. Leger *et al.*, 1987a, 1992; Cole *et al.*, 1993), e quitinases como as endoquitinases de tamanho 43,5, 45 kDa, a exoquitinase de 110 kDa, a endo e exoquitinase de 60 kDa e, a endoquitinase constitutiva de 42 kDa (St. Leger *et al.*, 1991a, 1996a; Kang *et al.*, 1999; Baratto *et al.*, 2006).

Entretanto, algumas quitinases e proteases conhecidas de *M. anisopliae* poderiam ser associadas com *spots* detectados nos géis bidimensionais desse trabalho; como a endoquitinase de 45 kDa e pI 4,8 (St. Leger *et al.*, 1991a), que por essas características, sugere-se alguma semelhança com os *spots* de números 92 (em Quitina cristalina), 352 (em *B. microplus*) e 447 (em *D. peruvianus*); a endoquitinase de 42 kDa

e pI 5,8 (Baratto *et al.*, 2003), com os *spots* de números 101 (em Quitina cristalina) e 710 (em *A. gemmatalis*); e a protease codificada pelo gene *try1* e caracterizada por ter uma massa de 23 kDa e pI 5,26 (Smithson *et al.*, 1995) com os *spots* de números 124 (em Quitina cristalina), 394 (em *B. microplus*) e 471 (em *D. peruvianus*) (Figura 11).

Foi observado que nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 h (Figura 15), as três atividades do complexo quitinolítico estão sempre presentes e com maior atividade em meio de cultivo com *D. peruvianus*, se comparado entre os substratos indutores, sendo que há sempre uma maior secreção de enzimas com atividade de N-acetilglicosaminidase em todas as diferentes condições, e assim sugerindo a provável presença da N-acetilglicosaminidase de 110 kDa (St. Leger *et al.*, 1996a) e, das endo e exoquitinases de 30 e 60 kDa (Kang *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2005). Sugere-se que a atividade de N-acetilglicosaminidase encontrada em glicose (Figura 15) pode ser devida à alta sensibilidade do ensaio aplicado, juntamente com a condição de cultivo na qual o fungo *M. anisopliae* dispunha de uma fonte de carbono de pronta e fácil assimilação, podendo aumentar a sua biomassa sem grandes esforços bioquímicos, porém para isso se faria necessário um aumento na produção de quitinases formadoras de parede celular. Atividade quitinolítica na presença de glicose também foi encontrada por Ulhoa & Peberdy (1991), que demonstraram que a glicose reprime a síntese de quitinases, mas não de quitobiases no fungo micoparasita *T. harzianum*.

A cutícula de *D. peruvianus* desempenhou um papel muito importante durante as análises por ter estimulado maior secreção de proteínas totais, proteases e, quitinases que as outras fontes indutoras aplicadas nesse trabalho, sendo que pela primeira vez o inseto *D. peruvianus* foi utilizado na avaliação da secreção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas por *M. anisopliae*.

Mesmo que muitas proteases e quitinases tenham sido relatadas na literatura, muitas ainda podem ser descobertas, desde que poucos hospedeiros foram analisados como substrato, e que *M. anisopliae*, pode expressar genes diferentemente para cada tipo de hospedeiro, produzindo diversas proteínas ou suas isoformas (Freimoser *et al.*, 2003). Foi o que ocorreu nos ensaios utilizando *A. gemmatalis* e *D. peruvianus* que ainda não tinham sido avaliados nessas condições. A intensidade diferente das bandas nos géis SDS-PAGE, bidimensionais e zimograma (Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 14) para os diferentes hospedeiros sugere comportamento diferencial do fungo conforme o hospedeiro, o que seria um sinal da versatilidade do entomopatógeno, aqui estudado, para a capacidade de infectar centenas de hospedeiros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Åhman, J., Johansson, T., Olsson, M., Punt, P.J., Van Den Hondel, C.A.M.J.J., Tunlid, A., 2002. Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. *App Environ Microbiol* 68(7): 3408-3415.
- Alves, S.B., 1998. Controle Microbiano de Insetos. Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz, Piracicaba.
- Andersen, S.O., 1979. Biochemistry of insect cuticle. *Ann Rev Entomol* 24: 29-61.
- Andersen, S.O., Hojrup, P., Roepstorff, P., 1995. Insect cuticular proteins. *Insec Biochem Mol Biol* 25(2): 153-176.
- Arruda, W., Lübeck, I., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experiment Appl Acarol* 37: 231-244.
- Arthurs, S.P. & Thomas, M.B., 2001. Factors affecting horizontal transmission of entomopathogenic fungi in locusts and grasshoppers. *Asp App Biol* 53: 89-97.
- Bagga, S., Hu, G., Screen, S.E. & St. Leger, R.J., 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene* 324: 159-169.
- Baratto, C.M., Dutra, V., Boldo, J.T., Leiria, L.B., Vainstein, M.H., Schrank, A., 2006. Isolation, Characterization, and Transcriptional Analysis of the Chitinase *chi2* Gene (DQ011663) from the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* *Curr Microbiol* 53(3): 217-21.
- Baratto, C.M., Silva, M.V., Santi, L., Passaglia, L., Schrank, I.S., Vainstein, M.H., Schrank, A., 2003. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 49(11): 723-726.
- Barbara, K.A., 2000. Velvetbean caterpillar - *Anticarsia gemmatalis*. Disponível em: <http://creatures.ifas.ufl.edu/field/velvetbean.htm> - Acesso em Junho 2006.
- Barreto, C.C., Staats, C.C., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2004. Distribution of Chitinases in the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and Effect of N-Acetylglucosamine in Protein Secretion. *Curr Microbiol* 48: 102-107.
- Batta, Y.A., 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Crop Protect* 22: 415-422.

- Benjamin, M.A., Zihoua, E., Ostfeld, R.S., 2002. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol** 39(5): 723-728.
- Bidochka, M.J., St. Leger, R.J., Roberts, D.W., 1997a. Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Memo Entomol Sosc Can** 171: 213-224.
- Bidochka, M.J., St. Leger, R.J., Roberts, D.W., 1997b. Induction of novel proteins in *Manduca sexta* and *Blaberus giganteus* as a response of fungal challenge. **J Invert Pathol** 70: 184-189.
- Bittencourt, V.R.E.P., 1999. Controle Biológico de Carrapatos. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (Eds.), Controle Biológico, vol. 2. EMBRAPA, Jaguariúna, SP, 145-171.
- Bittencourt, V.R.E.P., 2000. Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi. **Ann NY Acad Sci** 916: 555-558.
- Bittencourt, V.R.E.P., Bahiense, T.C., Fernandes, E.K.K., Souza, E.J., 2003. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Rev Bras Parasitol Vet** 12(1): 38-42.
- Bittencourt, V.R.E.P., Mascarenhas, A.G., Faccini, J.L.H., 1999. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Rev Cien Rur** 29: 351-354.
- Bittencourt, V.R.E.P., Massard, C.L., Lima, A.F., 1994. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rural, Ser Cienc Vida** 16: 41-47.
- Bogo, M.R., Rota, C.A., Pinto, Jr.H., Campos, M., Correa, C.T., Vainstein, M.H., Schrank, A., 1998. A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. **Curr Microbiol** 37: 1-6.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. **AnalBiochem** 72: 248-254.
- Brisolla, A.D., Bergmann, E.C., Imenes, S.D.L., 1992. Aspectos biológicos de *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Ménéville, 1831) em condições de laboratório. **Arq Inst Biol**, São Paulo, 59(1/2): 19-22.
- Busconi, L., Folco, E., Martone, C.B., Trucco, R.E., Sánchez, J.J., 1984. Identification of two alkaline proteases and a trypsin inhibitor from muscle of white croaker (*Micropogon opercularis*). **FEBS Lett.** 176: 211-214.

- Cabi Bioscience. Cabi Official noted. FMI Silwood Park, Ascot, Berks, UK, 1999 apud Batta, Y.A., 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Crop Protec** 22: 415-422.
- Cabib, E., 1987. The synthesis and degradation of chitin. **Advan Enzymol** 59: 59-101.
- Chandler, D., Davidson, G., Pell, J.K., Ball, B.V., Shaw, K., Sunderland, K.D., 2000. Fungal biocontrol of Acari. **Biocontr Sci Technol** 10: 357-384.
- Clarkson, J.M. & Charnley, A.K., 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiol** 4(5): 197-203.
- Cole, S.C.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M., 1993. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. **Fems Microbiol Lett** 113: 189-196.
- Correia, A.C.B., Fiorin, A.C., Monteiro, A.C., Veríssimo, C.J., 1998. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **J Invert Pathol** 71: 189-191.
- Costa, G.L., Sarquis, M.I.M., Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P., 2001. Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathol** 154: 207-209.
- De La Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Mlora, J., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A., Llobel, A., 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **Europ J Biochem** 206: 859-867.
- Driver, F., Milner, R.J., Trueman, J.W.H., 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycol Res** 104: 134-150.
- Fernandes, E.K., Costa, G.L., Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P., 2004. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J Bras Microbiol** 44(4): 270-274.
- Franceschini, M., 2005. Envolvimento da protease PR1A na patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e na infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Franceschini, M., Guimarães, A.P., Camassola, M., Frazzon, A., Baratto, C.M., Kogler, V., Silva, M.V., Dutra, V., Nakazato, L., Castro, L., Santi, L., Vainstein, M.H., Schrank, A., 2001. Biotecnologia aplicada ao controle biológico, o entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. **Biotec Cienc Desenvol** 23: 32-37.

- Frazzon, A.P.G., Da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vet Parasitol** 94: 117–125.
- Freimoser, F.M., Hu, G., St. Leger, R.J., 2005. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation. **Microbiol** 151: 361–371.
- Freimoser, F.M., Screen, S.E., Bagga, S., Hu, G. & St. Leger R.J., 2003. Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiol** 149: 239–247.
- Fukamizo, T. & Kramer K.J., 1985. Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect molting fluid. **Insect Biochem** 15: 141-145.
- FUNDAG. 2006. Controle biológico de pragas – informativo. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/NOTICIAS/inf_fundag.htm. Acesso em Maio de 2006.
- Furlong, J. & Martins, J.R.S., 2000. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Circ. Tec./Cent. Nac. Pesqui. Gado Leite, no. 59. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, 25 pp.
- Gabriel, B.P., 1968. Enzymatic activities of some entomopathogenic fungi. **J Invert Pathol** 11: 70-81.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho R.P.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B. & Vendramim, J.D., 1988. Manual de Entomologia Agrícola. Ed. Agronômica. Ceres, 649 p.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Batista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. Manual de entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 920 p.
- Gillespie, J.P., Bateman, R., Charnley, A.K., 1998. Role of cuticle-degrading proteases in virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **J Invert Pathol** 71: 128-137.
- Gindin, G., Samish, M., Zangi, G., Mishoutchenko, A., Glazer, I., 2002. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. **Exp App Acarol** 28: 283-288.
- Gonzales, J.C., 1975. O controle do carrapato dos bovinos. Sulina, Porto Alegre, p.103.
- Gooday, G.H., Zhu, W.Y., Donnell, R.W., 1992. What are the roles of chitinases in the growing fungus? **Fems Microbiol Lett** 100: 387-392.

- Grisi, L., Massard, C.L., Moya Borja, G.E., Pereira, J.B., 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet* 21: 8–10.
- Hajek, A.E. & St. Leger, R.J., 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu Rev Entomol* 39: 293–322.
- Hallworth, J.E. & Magan, N., 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *J Invert Pathol* 74: 261-266.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I., 1995. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycol Res* 99: 441-446.
- Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, R.M., Dipietro, A., Peterbauer, C., Tronsmo, A., 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Mol Plant Pathol* 83: 313-318.
- Hassan, A. & Charnley, A.K., 1989. Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through dimilin-affected cuticle of *Manduca sexta*. *J Invert Pathol* 54: 117-124.
- Hepburn, H.R., 1985. Structure of the integument. *In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Gilbert L. I. and Kerkut G.), Pergamon Press, Oxford, 3: 1-58.
- Hong, T.D., Jenkins, N.E., Ellis, R.H., 1999. Fluctuating temperature and the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride* in storage. *Biol Sci Technol* 9: 165-176.
- Hu, G. & St. Leger, R.J., 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl Environ Microbiol* 68: 6383-6387.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H., 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as Biocontrol Agents*, pp. 23–69. Edited by T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan. Wallingford: CAB International.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L., Kawchuk, L.M., Goettel, M.S., 1999. Effect of soil texture and soil sterilization on susceptibility of ovipositing grasshoppers to *Beauveria bassiana*. *J Invert Pathol* 71: 73-81.
- Joshi, L. & St. Leger, R.J., 1999. Cloning, expression and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *J Biol Chem* 274(14): 9803-9811.
- Juarez, M.P., Crespo, R., Fernandez, G.C., Lecuona, R., Cafferata, L.F.R., 2000. Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas disease vector. *J Invert Pathol* 76: 198-207.

- Kaaya, G.P., 2000. Laboratory and field evaluation of entomopathogenous fungi for tick control. *Ann NY Acad Sci* 919: 559-564.
- Kaaya, G.P., Mwangi, E.N., Ouna, E.A., 1996. Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Invert Pathol* 67: 15-20.
- Kamp, A.M. & Bidochka, M.J., 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett App Microbiol* 35: 74-77.
- Kang, S.C., Park, S., Lee, D.G., 1999. Isolation and characterization of chitinases cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fems Microbiol Lett* 165(2): 271-272.
- Kassa, A., Stephan, D., Vidal, S., Zimmermann, G., 2004. Laboratory and field evaluation of different formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* submerged spores and aerial conidia for the control of locusts and grasshoppers. *Bio Control* 49: 63-81.
- Kershaw, M.J., Moorhouse, E.R., Bateman, R., Reynolds, S.E., Charnley, A.K., 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J Invert Pathol* 74: 213-223.
- Kirkland, B.H., Westwood, G.S., Keyhani, N.O., 2004. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *J Med Entomol* 41(4): 705-711.
- Kishimoto, K., Nishizawa, Y., Tabei, Y., Hibi, T., Nakajima, M., Akutsu, K., 2002. Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to grey mold (*Botrytis cinerea*). *Pla Scien* 162: 655-662.
- Kucera, M., 1980. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae. *J Invert Pathol* 35: 304-310.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Liu, Z.Y., Liang, Z.Q., Whalley, A.J.S., Yao, Y.J., Liu, A.Y., 2001. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *J Invert Pathol* 78: 178-182.
- Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M., Parker, B.L., 2003. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *J Invert Pathol* 82: 139-147.

- McCreath, K.J. & Gooday, G.W., 1992. A rapid and sensitive microassay for determination of chitinolytic activity. *J Microbio. Methods* 14: 229–237.
- Meyer, J.R., 2006. Department of Entomology, NC State University. Disponível em: <http://www.cals.ncsu.edu:8050/course/ent425/tutorial/integ.html> Acesso em Junho 2006.
- Milner, R., 2000. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocon News Inform* 21(2): 47N-50N.
- Murad, A.M., Laumann, R.A., Lima, T.A., Sarmiento, R.B.C., Noronha, E.F., Rocha, T.L., Valadares-Inglis, M.C., Franco, O.L. 2006. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol* 142(3-4): 365-370.
- Onofre, S.B., Miniuk, C.M., Barros, N.M., Azevedo, J.L., 2001. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *Am J Vet Res* 62(9): 1478-1480.
- Paião, J.C.V., Monteiro, A.C., Kronka, S.N., 2001. Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. *World J Microbiol Biotechnol* 17: 245–251.
- Pantou, M.P., Mavridou, A., Typas, M.A., 2003. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fung Genet Biol* 38: 159–174.
- Paterson, I.C., Charnley, K., Cooper, R.M., Clarkson, J.M., 1993. Regulation of production of a trypsin-like protease by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Fems Microbiol Lett* 109: 323-328.
- Paterson, I.C., Charnley, K., Cooper, R.M., Clarkson, J.M., 1994a. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiol* 140: 185-189.
- Paterson, I.C., Charnley, K., Cooper, R.M., Clarkson, J.M., 1994b. Partial characterization os specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiol* 140: 3153-31-59.
- Patil, R., Ghormade, V., Deshpande, M.V., 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. (Review). *Enzym Microb Technol* 26: 473-483.
- Pell J.K., Eilenberg J., Hajek A.E., Steinkraus D.S., 2001. Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. Apud Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (eds.). Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. *CAB International*, Wallingford, 71–154.

- Pinto, A.S., Barreto, C.C., Schrank, A., Ulhoa, C.J.U., Vainstein, M.H., 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Can J Microbiol** 43: 322-327.
- Prette, N., Monteiro, A.C., Garcia, M.V., Soares, V.E., 2005. Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. **Cienc Rur**, Santa Maria 35: 855-861.
- Quarles, W., 1995. New Technologies for termite control. *IPM Practitioner*, 17: 1-9. Apud Batta, Y.A., 2003. Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Crop Protec** 22: 415-422.
- Roberts, D.W. & St. Leger, R.J., 2004. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. **Advan Appl Microbiol**. Vol 54: 1-70.
- Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Pell, J.K., 2006. Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. **Annu. Rev. Entomol.** 51: 331-57.
- Sahai, A. & Manocha, M., 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **Fems Microbiol Rev** 11: 317-338.
- Samish, M., Gindin, G., Alekseev, E., Glazer, I., 2001. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipidephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **J Parasitol** 87(6): 1355-1359.
- Samuels, R.I. & Paterson, A.C., 1995. Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. **Comp Biochem Physiol** 110B(4): 661-669.
- Samish, M. & Rehacek, J., 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annu Rev Entomol** 44: 159-182.
- Sangorrín, M.P., Folco, E.J., Martone, C.M., Sánchez, J.J., 2001. Purification and characterization of proteinase inhibitor from white croaker skeletal muscle *Micropogon opercularis*. **Internat J Biochem Cell Biol** 33: 691-699.
- Schaefer, J., Kramer, K.J., Garbow, J.R., Jacob, G.S., Stejskal, E.O., Hopkins, T.L., Speirs, R.D., 1987. Aromatic cross-links in insect cuticle: detection by solid-state ¹³C and ¹⁵N NMR. **Scien** 235(4793): 1200-1204.
- Schetino, C.B., 2005. Controle de Pragas e Plantas Daninhas. Disponível em: http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/control_e_pragas.html. Acesso em Julho de 2006.
- Scholte, E.J., Njiru, B.N., Smallegange, R.C., Takken, W., Knols, B.G.J., 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malar J** 2(29): 1-8.

- Schrank, A., Bassanese, M.C., Pinto Jr., H., Costa, S.V., Bogo, M.R., Silva, M.S.N., 1993. Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Ciênc Cultu** 45: 200-205.
- Screen, S.E., Hu, G., St. Leger, R.J., 2001. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **J Invert Pathol** 78: 260–266.
- Screen, S.E. & St. Leger, R.J., 2000. Cloning, expression and substrate specificity of a fungal chymotrypsin. Evidence for lateral gene transfer from an actinomycete bacterium. **J Biol Chem** 275(9): 6689-6694.
- Segers, R., Butt, T.M., Keen, J.N., Kerry, B.R., Peberdy, J.F., 1995. The subtilisins of the invertebrate mycopathogens *Verticillium chlamydosporium* and *Metarhizium anisopliae* are serologically and functionally related. **Fems Microbiol Lett** 126: 227-232.
- Shah, P.A. & Pell, J.K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Appl Microbiol Biotech** 61: 413–423.
- Silva M.V., Santi L., Staats C.C., Costa A.M., Colodel E.M., Driemeier D., Vainstein M.H., Schrank A., 2005. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Res Microbiol**. 156(3): 382-392.
- Smith, R.J., Perkrul S., Gula, E.A., 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). **J Invert Pathol** 38: 335-344.
- Smithson, S.L., Paterson, I.C., Bailey, A.M., Screen, S.E., Hunt, B.A., Cobb, B.D., Cooper, R.M., Charnley, A.K., Clarkson, J.M., 1995. Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene** 166: 161-165.
- Souza, M.L.S., Castro, C., M.E.B., Silher, W., Ribeiro, Z.M.A., Moscardi, F., 2002. Caracterização de baculovirus utilizados no controle de pragas. **Biotechnol Ciênc Desenv** 24: 18-20.
- St. Leger, R.J., Bidochka, M.J., Roberts, D.W., 1994a. Isoforms of the cuticle-degrading PR1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Arch Bioch Bioph** 313(1): 1-7.
- St. Leger, R.J., Bidochka, M.J., Roberts, D.W., 1994b. Characterization of a novel carboxipeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Arch Bioch Bioph** 314(2): 392-398.
- St. Leger, R.J., Butt, T.M., Staples, R.C., Roberts, D.W., 1989. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experim Mycol** 13: 253-262.

- St. Leger, R.J., Butt, T.M., Staples, R.C., Roberts, D.W., 1990. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. ***J Genet Microbiol*** 136: 1779-1789.
- St. Leger, R.J., Charnley, K., Cooper, R.M., 1986a. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. ***J Invert Pathol*** 48: 85–95.
- St. Leger R.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M., 1987a. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. ***Arch Biochem Biophys*** 253: 221-232.
- St. Leger R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. ***J Genet Microbiol*** 132: 1509-1517.
- St. Leger R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1986c. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. ***J Invert Pathol*** 47: 167-177.
- St. Leger R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1987b. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. ***J Gen Microbiol*** 133: 1371-1382.
- St. Leger R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1987c. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic Deuteromycetes. ***Arch Biochem Biophys*** 258: 121-131.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1991a. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. ***J Invert Pathol*** 58: 415-426.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1993. Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. ***J Genet Microbiol*** 139(2): 237-243.
- St. Leger, R.J., Durrandas, P.K., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1988. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. ***Arch Microbiol*** 41501: 413-416.
- St. Leger, R.J., Frank, D.C., Roberts, D.W., Staples, R.C., 1992. Molecular cloning and regulatory analysis the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. ***Eur J Bioch*** 204: 991-1001.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M., Rizzo, M.J., Roberts, D.W., 1996a. Biochemical Characterization and Ultrastructural Localization of Two Extracellular Trypsins Produced by *Metarhizium anisopliae* in Infected Insect Cuticles. ***Appl Environ Microbiol***. 62(4): 1257–1264.

- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M., Rizzo, M.J., Roberts, D.W., 1996b. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl Environ Microbiol* 62(3): 907–912.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M., Roberts, D.W., 1996c. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6349-54.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Roberts, D.W., 1998. Ambient pH is a Major Determinant in the Expression of Cuticle-Degrading Enzymes and Hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl Environ Microbiol*. 64: 709–713.
- St. Leger, R.J., Roberts, D.W., Staples, R.C., 1991b. A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. *J Invert Pathol* 57: 299-310.
- Sun, L., Fuxa, J.R., Henderson, G., 2003. Effects of virulence, sporulation and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. *J Invert Pathol* 84: 38-46.
- Tulloch, H., 1976. The Genus *Metarhizium anisopliae*. *Trans Br Mycol Soc* 66: 407-411.
- Turnipseed, S.G. & Kogan, M., 1987. Integrated control of insect pests. In: WILCOX, J.R. (Ed.). *Soybeans: improvement, production and uses*. Madison: Agronomy, 779-817.
- Ulhoa, C.J. & Peberdy, J.F., 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J Gen Microbiol* 137(9): 2163-2169.
- Ulhoa, C.J. & Peberdy, J.F., 1992. Purification and some proprieties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzy Microb Technol* 14: 236-240.
- U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/product/prod_029056.htm Acesso em Setembro de 2006.
- Vänninen, I., Tyni-Juslin, J., Hokkanen, H., 2000. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in finnish agricultural soils. *Bio Control* 45: 201-222.
- Vey, A., Matha, V., Dumas, C., 2002. Effects of the mycotoxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. *J Invert Pathol* 80: 177-187.
- Wang, C. & Powell, J.E., 2004. Cellulose bait improves the effectiveness of *Metarhizium anisopliae* as a microbial control of termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Biol Control* 30: 523-529.

- Wang, C. & St. Leger, R.J., 2005. Developmental and Transcriptional Responses to Host and Nonhost Cuticles by the Specific Locust Pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryo Cell*. 4 (5): 937-947.
- Wharton, R.H., 1967. Acaricide resistance and cattle tick control. *Aust Vet J* 43: 394-398.
- Wraight, S.P., Jackson, M.A., Kock, S.L., 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. Apud Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (eds.). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, 253-287.
- Zhioua, E., Browning, M., Johnson, P.W., Ginsberg, H.S., Lebrum, R.A., 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularum* (Acari: Ixodidae). *J Parasitol* 83(5): 818-818.