

# Identificação de vesículas extracelulares secretadas pelo fungo filamentoso

## *Metarhizium anisopliae*

Eliara Assis Mauzolf<sup>1</sup>, Augusto Schrank<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bolsista de Iniciação Científica, Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup> Orientador, Centro de Biotecnologia, CBiot, Universidade Federal do Rio Grande do Sul



**UFRGS**  
PROPEAQ

**XXVI SIC**  
Salão Iniciação Científica

**CB - Ciências Biológicas**

### INTRODUÇÃO

A capacidade de infectar inúmeros hospedeiros artrópodes apresentada pelo fungo filamentoso *M. anisopliae* tornou-o um organismo modelo para o estudo da interação patógeno-hospedeiro. Considerado um agente biocontrolador de insetos-praga, este fungo é utilizado em diversos países como parte de programas de manejo e contenção de pestes da agricultura. Dentre os artrópodes já comprovadamente infectados por *M. anisopliae* estão o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* (FRAZZON *et al.*, 2000; ARRUDA *et al.* 2005), o inseto vetor da malária *Anopheles gambiae* (SCHOLTE *et al.*, 2006) e o percevejo manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* (SANTI *et al.*, 2006). Durante o processo de infecção, *M. anisopliae* secreta diversas enzimas hidrolíticas, como lipases, proteases e quitinases, que potencialmente auxiliam nos estágios iniciais da infecção e auxiliam na dissolução do tegumento do artrópode hospedeiro (SCHRANK *et al.*, 2010; STAATS *et al.*, 2014). Foi descrito em levedura uma rota não clássica de secreção, denominada secreção por vesículas, como sendo muito importante em processos de patogenicidade (RODRIGUES *et al.*, 2006). As proteínas secretadas por essa via são independentes da presença de peptídeo sinal e da via de secreção ER-Golgi. Essa rota ainda não foi caracterizada em fungos filamentosos.

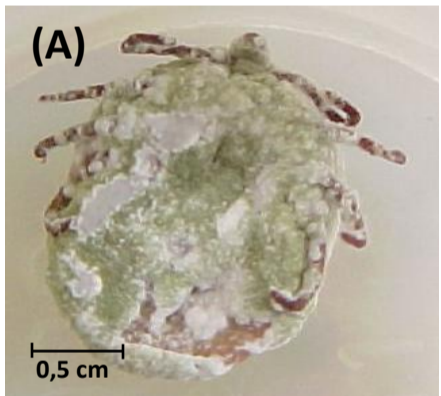


Figura 1. Fêmea de *Rhipicephalus microplus* (A) e fêmea de *Dysdercus peruvianus* (B) colonizadas por *M. anisopliae*.

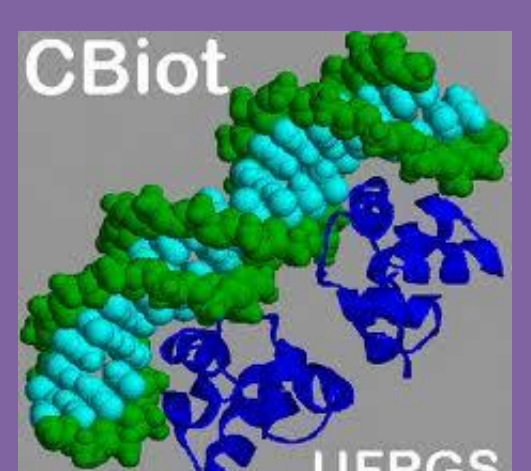
### OBJETIVO

A possível existência de uma rota de vesículas secretadas, contendo fatores de virulência, possibilita uma nova abordagem no estudo da patogenicidade de fungos. É possível que em *M. anisopliae*, macromoléculas responsáveis pela sua patogenicidade sejam transportadas por esta via para o sítio de infecção. Portanto, nosso objetivo é identificar e caracterizar vesículas extracelulares secretadas pelo fungo entomopatogênico *M. anisopliae*.

### REFERÊNCIAS

- ARRUDA *et al.* 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*.
- FRAZZON, APG *et al.* 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*.
- SANTI, L *et al.* 2010. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology*.
- SCHOLTE, E. *et al.*, 2006. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- SCHRANK A & VAINSTEIN, MH. 2010. *M. anisopliae* enzymes and toxins. *Journal of the International Society on Toxicology*.
- STAATS CC. *et al.*, 2014. Comparative genome analyses of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. *BMC Genomics*.
- RODRIGUES M.L. *et al.*, 2006. Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans Wall Transport.

Apoio:



### METODOLOGIA

#### Condição de Cultivo:

*M. anisopliae*, linhagem E6, foi cultivado em 100 mL de meio de cultura MCc (Meio de Cove Completo) e mantido a 28 °C com agitação constante pelo período de 15 dias. A cada 3 dias, foi adicionado nova alíquota de meio MCc recém preparado, totalizando um volume de 1.000 mL ao final dos 15 dias.

#### Isolamento de vesículas:

O sobrenadante do cultivo de células fúngicas de *M. anisopliae* foi filtrado, coletado e armazenado a 4 °C. Esse sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração utilizando o sistema Amicon (100 kDa). Restos celulares foram removidos por centrifugação a 15.000 x g. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante resultante foi, em seguida, centrifugado a 100.000 x g durante 1h a 4 °C. O *pellet* contendo as vesículas extracelulares foi lavado por cinco sequências de ressuspensão e centrifugação como descrito anteriormente (RODRIGUES *et al.*, 2006).

#### Visualização de vesículas:

As vesículas isoladas serão ressuspensas em Solução de Fixação, embebidas em Resina Epoxy, obtidas finas sessões e então coradas para posterior visualização por microscopia eletrônica de transmissão.

### RESULTADOS e PERSPECTIVAS

Foram realizados três cultivos de 1.000 mL de *M. anisopliae* em MCc por 15 dias para obtenção do sobrenadante possivelmente contendo as vesículas de interesse. Os 3.000 mL de sobrenadante de cultivo foram filtrados e armazenados. Uma fração de 1.000 mL foi filtrada pelo sistema Amicon concentrando a amostra em aproximadamente 60 X. Posteriormente, os processos de centrifugação e ultracentrifugação serão realizados com todas as amostras.

As vesículas isoladas serão analisadas quanto a sua composição lipídica por cromatografia de camada delgada. As possíveis vesículas serão caracterizadas em relação ao seu conteúdo vesicular por análise proteômica e ensaios enzimáticos.