

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**SUPERÓXIDO DISMUTASES DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO E
ACARICIDA *Metarhizium anisopliae***

Dissertação de Mestrado

Luiza Amaral de Castro

Porto Alegre, novembro de 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**SUPERÓXIDO DISMUTASES (SODs) DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO E
ACARICIDA *Metarhizium anisopliae***

LUIZA AMARAL DE CASTRO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre.

**ORIENTADORA: MARILENE HENNING VAINSTEIN
CO-ORIENTADOR: AUGUSTO SCHRANK**

PORTO ALEGRE, NOVEMBRO DE 2002

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da UFRGS com apoio financeiro do CNPq, PADCT III e FAPERGS.

À minha família

AGRADECIMENTOS

A professora Marilene por TUDO, principalmente pela confiança e incentivo.

Ao professor Augusto pelas críticas, apoio e disponibilidade.

Aos meus colegas do laboratório 205, principalmente pelo companheirismo e pelas risadas: as meninas superpoderosas, Márcia e Valéria; ao Charley, Paulo, César, Luciano, Leonardo Leiria, Leonardo Broetto, Lucélia e Ana Carolina.

A todos os colegas do laboratório 107, 119, 210 e 213 do Centro de Biotecnologia e do laboratório 209 do departamento de Microbiologia.

Aos colegas do laboratório 201 e 217, especialmente à Daniela, pelos chás de fim de tarde e sábados.

À professora Irene pela atenção e pela revisão da dissertação.

À Sílvia, ao Luciano e Rafael da Secretaria do PPGBCM, pela disposição, disponibilidade, apoio e sorrisos.

Ao professor Itabajara (Ita), que além de ter pertencido à minha comissão de acompanhamento é um amigo fiel.

Ao professor Gustavo Goldman da comissão de acompanhamento.

Ao Sr. Milton e ao Paulo da sala de lavagem, cujo trabalho é essencial para o andamento do nosso.

Ao Sr. Otelo pela alegria e sinfonias de todas as manhãs.

Demais colegas e professores do Cbiot.

Aos meus amigos que quase não me viram, agradeço a compreensão, amizade e carinho.

Ao Sérgio por todo carinho, amor, apoio, atenção, incentivo e ajuda.

À minha família, por todo amor, amizade, compreensão, apoio, carinho, incentivo, cuidado e dedicação.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	8
Lista de figuras e tabelas	10
Resumo	12
Introdução	13
1.1 Radicais livres e estresse oxidativo	13
1.2 As Superóxido dismutases (EC 1.15.1.1)	16
1.2.1 Aspectos Gerais	16
1.2.2 Genes <i>sod</i> , a sua regulação e estudos de mutação	18
1.2.3 As enzimas FeSOD e MnSOD	20
1.2.4 Cu/ZnSOD	22
1.2.5 A participação das SODs na virulência e na patogenicidade	24
1.3 Controle biológico	26
1.3.1 Aplicação de <i>Metarhizium anisopliae</i> como agente de controle biológico	28
1.4 O fungo entomopatogênico e acaricida <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
2. Objetivos	31
2.1 Objetivos específicos	31
3. Materiais e Métodos	33
3.1 Microrganismos e cultivos	32
3.2 Extração de proteínas	32
3.2.1 Extração de proteínas de <i>Metarhizium anisopliae</i>	33
3.2.2 Extração de proteínas de <i>Escherichia coli</i>	33
3.3 Precipitação com sulfato de amônio	33
3.3.1 Diálise	34
3.3.2 Quantificação de proteínas	34

3.4 Cromatografias	35
3.4.1 Cromatografia em resina de troca iônica (TI)	35
3.4.2 Cromatografia em resina de afinidade	35
3.5 Ensaio enzimático	36
3.5.1 Curva de Redução do NBT	36
3.5.2 Determinação quantitativa da presença de SODs	37
3.5.3 Amostras	37
3.6 Eletroforese das proteínas	37
3.6.1 Gel nativo para detecção da atividade de SOD	38
3.6.1.1 Análise da presença das SODs	38
3.6.1.2 Determinação do metal ligante.	38
3.6.2 Gel desnaturante	39
4. Resultados	40
4.1 Padronização do ensaio enzimático para a detecção da atividade de SOD	40
4.2 Ensaio espectrofotômetro da atividade SOD utilizando inibidores	40
4.3 Purificação das SODs	44
4.3.1 Obtenção dos extratos celulares	44
4.3.2 Purificação de Cu/ZnSOD	46
4.3.2.1 Cromatografia em resina de troca iônica	46
4.3.2.2 Cromatografia em resina de afinidade	51
5. Discussão	55
Abstract	61
6. Referências bibliográficas	62
Anexo 1. Curriculum Vitae	76

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

3D	Tridimensional
atm	Atmosferas
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus centígrados
cm	Centímetros
Cu/ZnSOD	Cobre zinco superóxido dismutase
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxi-ribonucléico
E	Fração eluída das cromatografias
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ET	Extrato total
EUA	Estados Unidos da América
FeSOD	Ferro superóxido dismutase
h	Hora
IMAC	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
kDa	Kilodaltons
L	Litro
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MCC	Meio de Cove Completo
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MM	Marcador de massa molecular
mM	Milimolar
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
N	Normal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Azul de nitrotetrazólio

nm	Nanômetro
OFT	1,10 Fenantrolina
p/v	Peso/volume
P50%	Fração originada da precipitação com 50% de sulfato de amônio
P95%	Fração originada da precipitação com 95% de sulfato de amônio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial de hidrogeniônico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
rpm	Rotações por minuto
SDS	Duodecilsulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N''-tetrametil etilenediametilamina
TI	Troca iônica
TLCK	N α -p-tosil-l-lisina clorometil cetona
TPCK	N-tosil-l-fenilalanina clorometil cetona
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
U	Unidades
v/v	Volume/volume
vol	Volume
V	Volts
W	Watt
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

Lista de figuras e tabelas

Figura 01. Estágios de ativação do oxigênio	14
Figura 02. Estrutura molecular de FeSOD	21
Figura 03. Estrutura molecular de Cu/ZnSOD	22
Figura 04. Modelo molecular do centro ativo das superóxido dismutases	23
Figura 05. Mecanismo de ação proposto para Cu/ZnSOD	24
Figura 06. Volume de vendas de pesticidas químicos e biológicos	27
Figura 07. Determinação da curva de redução do NBT	42
Figura 08. Determinação do tempo ótimo de exposição do ensaio à luz	42
Figura 09. Determinação da curva de redução do NBT para Cu/ZnSOD bovina	43
Figura 10. Determinação da curva de redução do NBT para o extrato P95% de <i>Metarhizium anisopliae</i>	43
Figura 11. Análise eletroforética da atividade de SODs do extrato P95%	45
Figura 12. Análise eletroforética em SDS-PAGE (15%) dos extratos celulares de <i>Metarhizium anisopliae</i>	45
Figura 13. Perfil cromatográfico do extrato de <i>Metarhizium anisopliae</i> após cromatografia de troca iônica	47
Figura 14. Análise eletroforética da atividade SOD, das frações eluídas da cromatografia de troca iônica	48
Figura 15. Análise eletroforética em SDS-PAGE (15%) das frações eluídas da cromatografia de troca iônica	49
Figura 16. Análise eletroforética em SDS-PAGE (12%) das frações eluídas da cromatografia de troca iônica	50
Figura 17. Determinação da atividade de Cu/ZnSOD, na fração 8 da cromatografia de troca iônica	50
Figura 18. Determinação da atividade de FeSOD, na fração 25 da cromatografia de troca iônica	51
Figura 19. Perfil cromatográfico da fração DEAE(6-10) em cromatografia de afinidade	53
Figura 20. Análise da atividade de SOD das frações eluídas da coluna de afinidade	54

Figura 21. Análise eletroforética em SDS-PAGE (15%) das frações eluídas da cromatografia de afinidade	54
Tabela 1. <i>Metarhizium anisopliae</i> e seu uso no controle biológico de pragas	29
Tabela 2. Etapas de purificação de Cu/ZnSOD de <i>Metarhizium anisopliae</i>	44
Tabela 3. Caracterização da atividade SOD da proteína purificada de <i>Metarhizium anisopliae</i>	52

Resumo

As superóxido dismutases são metaloenzimas amplamente distribuídas entre os organismos e desempenham um importante papel na defesa celular contra os danos provocados por espécies reativas de oxigênio mediados pelo radical superóxido, um subproduto do metabolismo oxidativo. As SODs são classificadas em quatro grupos, dependendo de seu cofator metálico, em CuZnSOD; MnSOD, FeSOD e NiSOD. Além de sua função intrínseca, as SODs estão implicadas em outros processos com a adesão e a sinalização celular e na patogenicidade. Em particular, a participação das SODs em processos patogênicos tem se mostrado muito ampla, abrangendo os mais variados sistemas patógeno-hospedeiro. Visando estudar o processo de penetração do fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* em carrapatos, as enzimas com atividade SOD foram descritas e parcialmente caracterizadas, apresentando três tipo de atividade: CuZn, Mn e Fe.

Para melhor caracterizar as SODs de *M. anisopliae*, neste trabalho purificamos e caracterizamos a CuZnSOD. A enzima apresenta uma massa presumida em géis desnaturantes de ~20 KDa. A etapa de cromatografia de gel filtração foi substituída, com sucesso, por uma cromatografia de afinidade, apresentando ganho no rendimento total de 92%, em relação ao rendimento final encontrado na purificação utilizando-se resina Sephacel Sephadex G-150. Em relação à amostra inicial (P95%), o fator de purificação foi de 140% maior. Padronizamos um ensaio enzimático de quantificação e discriminação da atividades SODs, que se mostrou adequado e eficaz para a detecção de SODs em extratos celulares brutos e/ou fracionados. Nos ensaios espectrofotométricos, a CuZnSOD purifica de *M. anisopliae* foi inibida por 2 mM de KCN. Inibição da atividade em presença de 2 mM de peróxido de hidrogênio também foi observada. PMSF (2 mM) e cloreto de mercúrio (5 mM) inibiram a atividade da enzima, indicando que pode estar ocorrendo uma inibição inespecífica através de resíduos de serina e cisteínas não reativos, presente na enzima.

A purificação de cada uma das SODs descritas para *M. anisopliae*, é um passo importante para a elucidação da função destas enzimas durante processo metabólicos e no processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros. A produção de anticorpos mono- e policlonais contra estas proteínas, e sua posterior aplicação na determinação da localização celular de cada uma, é um destes passos. Além disso, pode facilitar o isolamento de genes que codificam para as SODs, possibilitando a obtenção de mutantes e/ou linhagens transgênicas e estudos da expressão destas proteínas.

1. Introdução

1.1 Radicais livres e estresse oxidativo

Um dos paradoxos da biologia na terra é que a mesma molécula que sustenta o desenvolvimento aeróbio, o oxigênio, e que é essencial para o metabolismo energético e respiração, pode ser igualmente danosa e estar implicada em diversas condições degenerativas (MARX, 1985).

Os radicais livres de oxigênio, ou oxigênio ativado, têm sido implicados em diversos estresses ambientais de plantas e animais e participam em muitas, se não em todas, as condições degenerativas em células eucarióticas (McCORD, 2000). A peroxidação de lipídios (FRANKEL, 1985), o *crosslinking* e inativação de proteínas (GARDNER & FRIDOVICH, 1991; DAVIES, 1987; STADTMAN 1986) e mutações no DNA (LI *et al.*, 1999; BEYER *et al.*, 1991; DAVIES, 1987; OLEINICK *et al.*, 1986; IMLAY & LINN, 1986) tem a participação de radicais livres, mas como as reações ocorrem rapidamente e frequentemente são componentes de complexas cadeias de reação, usualmente só seus efeitos são detectados. As formas ativas de oxigênio são importantes na biossíntese de moléculas orgânicas complexas, na polimerização de constituintes da parede celular e na defesa contra patógenos (McKERSIE, 2000; McCORD, 2000; RAHA & ROBINSON, 2000).

A ativação do oxigênio pode ocorrer por dois diferentes mecanismos: absorção de energia suficiente para reverter o *spin* de um elétron não-pareado e a redução monovalente. O birradical de oxigênio é um *triplet* em seu estado natural, pois os elétrons têm *spin* paralelo. Se o *triplet* de oxigênio absorve energia suficiente para reverter o *spin* de um dos elétrons não-pareados, isto irá formar o estado *singlet*, no qual os elétrons têm *spin* opostos. Esta ativação sobrepuja a restrição de *spin* e o oxigênio *singlet* pode, conseqüentemente, participar nas reações envolvendo transferência simultânea de dois elétrons (redução divalente). Uma vez que os elétrons pareados são comuns em moléculas orgânicas, o oxigênio *singlet* é muito mais reativo com relação às moléculas orgânicas do que o *triplet* (McKERSIE, 1996)

O segundo mecanismo de ativação é a redução monovalente de oxigênio para formar superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e

finalmente água (Figura 1). O primeiro passo na redução do oxigênio formando superóxido é endotérmico, mas as reduções subsequentes são exotérmicas.

O radical superóxido pode agir tanto como um oxidante como um redutor; pode oxidar enxofre, ácido ascórbico ou NADPH; e pode reduzir citocromo C e íons metálicos. Uma reação de dismutação que leva a formação de peróxido e oxigênio pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisada por uma enzima, a superóxido dismutase. Na sua forma protonada (pKa = 4,8) o superóxido forma o radical peridróxido (OOH) que é um poderoso oxidante (GEBICKI & BIELSKI, 1981), mas sua relevância biológica é provavelmente menor por causa de sua baixa concentração em pH fisiológico.

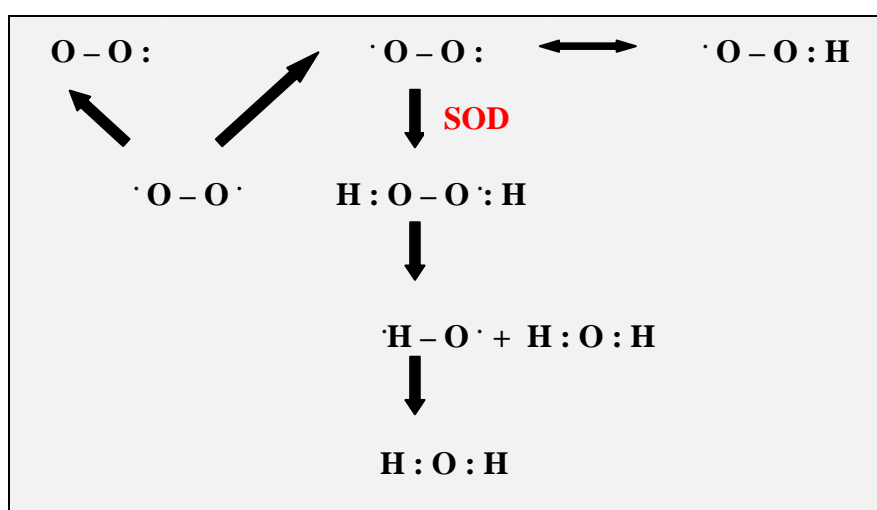
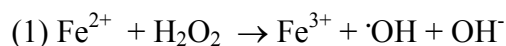
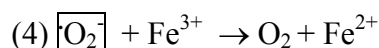
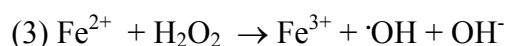
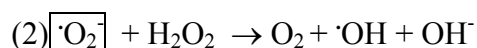


Figura 1. Estágios de ativação do oxigênio. ($O-O\cdot$) Oxigênio *triplet* ($O-O:$) Oxigênio molecular; ($\cdot O-O:$) Superóxido; ($\cdot O-O:H$) Peridróxido; ($H:O-O:H$) Peróxido; ($H-O\cdot$) Hidróxido; e ($H:O:H$) Água.

Apesar de o peróxido de hidrogênio não ser um radical, pois seus elétrons são pareados (Figura 1), ele é um composto importante, pois atravessa prontamente a membrana celular, e, portanto, não é compartimentalizado. Numerosas enzimas (e.g. peroxidases) usam o peróxido de hidrogênio como substrato em reações de oxidação envolvendo síntese de complexos orgânicos. Fenton descreveu no final do século XIX (FENTON, 1894; 1899 *Apud* HALLIWELL & GUTERIDGE, 1999) o potencial oxidante do peróxido de hidrogênio em misturas de sais ferrosos. Quarenta anos depois, o radical hidroxila foi identificado como a espécie reativa nestas reações (reação 1) (HABER & WEISS, 1934 *Apud* HALLIWELL & GUTERIDGE, 1999):

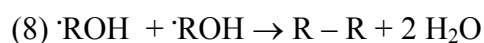
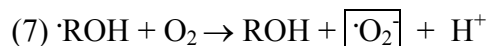
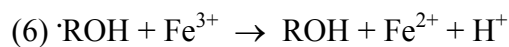
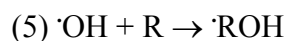


Nos sistemas biológicos a disponibilidade de íons ferro limita o intervalo de reações, mas a reciclagem do ferro das formas férrica para ferrosa, pelo agente redutor, pode manter a reação de Fenton, levando a geração de radicais hidroxila. Um reagente redutor é o radical superóxido, como mostrado abaixo:



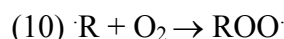
por essa razão, na presença de quantidades mínimas de ferro, a reação entre o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio irá formar o radical altamente reativo hidroxila e iniciar a oxidação de compostos orgânicos. Outros metais, além do ferro, podem participar nessas reações de transferência de elétrons pela alternância entre os estágios oxidado e reduzido.

A oxidação de compostos orgânicos pode ocorrer por duas reações. A adição de OH na molécula orgânica, ou a retirada de um átomo de hidrogênio (reação 5). O radical hidroxila reage com um substrato orgânico, formando um hidroxilato que é oxidado pelos íons ferrosos, por oxigênio ou outros agentes para um produto estável (reação 6 e 7). Os produtos hidroxilados podem dismutar-se para formar produto e água (reação 8).



Na reação de subtração, o radical hidroxila oxida o substrato orgânico formando água e um radical orgânico (reação 9). O produto tardio tem um elétron não pareado e assim pode reagir com o oxigênio em seu estado *triplet* (reação 10). A adição do oxigênio *triplet* aos radicais de carbono pode levar a formação de um radical peróxido, o qual pode retirar hidrogênio de outra molécula orgânica, levando a formação de um segundo radical

carbono (reação 11). Essa cadeia de reações é o motivo pelo qual os radicais livres de oxigênio causam danos extremos quando excedem a concentração de equilíbrio.



Para neutralizar esta atividade, os organismos desenvolveram ao longo da evolução um grande número de mecanismos. Esses mecanismos asseguram que os radicais superóxido e o peróxido de hidrogênio não entrem em contato. Os antioxidantes, tais como o urato, a glutatona, o ascorbato e o α -tocoferol, a catalase, as peroxidases e as superóxido dismutases (SODs), que convertem superóxido a peróxido de hidrogênio, desempenham um papel importante nessa defesa (YU, 1995; McKERSIE, 2000). A associação estreita entre a atividade dos sistemas de defesa antioxidante e longevidade, por exemplo, já foi sugerida para *Drosophila* (ARKING *et al.*, 1991), *Musca domestica* (BAYNE & SOHAL, 2002), *Podospora anserina* (OSIEWACZ & STUMPFERL, 2001) e *Saccharomyces cerevisiae* (WAWRYN *et al.*, 2002), entre outros.

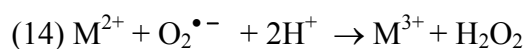
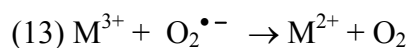
1.2 Superóxido dismutases (EC 1.15.1.1)

1.2.1 Aspectos gerais

A enzima superóxido dismutase (SOD) foi primeiro isolada por MANN & KEILIN em 1938 e cogitava-se que fosse uma proteína de armazenamento de cobre. Subseqüentemente, essa enzima foi identificada com diversas denominações: eritrocupreína, indofenol oxidase, e tetrazolium oxidase, até que sua função catalítica foi descoberta em 1969 por McCORD & FRIDOVICH. As SODs são descritas como metaloenzimas antioxidantes que catalisam a redução desproporcional (dismutação) de radicais superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ (reação 12):



Geralmente se postula que em todas as SODs o íon metal (M) catalisa a dismutação de radicais superóxido através de um mecanismo cíclico de oxidação-redução (reação 13 e 14) (PROMISE, 2000).



As SODs já foram isoladas de uma variedade de organismos e podem ser agrupadas, de acordo com seus grupos prostéticos metálicos, em Cu/Zn, Fe, Mn e cambialísticas (FRIDOVICH, 1974 e 1975; MARTIN *et al.*, 1986). As formas cambialísticas são as SODs que utilizam tanto ferro como manganês no seu centro ativo, dependendo da disponibilidade de metal no meio (MARTIN *et al.*, 1986).

Em 1996, um novo tipo de SOD, contendo níquel como único metal ligante foi encontrado na bactéria filamentosa *Streptomyces* spp. (YOUN *et al.*, 1996a, 1996b) e até o momento só existem NiSODs descritas para espécies de *Streptomyces*. Essas NiSODs distinguem-se de outras formas de SOD tanto com relação ao metal ligante, quanto na seqüência de aminoácidos (CHOUDHURY *et al.*, 1999). O gene que codifica NiSOD (*sodN*) não apresenta nenhuma similaridade aparente, tanto na seqüência de nucleotídeos quanto na seqüência predita de aminoácidos, com as outras SODs ou com outras proteínas conhecidas, formando uma família distinta das demais SODs (LEE *et al.*, 2002b). Outro dado interessante a respeito das SODs de *Streptomyces* spp., é a existência de uma Fe/ZnSOD cambialística, codificada pelo gene *sodF*, e classificada na família das SODs que contêm Fe ou Mn (KIM *et al.*, 1998; CHUNG *et al.*, 1999a; KIM *et al.*, 2000a).

A distribuição das diferentes formas de SOD é considerada característica do estágio evolucionário do organismo e das organelas celulares (BORDO *et al.*, 1994). A MnSOD e a FeSOD são consideradas formas anciãs devido à sua distribuição determinada pela evolução ou pela posição filogenética dos organismos onde estão mais frequentemente presentes.

O padrão geral indica que a Cu/ZnSOD é essencialmente uma enzima eucariótica, enquanto a FeSOD é essencialmente uma enzima procariótica e, a MnSOD está presente tanto em procariotos quanto em eucariotos (BANNISTER *et al.*, 1987). No entanto, existem várias exceções, pois alguns organismos eucariotos podem não ter Cu/ZnSOD (ASADA *et al.*, 1980 *Apud* HALLIWELL & GUTERIDGE, 1999), enquanto algumas

bactérias podem apresentar esta enzima. BENOVA & FRIDOVICH (1994) descreveram que um mutante de *Escherichia coli* incapaz de produzir Mn- ou FeSOD, sobrevive por ação de uma CuZnSOD que não havia sido detectada antes. As falhas em detectar essa atividade previamente foram atribuídas à localização periplasmática da enzima, à sua sensibilidade ao pH e à temperatura, e à sua relativa escassez. CuZnSODs têm sido encontradas em diversos organismos procarióticos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Pasteurella multocida* (KROLL *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1998).

A enzima FeSOD é característica de organismos procarióticos, mas SODs contendo Fe também são encontradas em alguns organismos eucarióticos, como na alga *Chlamydomonas reinhardtii* (CHEN *et al.*, 1996), no cloroplasto de plantas superiores (BOWLER *et al.*, 1992; VAN CAMP *et al.*, 1997; KLIEBENSTEIN *et al.*, 1998), em alguns protistas, como *Euglena gracilis* (KANEMATSU & ASADA, 1979) *Crithidia fasciculata* (ASADA, 1998 *Apud* GRACE, 1990), e em fungos, como o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (KONO *et al.*, 1995) e o entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae* (SCHRANK *et al.*, 1993). A descoberta de FeSOD nestes últimos organismos é muito importante, pois até o momento só haviam sido descritas duas formas de SOD em fungos filamentosos: uma CuZnSOD citosólica e uma MnSOD mitocondrial (MAYER *et al.*, 2001).

O fato de as FeSODs serem consideradas procarióticas, mas também poderem ser encontradas em cloroplastos, reforça a teoria de origem endossimbiótica desta organela (GRACE, 1990), o mesmo acontecendo com a MnSOD comumente presente em organismos procarióticos e encontrada em mitocôndrias de organismos eucarióticos (FRIDOVICH, 1997; HALLIWELL & GUTERIDGE, 1999).

1.2.2. Genes sod, sua regulação e estudos de mutação

Diversas formas de SOD têm sido clonadas de uma variedade de plantas e outros organismos (e.g. SCANDALIOS, 1990; BOWLER, 1992; KIM *et al.*, 2000b; PESCE *et al.*, 2000).

Na bactéria *E. coli*, a atividade SOD é regulada na transcrição pelo operon *soxRS* (FARR & KOGOMA, 1991). As investigações do mecanismo regulatório da expressão de SOD em plantas, por exemplo, iniciaram-se há aproximadamente uma década (BOWLER

et al., 1992). Os dados até agora têm demonstrado que a atividade de SOD nas células é aumentada em resposta a diversos estresses xenobióticos e ambientais, incluindo compostos químicos, luz forte, excesso de água ou seca. Aparentemente, cada uma das isoenzimas SOD é independentemente regulada de acordo com o grau de estresse oxidativo experimentado nos respectivos compartimentos celulares, mas os mecanismos moleculares desta comunicação ainda são desconhecidos. BOWLER *et al.* (1992) sugeriram que essa tarefa pode ser mediada por produtos únicos da peroxidação de lipídios em cada organela, se difundindo do sítio do estresse oxidativo até o núcleo, onde podem ativar a transcrição de genes *sod*. CHANG *et al.* (2002) e ST CLAIR *et al.* (2002) propuseram um modelo de regulação transcripcional e indução de genes humanos de CuZnSOD (*sod1* ou *sodC*) e MnSOD (*sod2* ou *sodA*) por fatores ambientais e fatores de transcrição tecido-específicos, respectivamente.

Estudos utilizando mutações e experimentos de complementação de função de superóxido dismutases têm elucidado a importância destas enzimas. Essas demonstrações têm sido realizadas em bactérias (FARR *et al.*, 1986; PURDY & PARK, 1994; LIOCHEV & FRIDOVICH, 1997), em leveduras (BILLINSKI *et al.*, 1985; BOWLER *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 1992), em *Drosophila* (PHILLIPS *et al.*, 1989), em nematódeos (ISHII *et al.*, 1990), em fungos filamentosos (CHARY *et al.*, 1994a; LEE *et al.*, 2002a) e em camundongos (LEBOVITZ *et al.*, 1996). A consequência da falta de FeSOD (*sodB*) constitutiva e de MnSOD (*sodA*) induzida em *E. coli* inclui a diminuição da taxa de crescimento dependente de oxigênio, auxotrofia nutricional, hipersensibilidade a compostos redutores cíclicos, como paraquat e quinonas, e a diminuição da taxa espontânea de mutagêneses (TOUATI, 2002). Em leveduras, foram encontradas deficiências similares em cepas que não tinham CuZnSOD citosólica ou MnSOD mitocondrial.

Poucos genes SOD foram caracterizados em fungos, entre eles *sod1* (CuZnSOD) de *Neurospora crassa* (CHARY *et al.*, 1994a; 1994b); *sod2* (MnSOD) de *Penicillium chrysogenum* (DÍEZ *et al.*, 1998), *Aspergillus fumigatus* (CRAMERI *et al.*, 1996) e *Ganoderma microsporium* (PAN *et al.*, 1997); *sod1* e *sod2* de *Saccharomyces cerevisiae* (CHANG & KOSMAN, 1990; CHANG *et al.*, 1991); e *sod2* de *Colletotrichum graminicola* (FANG *et al.*, 2002).

1.2.3 As enzimas FeSOD e MnSOD

As isoenzimas Fe- e MnSODs constituem uma família estrutural (PARKER *et al.*, 1987; PARKER & BLAKE, 1988) separada das CuZnSODs e são distribuídas desigualmente entre os reinos, além de ficarem em compartimentos celulares diferentes (GRACE, 1990). Existe uma alta homologia estrutural entre as seqüências primárias de FeSOD e MnSOD, que se diferenciam da CuZnSOD (BORDO *et al.*, 1994), sugerindo que as Fe- e MnSODs possuem um ancestral comum que evoluiu independentemente das CuZnSODs. A distribuição filogenética destas enzimas suporta essa idéia (FRIDOVICH, 1974b; GRACE, 1990).

A FeSOD, em particular, é encontrada em anaeróbios obrigatórios e diazotróficos aeróbios (exclusivamente), aeróbios facultativos (exclusivamente ou com MnSOD), no citosol de cianobactérias, no estroma dos cloroplastos de plantas superiores e nos protozoários. A MnSOD é amplamente distribuída entre os organismos, sendo encontrada principalmente em mitocôndrias (FRIDOVICH, 1997) e, LIU *et al.*, (2001) descreveram a existência de uma MnSOD secretada por *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*.

A estrutura tridimensional de diversas FeSODs tem sido determinada (STODDARD *et al.*, 1990; COOPER *et al.*, 1995; LAH *et al.*, 1995; SCHMIDT *et al.*, 1996; LIM *et al.*, 1997). O monômero dobra-se em dois domínios. O domínio N-terminal consiste de duas longas α -hélices antiparalelas. O domínio C-terminal contém uma folha β -pregueada formada por três β -fitas cercadas por quatro a seis α -hélices. O átomo de ferro é ligado por dois resíduos de cada hélice N-terminal e dois resíduos dos *loops* no domínio C-terminal (figura 2 A). O centro ativo das FeSODs descritas é tetra coordenado, com o metal ligante arranjado em uma geometria bi-piramidal com resíduos de histidina e aspartato (figura 2 B).

As MnSODs e as FeSODs procarióticas são dímeros, enquanto as MnSODs de mitocôndrias são homotetrâmeros (SCANDALIOS, 1993). As formas diméricas possuem de um ou dois átomos metálicos por molécula, enquanto as formas tetraméricas possuem de dois a quatro átomos metálicos por molécula (BITTENCOURT, 1998; HALIWELL & GUTERIDGE, 1999).

A estrutura tridimensional e o centro ativo das MnSODs descritas é bastante semelhante ao das FeSOD (BORGSTAHL *et al.*, 1992; PROMISE, 2000). Nas duas formas, além da alta porcentagem de identidade na estrutura primária, a estrutura terciária

é muito similar, particularmente nas regiões do centro ativo e nos resíduos responsáveis pela formação do dímero. A estrutura quaternária do dímero é também bastante conservada.

Apesar das MnSOD e FeSOD apresentarem muitas propriedades comuns, elas são duas formas distintas, exibindo especificidade quase absoluta pelo metal (BEYER *et al.*, 1989). Embora outras isoenzimas SODs, tais como as cambialísticas de *Propionibacterium shermanii*, tenham atividade independente do metal presente (SEHN & MEIER, 1994), muitas das enzimas da família da Mn/FeSOD somente são ativas se o metal correto estiver presente (JACKSON & COOPER, 1998).

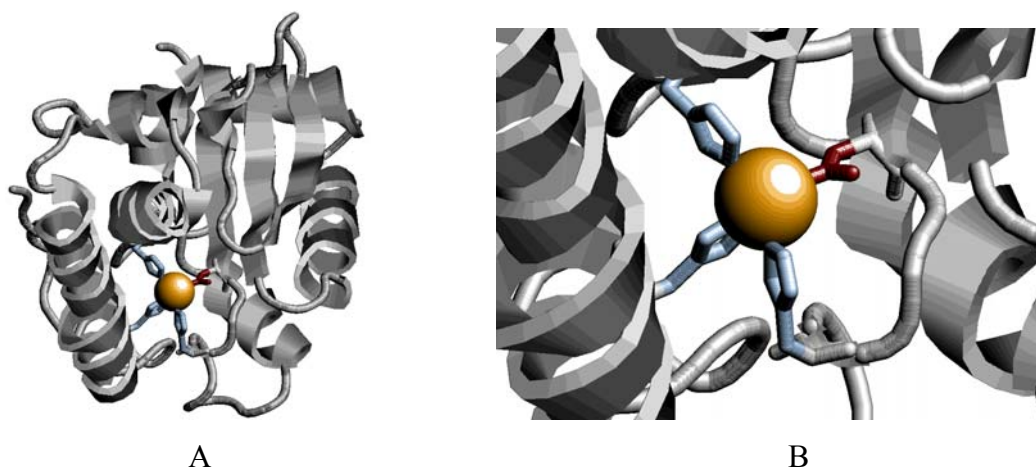


Figura 2. Estrutura molecular da FeSOD. A) estrutura tridimensional da FeSOD, B) Detalhe do centro ativo. Desenhados a partir de modelo descrito para FeSOD de *E. coli* (Cod. [1ISA](#) do *Protein Data Bank*), utilizando o programa RasMol (SAYLE & MILNER-WHITE, 1995). Em azul, os resíduos de histidina; em vermelho o resíduo de aspartato; em laranja, Fe⁺²; em cinza, β -fitas e α -hélices.

Em *E. coli* foi demonstrado que as enzimas FeSOD e MnSOD têm diferentes funções antioxidantes. A MnSOD é mais efetiva na proteção de danos ao DNA e a FeSOD é mais efetiva na proteção de enzimas citoplasmáticas (HOPKIN *et al.*, 1992). A MnSOD também pode reduzir danos celulares mediados por radicais de oxigênio em plantas transgênicas (BOWLER *et al.*, 1991). A FeSOD de *E. coli* é constitutiva, enquanto a manganês é induzida (BANNISTER *et al.*, 1987; HASSAN, 1988; FEE, 1991; HOPKIN *et al.*, 1992).

1.2.4 CuZnSOD

A CuZnSOD é a mais conhecida e melhor caracterizada das isoenzimas SOD. Sua estrutura consiste de uma chave-grega beta-barril com oito-fitas antiparalelas (Figura 3), a CuZnSOD existe como um homodímero com massa molecular de cerca de 32.000 Da e contém um átomo de cobre e um de zinco por subunidade (HASSAN, 1989). O cobre é específico, contudo o zinco pode ser substituído por outros metais sem diminuição da atividade (JAMES, 1994). O centro ativo da CuZnSOD está localizado no fundo de um canal profundo do lado de fora do β -barril entre dois *loops* largos (Figura 3B e Figura 4).

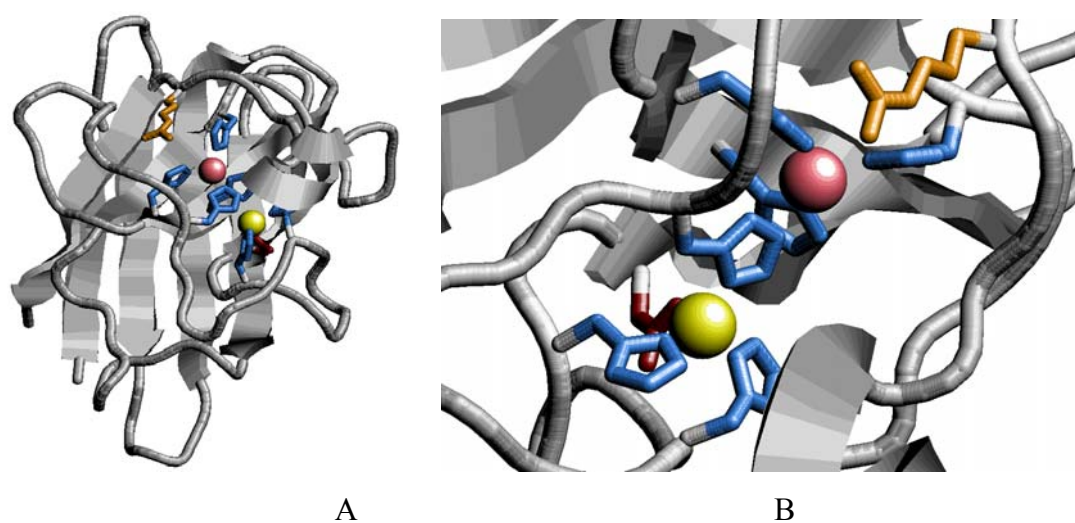


Figura 3. Estrutura molecular da CuZnSOD. A) Estrutura tridimensional da CuZnSOD. B) Detalhe do centro ativo. Desenhados a partir de modelo descrito para CuZnSOD de levedura (Cod. 1SDY do *Protein Data Bank*), utilizando o programa RasMol (SAYLE & MILNER-WHITE, 1995). Em azul, os resíduos de histidina; em vermelho o resíduo de aspartato; em laranja, o resíduo de arginina; em amarelo, Zn^{+2} ; em rosa, Cu^{2+} ; em cinza, β -fitas e α -hélices.

Durante a reação catalítica das CuZnSODs, o Cu^{2+} é ciclicamente reduzido e oxidado durante encontros sucessivos com o substrato superóxido no centro ativo, conforme ilustrado na Figura 5. Segundo TAINER *et al.* (1983) esse mecanismo de ação proposto para CuZnSOD e baseado no íon-cobre alternando-se entre os estados de oxidação +1 e +2 necessita de uma cadeia lateral de histidina coordenada ao Cu^{2+} durante parte do ciclo e ligada ao Zn^{2+} , outro participante de importância é uma cadeia lateral de arginina (Figura 5).

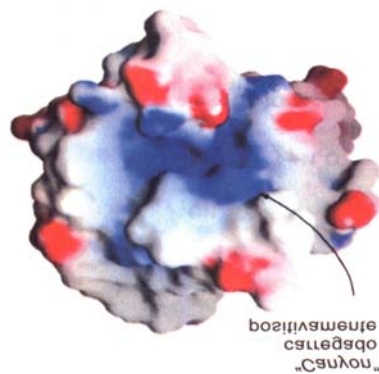


Figura 4. Modelo Molecular do centro ativo das superóxido dismutases. O centro ativo da superóxido dismutase está localizado num sulco (*Canyon*) positivamente carregado (azul) que está circundado por um anel de radicais com carga negativa (vermelho). O íone superóxido é atraído eletrostaticamente para o centro ativo com carga positiva (STRYER, 1996).

A CuZnSOD é encontrada no periplasma de bactérias (STEINMAN, 1993; BENOVA *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1998), no citosol de organismos eucarióticos (FRIDOVICH, 1997) tendo sido descritas formas extracelulares de CuZnSOD em alguns organismos eucarióticos (MARKLUND, 1990, 2002; LAUKKANEN *et al.*, 2000;

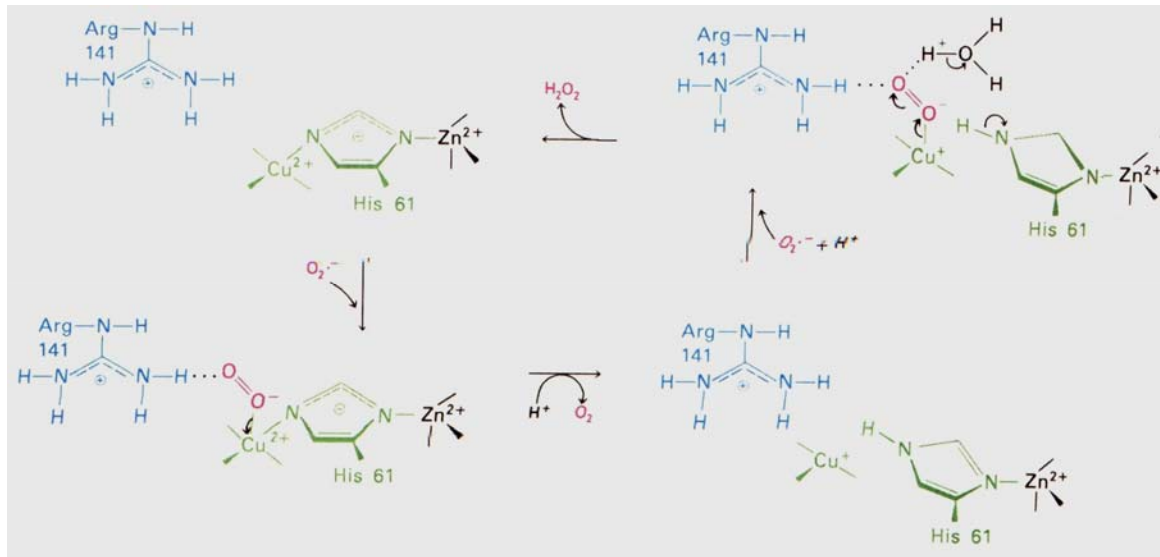


Figura 5. Mecanismo de ação proposto para CuZnSOD (TAINER *et al.*, 1983). O radical superóxido, doa um elétron para o Cu^{2+} ligado ao resíduo de histidina 61, alterando o estado de oxidação do Cu^{2+} para Cu^+ . A entrada de um próton, promove a ligação entre Cu^+ e a arginina 141, e a liberação de oxigênio molecular. Um novo radical superóxido e um próton, oxidam o Cu^+ para Cu^{2+} , promovendo o desligamento da arginina e a liberação de peróxido de hidrogênio.

SENTMAN *et al.*, 2002). Existem ainda, evidências que apontam para a existência de uma CuZnSOD mitocondrial (WEISIGER & FRIDOVICH, 1973 Apud INÁRREA, 2002) e uma lisossomal (GELLER & WINGE, 1982) em mamíferos. Em plantas ela também pode estar presente nos cloroplastos (BOWLER *et al.*, 1992; VAN CAMP *et al.*, 1997) e peroxissomos (BUENO *et al.*, 1995).

Através de análise imuno-histoquímica, BITTENCOURT (1998) determinou a localização subcelular da CuZnSOD de *M. anisopliae*, encontrando-a no citoplasma; no núcleo, junto à parede celular interna e externa, e em regiões condensadas que foram sugeridas como prováveis vesículas.

1.2.5 A participação das SODs na virulência e na patogenicidade

Além de sua função na prevenção de danos provocados pela presença de radicais superóxido produzidos pelos organismos durante seu metabolismo oxidativo, as SODs podem estar envolvidas numa série de outros processos, entre eles a patogenicidade.

As SODs podem participar na adesão celular e na sinalização molecular, uma vez que seu substrato (ânion superóxido, O_2^-), e seu produto (peróxido de hidrogênio, H_2O_2) têm sido implicados neste processo em animais e células vegetais (PRICE *et al.*, 1994; SALVEMINI *et al.*, 1989). Wu *et al.* (1998) sugeriram que, uma vez que o superóxido não é capaz de atravessar a membrana citoplasmática, a CuZnSOD localizada periplasmaticamente seria uma fator de virulência bacteriana, pois pode prover proteção para o periplasma, ou para constituintes da membrana, contra os radicais superóxido produzidos fora das células. A geração de espécies reativas de oxigênio no macrófago é um importante componente da resposta bactericida do hospedeiro e portanto, a proteção conferida pelas CuZnSOD periplasmática, é particularmente importante para a sobrevivência intracelular de patógenos, como *Salmonella typhimurium* e *Mycobacterium tuberculosis*. De fato, salmonelas deficientes em CuZnSOD têm maior sensibilidade à atividade bactericida do superóxido, reduzindo a sua letalidade, e diminuindo a persistência no fígado e no baço em modelos de infecção oral e peritoneal de camundongos, respectivamente (FARRANT *et al.*, 1997).

Alguns dados interessantes a respeito da estreita relação entre as SODs e a patogenicidade provêm de estudos de mutação. Por exemplo, mutações do gene *sodB*

(FeSOD) da bactéria *Bordetella pertussis*, reduzem a produção de toxinas e adesinas, fatores de virulência conhecidos (KHELEF *et al.*, 1996 *Apud* TOUATI, 2002). Para outros patógenos, mutantes da SOD citosólica e da SOD periplasmática têm a sua virulência atenuada, dependendo do local e do modo de infecção e/ou da resistência à morte por macrófagos (LYNCH & KURAMITSU, 2000 *Apud* TOUATI, 2002).

As SODs também podem estar envolvidas na biogênese da parede celular e na secreção de proteínas em fungos, uma vez que mutações em genes envolvidos neste processo em *Aspergillus nidulans* afetam a secreção de proteases extracelulares e causam defeitos na biogênese da parede celular (LEE *et al.*, 2002a). Mutante nulos dos genes SOD de *Saccharomyces cerevisiae* são deficientes na esporulação, têm alta taxa de mutações e são deficientes na biosíntese de lisina e metionina (LIU *et al.*, 1992).

Diversos estudos (REX *et al.*, 1990; HAMILTON *et al.*, 1995; HOLDOM *et al.*, 1995) têm demonstrado que a adição de SOD e catalase exógena *in vitro* s podem inibir a capacidade normal de neutrófilos para danificar hifas de *Aspergillus fumigatus* durante infecções. Portanto, SODs podem ser um fator de virulência, agindo como um acessório ou em conjunto com outros fatores de virulência descritos para espécies de *Aspergillus* (HOLDOM *et al.*, 1996).

Uma evidência importante do papel relevante das superóxido dismutases na virulência de fungos entomopatogênicos é o descrito por BORGES *et al.* (1993) em que a mistura do feromônio de alarme do percevejo *Nezara viridula* e suas frações sintéticas são capazes de inibir a germinação do esporo do fungo. Esse efeito se deve à presença de dois componentes voláteis [o trans-2-decenal (TD) e o trans-2-hexenal (TH)] cuja degradação provoca a liberação de radicais superóxido que podem estar atuando sobre o parasita, causando a inibição irreversível da germinação do esporo.

LAMBOY *et al.* (1995) encontraram evidências de que a regulação local da atividade de SOD pode ter um papel crítico durante a germinação, adesão e/ou iniciação do apressório do fungo fitopatogênico *Uromyces appendiculatus*.

1.3 Controle Biológico

Atualmente, existe uma tendência ao aumento do emprego de microrganismos no controle de artrópodes, seja devido aos problemas decorrentes do uso indiscriminado de agrotóxicos e outros produtos químicos, seja pela poluição e desequilíbrio ecológico

causado por eles. Outro grande problema, e que vem gradativamente aumentando, é o surgimento de resistência dos artrópodes aos pesticidas mais utilizados. Além disso, os gastos com produtos químicos no controle de doenças e pragas agrícolas em todo mundo são estimados em quase 6 bilhões de dólares, dos quais 2 bilhões são gastos só nos Estados Unidos. Somente o estado da Flórida perde, anualmente, 2 bilhões e meio de dólares pela queda na produção de alimentos e compra de insumos para combate a pragas e doenças. Só com insetos, as perdas e gastos com inseticidas por ano, neste mesmo estado americano, são da ordem de 1,3 bilhões de dólares, ou seja, mais da metade do total, considerando-se também fungicidas e herbicidas (MEEKER, 1987). Dentre os diversos produtos biológicos comercializados nos EUA, a maioria se aplica ao controle de insetos, diferentemente dos pesticidas químicos convencionais, cujo maior mercado é para controle de plantas invasoras (Figura 6) (CONGRESS, 1995). Sendo assim, o emprego de microrganismos, principalmente fungos filamentosos - que possuem a vantagem de se disseminarem a partir de uma única aplicação e não precisarem ser necessariamente ingeridos, como os vírus e as bactérias - vêm substituindo os produtos químicos tradicionalmente utilizados. Entretanto, isso não significa que estes produtos químicos venham a ter seu uso totalmente suprimido, pois o emprego de agentes biológicos em associação com o controle químico e outras práticas agrícolas pode ser uma alternativa eficiente de combate a pragas.

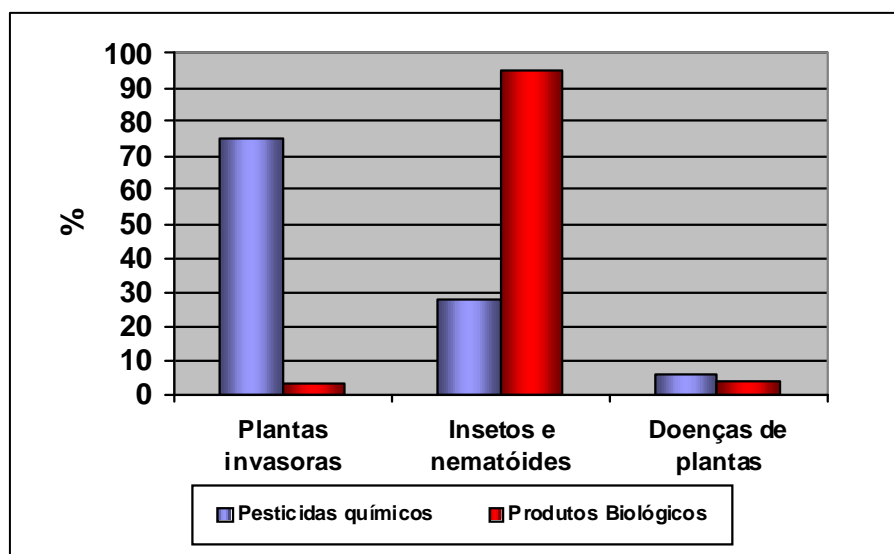


Figura 6. Volume de vendas para pesticidas químicos e biológicos (Modificado de: CONGRESS, 1995).

Embora o mercado mundial dos pesticidas biológicos esteja representado basicamente por dois grandes grupos de produtos, sendo que a maior parte deste mercado

cabe aos produtos à base de variedade da bactéria *Bacillus thuringiensis* (LYSANSKY & COOMBS, 1992), os fungos filamentosos já vêm sendo empregados na agricultura no controle de pragas e doenças em plantas (ALVES, 1998). Estima-se que estes sejam responsáveis por cerca de 80% das doenças de insetos (AZEVEDO, 1998) e talvez por isso, estes organismos tenham sido os primeiros a serem utilizados no controle biológico de insetos praga. Seu potencial de utilização no controle de pragas é conhecido desde o século XIX, quando *Metarhizium anisopliae* foi utilizado para controlar *Anisopliae austriaca* e *Cleonus punctuiventris* (CLARKSON & CHARNLEY, 1996 *Apud* METSCHNIKOFF, 1879; GILLESPIE, 1988). Desde então, muitas tentativas vêm sendo feitas no intuito de incrementar o seu uso; no entanto, poucos são os produtos disponíveis no mercado. A utilização restrita de fungos entomopatogênicos é devida, em grande parte, à limitação no conhecimento da complexa interação fungo/hospedeiro e ao tempo decorrido entre a infecção e a morte do hospedeiro.

1.3.1 Aplicação de *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico

M. anisopliae é um dos fungos filamentosos melhor estudados e infecta e mata diversas espécies de insetos e outros artrópodes (FERRON, 1981, 1978), entre eles pragas agrícolas e pecuárias, além de vetores de doenças humanas e animais. Devido a esse caráter entomopatogênico e acaricida, *M. anisopliae* é utilizado comercialmente no Brasil para controle biológico de diversos insetos praga de plantações e pastagens (Tabela 1) (ALVES, 1998, 1986).

Além disso, em trabalhos experimentais, *M. anisopliae* já foi testado com sucesso em larvas de *Musca domestica* (RENN *et al.*, 1999; BARSON *et al.*, 1994); em *Blatella germanica* (barata germânica) (KAAKEH *et al.*, 1996), vespas (HARRIS *et al.*, 2000), moscas da fruta (LEZAMA-GUTIERREZ *et al.*, 2000) e em moscas tsé-tsé.(KAAYA & MUNYIYI, 1995). Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade deste fungo para controlar algumas espécies de triatomídeos, vetores da Doença de Chagas (MESSIAS *et al.*, 1998; JUAREZ *et al.*, 2000). Esta utilização tem sido realizada não só para tratamento das áreas domiciliares, como as peridomiciliares, uma vez que esses vetores são muitas vezes introduzidos em ambiente doméstico pelo próprio homem, como no caso de *Rhodnius prolixus*, introduzido juntamente com folhas de palmeiras usadas para cobertura

das casas (BOS, 1988) e do *Triatoma dimilata* que é trazido junto com a lenha que é mantida próxima à casa (ZELEDON & RAABINOVCH, 1981).

A Tabela 1 sumariza alguns dos potenciais de utilização de *M. anisopliae* em diversas pragas e vetores de doenças, e sua situação atual em termos de pesquisa/aplicabilidade no Brasil.

Tabela 1. *Metarhizium anisopliae* e seu uso como agente no controle biológico de pragas (Modificado de AZEVEDO, 1998).

PRAGA/NOME VULGAR		APLICAÇÃO	SITUAÇÃO
<i>Deois flavopicta e</i>	Cigarrinhas	Pastagens	1
<i>Zulia enterrana</i>			
<i>Mahanarva fimbriolata e</i>	Cigarrinhas	Cana-de-açúcar	1
<i>M. postigata</i>			
<i>Panstrongylus megistis</i>	Barbeiro	Saúde	2
<i>Sphenophorus levis</i>	?	Citros	3
<i>Diploschema rotundicolle e</i>	Broca do café	Café	3
<i>Hypothenemus hampei</i>			
<i>Musca Domestica</i>	Mosca	Saúde	3
<i>Schistocerca pallens</i>	Gafanhoto	Plantações	3
<i>Heterotermes tenuis</i>	?	Cana-de-açúcar	2
<i>Boophilus microplus</i>	Carrapato	Pecuária, Indústria coureira	3
<i>Triatoma infestans</i>	Barbeiro	Saúde	2
<i>Cornitermes cumulans e</i>	Cupins	Madeiraira	2
<i>C. bequerti</i>			

1. Uso extensivo; 2. Em escala intermediária de desenvolvimento; 3. Em fase inicial de estudo.

A utilização de espécies de fungos como agentes biocontroladores de carrapatos como *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* (KAAYA *et al.*, 1996) e *Boophilus microplus* (RAND *et al.*, 1989; FRAZZON *et al.*, 2000), vem crescendo. Atualmente, o controle do carrapato *B. microplus* é feito principalmente com o uso de produtos químicos (GONZALES, 1995). Entretanto, a procura de novas formas de controle com o uso de biopesticidas, utilizando principalmente fungos entomopatogênicos

(FRAZZON *et al.*, 2000; CORREIA *et al.*, 1998; ZHIOUA *et al.*, 1997) tem sido cada vez mais necessária, não só devido ao aparecimento de populações resistentes a diferentes princípios químicos (NOLAN *et al.*, 1989), quanto pela necessidade de adequação ao mercado consumidor, que exige uma carne livre de resíduos químicos e dos impactos ambientais causados.

1.4 O fungo entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae (Metsc) Sorokin é um fungo filamentosso, de micélio septado, apresentando conidióforos característicos sobre os quais surgem conídios (geralmente uninucleados e cilíndricos de dimensões variáveis) em colunas compactas, cuja aderência ao hospedeiro varia com a linhagem do fungo (ALVES, 1998).

Os esporos são, em geral, unidades infectivas dos fungos, penetrando no inseto através do estômago, trato respiratório ou através da cutícula. O padrão mais usual de penetração é via cutícula, sendo esta uma das características que os torna atraentes para o controle de insetos sugadores, para os quais vírus e bactérias não apresentam eficiência.

O processo de infecção do hospedeiro por *M. anisopliae* se dá em fases sucessivas desde a adesão, germinação, diferenciação, penetração, colonização, reprodução e disseminação dos esporos para início de um novo ciclo. A penetração na cutícula de insetos é auxiliada pela secreção de enzimas hidrolíticas (CLARKSON & CHARNLEY, 1996; ST. LEGER *et al.*, 1990, 1991). Estas últimas têm sido objeto de estudos, na tentativa de se obter uma correlação entre secreção de enzimas proteolíticas, quitinolíticas e lipolíticas com a patogenicidade (PINTO *et al.*, 1997). No entanto, a única evidência que havia sido encontrada do envolvimento de enzimas proteolíticas na digestão de proteínas cuticulares era a obtida por GOETTEL *et al.* (1990), que utilizaram anticorpos marcados contra protease Pr1 purificada do fungo *M. anisopliae*. Mais recentemente, ST. LEGER *et al.* (1996) tentaram aumentar a velocidade de mortalidade dos insetos atacados por *M. anisopliae* inserindo cópias adicionais do gene Pr1 no genoma do fungo. Assim, esta proteína foi superproduzida constitutivamente na hemolinfa de *M. sexta*, ativando o sistema de profenol oxidase. A combinação dos efeitos causou redução de 25% do tempo de morte dos insetos e redução de 40% na quantidade de alimento ingerido em relação ao controle e, embora esta linhagem não seja capaz de se disseminar a partir de insetos infectados, e os autores tenham tentado valorizar esta modificação indesejável salientado

que ela seria vantajosa por impedir que um agente manipulado geneticamente fosse espalhado no ambiente, há de se ressaltar que uma das vantagens mais importantes deste tipo de controle, a disseminação e manutenção de esporos de fungos no ambiente, encontra-se perdida.

Além da grande variação no grau de infectividade entre as diversas linhagens já isoladas de *M. anisopliae*, também tem sido observada a perda da infectividade em linhagens altamente patogênicas e, embora a virulência seja uma função de muitos atributos e seja difícil a determinação dos fatores individuais que contribuem para a morte do hospedeiro, vários fatores têm sido apontados como possíveis determinantes de patogenicidade: (i) produção de toxinas; (ii) produção e secreção de enzimas hidrolíticas, quitinases, lipases e proteases (PINTO *et al.*, 1997); (iii) presença de micovírus com genoma dsRNA (MELZER & BIDOCHKA, 1998; BOGO *et al.*, 1996; GIMÉNEZ-PECCI, 1996; NUSS & KOLTIN, 1990; BUCK, 1986) e (iv) expressão diferenciada das superóxido dismutases (SODs) (BITTENCOURT, 1998), enzimas que atuam nos organismos vivos como um sistema de defesa contra radicais livres de oxigênio gerados pelo metabolismo.

SCHRANK *et al.* (1993) e BASSANESSI (1992) descreveram a presença de três SODs em *M. anisopliae*. Essas proteínas foram classificadas por estes autores como CuZnSOD, MnSOD e uma FeSOD.

2. Objetivos

Este trabalho tem por objetivo contribuir para a caracterização do sistema de proteção à radicais livres de oxigênio no fungo entomopatogênico e acaricida *M. anisopliae*. Neste sentido, a purificação e a caracterização das SODs permitirá a clonagem dos genes e o estudo das relações destas enzimas com o processo de invasão de hospedeiros.

2.1 Objetivos específicos

1. Determinar as condições para a purificação das SODs, CuZn, Mn e Fe, a partir de extratos de *M. anisopliae*.
2. Purificar e caracteriza a CuZnSOD de *M. anisopliae*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos e cultivo

A linhagem de *Metarhizium anisopliae* E6S2 utilizada foi obtida de insetos infectados (*Deois flavopicta*) isolada no Espírito Santo e cedida pelo Prof. João Lúcio Azevedo da Coleção da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

Para obtenção da massa micelial uma grande quantidade de esporos foi obtida a partir da inoculação de 10^6 esporos.g⁻¹ de uma suspensão prévia em 100g de arroz canino + 30mL de água, cozido e esterilizado por 30 minutos em autoclave (121°C e 1atm) e crescido em estufa à 30°C por 7 dias; essa suspensão de esporos assim obtida foi inoculada em 8 Litros de MCC* (10^6 esporos. mL⁻¹) e crescidos em fermentador (New Brunswick - Modelo T6025) à 28°C, com uma aeração de 1v/v e agitação de 200rpm, por 48 horas, quando então o micélio foi coletado, filtrado a vácuo e congelado em N₂ líquido para posterior liofilização.

*MCC: [6g NaNO₃.L⁻¹, 10g glicose.L⁻¹, 2g peptona.L⁻¹, 1,5g casamino ácidos.L⁻¹, 0,5g extrato de levedura.L⁻¹ e adicionados assepticamente 20mL.L⁻¹ de solução de sais (26g KCl.L⁻¹, 26g MgSO₄.7 H₂O. L⁻¹, 76g KH₂PO₄ . L⁻¹) e 0,4mL.L⁻¹ de solução de elementos traços (40mg Na₂B₄O₇.7H₂O.L⁻¹, 400mg CuSO₄.5H₂O. L⁻¹, 10mg FeSO₄.L⁻¹, 800mg MnSO₄.2H₂O. L⁻¹, 800mg Na₂MnO₄. H₂O.L⁻¹, 800mg ZnSO₄.7H₂O.L⁻¹). As soluções de sais e elementos traços foram autoclavadas separadamente e adicionadas após o autoclavagem do meio]

A linhagem XL1 Blue da bactéria *Escherichia coli* foi crescida em LB (SAMBROOCK *et al.*, 1989) a 37°C, *overnight*, sob agitação, para obtenção dos extratos celulares para controle das atividades de MnSOD e FeSOD em géis de atividade.

3.2 Extração de proteínas

3.2.1 Extração de proteínas de *M. anisopliae*

O micélio congelado (484g) foram liofilizados por 36 horas e a massa micelial seca (134g) foi macerada em nitrogênio líquido até a sua pulverização. O pó foi transferido para um tubo e ressuscitado em 75 mL de tampão de extração (TE) contendo inibidores de proteases (50 mM Tris.HCl pH 7.5 / 5 mM iodocetamida / 1 mM EDTA / 50 μ M TLCK / 50 μ M TPCK / 2 μ g.mL⁻¹ de leupeptina) (SPIEGELHALDER *et al.*, 1993). As proteínas solúveis foram separadas por centrifugação (10.000 rpm / 30 min / 4 °C), coletadas e estocadas a -20 °C; o precipitado foi lavado com 30 mL de TE, centrifugado e o sobrenadante novamente coletado e estocado a -20 °C. Este extrato foi denominado extrato total (TE).

3.2.2 Extração de proteínas de *E. coli*

A partir de 10 μ L de um pré-inóculo de *E. coli* XL-1, foram inoculados 15 mL de LB e incubados a 37 °C por 16 horas sob agitação. As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm / 10 min), ressuscitadas em 500 μ L de água destilada e imediatamente congeladas por imersão em nitrogênio líquido. Para ruptura da parede celular foi procedido rápido descongelamento em banho-maria a 37 °C, repetindo-se o procedimento por pelo menos 3 vezes. As células foram sonicadas quatro vezes, com intensidade de 3,5, por 30 segundos (Sonix Material Inc.). Durante este processo, o tubo foi mantido em gelo. Após sonicação, o extrato foi centrifugado (14.000 rpm / 15 min / 4 °C) e o sobrenadante foi coletado e estocado a -20 °C (SCHRANK, 1988).

3.3 Precipitação com sulfato de amônio

De acordo com os trabalhos de BITTENCOURT (1998), ROBINSON *et al.* (1996), IKEDA *et al.* (1995), MATSUMOTO *et al.* (1991), e SHANCHES-MORENO *et al.* (1989), as SODs podem ser precipitadas com diferentes concentrações de sulfato de amônio, como ocorre com outras proteínas. Neste trabalho optamos por uma precipitação com 50% e 95% de saturação com sulfato de amônio. A primeira saturação foi feita

acrescentando-se ao extrato total das proteínas (ET), sulfato de amônio suficiente para uma saturação de 50 % do extrato, procedendo-se a precipitação por duas horas a 4 °C e centrifugando-se a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sedimento foi separado do sobrenadante e ressuspenso em TE contendo inibidores. Essa fração foi denominada P50%. Ao sobrenadante desta primeira precipitação foi adicionado sulfato de amônio até uma saturação de 95%, com agitação durante 18 horas. O precipitado coletado da centrifugação (10.000 rpm / 15 min / 4 °C) desta segunda precipitação foi ressuspenso em TE contendo inibidores, e a fração denominada P95% .

3.3.1 Diálise

Sempre que necessário, as amostras e/ou frações cromatográficas foram dialisadas em membranas (12 KDa - SIGMA) previamente fervidas durante 5 minutos em solução contendo 1% de carbonato de cálcio / 01% de EDTA, lavadas exaustivamente em água destilada e estocas a 4 °C em etanol 70%.

As frações P50% e P95% foram dialisadas utilizando-se pelo menos 20X o volume da amostra de tampão 10 mM Tris-HCl / 1mM EDTA, pH 7,5 até que não fosse mais detectado amônio nas amostras, seja por medidas de condutividade ou utilizando o reagente de NESLERR (BARNES & SUDGEN, 1990). Essas frações foram armazenadas a -20 °C para posterior análise.

As frações provenientes das cromatografias foram dialisadas em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7,8, até que a presença de sal não fosse mais detectada por alteração na condutividade.

3.3.2 Quantificação de proteínas

O método utilizado foi o microensaio descrito por BRADFORD (1976). A 160 µL de cada amostra, ou diluição, foram adicionados 60 µL de reagente de Bradford (0,01% azul de bromofenol G-250 (p/v)/ 5% etanol (v/v)/ 10% ácido fosfórico (v/v)), incubado à temperatura ambiente por 15 minutos e a seguir, foi feita a leitura da absorbância a 595nm. Albumina sérica bovina (BSA), de 8µg a 70µg.mL⁻¹ (p/v), foi utilizada para curva padrão.

3.4 Cromatografias

Todas as cromatografias foram realizadas em purificador automático Äkta prime (Amersham Bioscience), a 4 °C. As frações coletadas foram analisadas por absorbância em luz U.V (280 nm) em espectrofotômetro (Ultraspec 2000 - Pharmacia Biotech) e tiveram seu pH e condutividade determinados. Alíquotas de cada fração foram separadas para análise eletroforética em gel de poliacrilamida, quantificação de proteínas totais e atividade enzimática.

3.4.1 Cromatografia em resina de troca iônica (TI)

Diversos pesquisadores, entre eles IKEDA *et al.* (1995), BITTENCOURT (1998), HATZINIKOLAOU *et al.* (1997) e ROBINSON *et al.* (1996), utilizaram colunas de troca iônica na purificação parcial de SODs, sendo a mesma estratégia adotada neste trabalho.

A fração P95% (15 mL) foi aplicada em 15 mL de resina DEAE-Sepharose em uma coluna XK 16/10 (Amersham Bioscience) equilibrada com tampão 50 mM Tris.HCl / 1mM EDTA / pH 7,5, e eluída com 100 mL do mesmo tampão acrescido de cloreto de sódio, em um gradiente de 0 a 1,2 M. O fluxo utilizado foi de 2 mL/min e as frações coletadas foram de 5 mL. As frações de proteínas não retidas na resina foram re-cromatografadas para confirmar a não ligação.

As frações que contiveram atividade SOD foram separadas para posterior aplicação em coluna de afinidade, e denominadas de *DEAE*-(números das frações de origem).

3.4.2 Cromatografia em resina de afinidade

Como uma das características das SODs é possuir no seu centro ativo alguns aminoácido expostos com afinidade por íons metálicos, tais como histidinas, pode-se separá-las de acordo com esta afinidade por IMAC (*immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography*), cromatografia de afinidade por metal imobilizado.

Foram efetuadas duas cromatografias de afinidade utilizando diferentes íons metálicos imobilizados: Cu²⁺ e Fe²⁺.

Cada pool separada na cromatografia em resina de troca iônica foi aplicado, em seu volume total, em uma coluna pré-empacotada, *HiTrap Chelating Sepharose HP* (Amersham Biosciences) de 1 mL, saturada com Cu^{2+} ou Fe^{+2} , e equilibrada com tampão de ligação. A ligação e a eluição das proteínas não ligadas na resina foram feitas utilizando-se tampão contendo 0,02 M de fosfato de potássio / 1 M cloreto de sódio, pH 7,8. As proteínas ligadas foram recuperadas por eluição competitiva utilizando-se gradiente de 0-100% de tampão 0,02M fosfato de potássio / 1 M cloreto de amônio no mesmo tampão de ligação. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min e as frações coletadas de 3 mL.

3.5 Ensaio Enzimático

BITTENCOURT (1998) padronizou um novo método para a quantificação de SODs, baseado nas técnicas desenvolvidas por BEAUCHAMP & FRIDOVICH (1971), tendo por base a detecção espectrofotométrica do formazan (produto da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) mediada pelos radicais superóxido liberados durante a fotorredução da riboflavina). Uma vez que este ensaio é bastante sensível e susceptível as condições de iluminação existentes, o mesmo foi modificado para ser utilizado neste trabalho.

3.5.1 Curva de Redução de NBT

A fim de verificar as melhores condições para ensaios futuros, concentrações crescentes de NBT (0 μM ; 2,5 μM ; 5 μM ; 7,5 μM ; 10 μM ; 12,5 μM ; 15 μM) foram misturadas com 50 mM de Tampão Fosfato de potássio pH 7,8; 2,5 μM Riboflavina e 14 μM TEMED e expostas à luz intensa de 0 a 10 minutos, em variados volume finais de reação, mantendo aproximadamente 20cm de distância entre a fonte luminosa (4 X 150W - PHILIPS Comptalux 2C tungstênio) e vários tipos de tubos de ensaio e placas de ELISA. As absorbâncias foram determinadas em cubetas em espectrofotômetro (Ultraspec 2000 - Pharmacia Biotech) e em leitor de placas de ELISA (SpectraMax - Molecular Advice), ambos com comprimento e onda de 650nm.

3.5.2 Determinação quantitativa da presença de SODs

A determinação quantitativa das unidades de SOD presentes nas amostras foi feita, após determinação das condições otimizadas do ensaio e verificação da acurácia utilizando-se CuZnSOD bovina purificada (Sigma) como padrão. O volume de extrato foi variado até que fosse possível a determinação de uma curva decrescente da inibição da formação do produto da redução do NBT. O cálculo de unidades foi realizado tomando-se por base que uma unidade de SOD foi definida com a quantidade necessária de enzima para que houvesse a inibição da formação de formazan em 50% (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971). Exemplo de cálculo no anexo 2.

3.5.3 Amostras

Para cada amostra colocou-se 15 μ M NBT 50mM de Tampão Fosfato pH 8,0; 2,5 μ M Riboflavina e 14 μ M TEMED e se variou o volume em: 1 μ L; 2 μ L, 5 μ L, 10 μ L e 15 μ L, sempre em triplicata. Os tubos foram exposto à luz por 5 minutos, mantendo-se aproximadamente 20cm de distância entre a fonte luminosa e o tubo do ensaio. A Absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 650nm.

3.6 Eletroforese de proteínas

Quando necessário, alíquotas das frações eluídas das colunas foram, antes de aplicadas em gel de SDS, precipitadas com TCA 10%, a 4° C *overnight* , centrifugadas a 14.000 rpm por 30 min, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado, após lavagem de pelo menos 3 vezes com acetona, foi ressuspenso em 50mM de Tris.HCl pH 7,8, após o que o procedimento normal de preparação de amostras para gel desnaturante foram efetuados.

3.6.1 Gel nativo para detecção da atividade de SOD

As amostras foram misturadas com 0,25vol. de sacarose 80% e 0,1 vol. de 0,5% azul de bromofenol e aplicadas em gel concentrador (2,5% de acrilamida / 0,625 % de bis-acrilamida / 7 mM de TEMED / 56 mM de Tris.HCl / 0,5 % de APS / pH 6,8). A

eletroforese foi efetuada mantendo-se a voltagem em 150 V, em gel separador de poli(acrilamida) (8,5% de acrilamida / 0,226% de bis-acrilamida / 7 mM de TEMED / 325 mM de Tris.HCl / 0,3% de APS / pH 8,8). O tampão de corrida utilizado foi preparado com 2,85g.L⁻¹ de glicina e 0,47g.L⁻¹ de Tris e o pH ajustado para 8.5.

3.6.1.1 Análise da presença das SODs

Após a eletroforese os géis foram corados, protegidos da luz, em uma solução de 2,45 mM de NBT por 20 min, posteriormente mergulhados em uma solução de revelação (36 mM K₂HPO₄, 5,6 µM riboflavina, 28 mM TEMED, pH 8,0) e expostos a luz forte até o aparecimento das regiões acromáticas (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

3.6.1.2 Determinação do metal ligante

As diferentes atividades SODs foram determinadas por ensaios de inibição. Para a detecção da atividade da CuZnSOD, 10mM KCN foram adicionados a solução de revelação (SCHRANK *et al.*,1993). Para a detecção da atividade da FeSOD, os géis de poli(acrilamida) foram tratados, antes de corá-los, com uma solução de H₂O₂ (40 mM H₂O₂, 1mM KCN, 50mM K₂HPO₄, 0,1mM Na₂EDTA pH 8,0) por 60min (PRIVALE & FRIDOVICH, 1971). A CuZnSOD é sensível ao cianeto e ao peróxido de hidrogênio, enquanto a FeSOD só é sensível ao peróxido de hidrogênio. A MnSOD é insensível ao cianeto e ao peróxido de hidrogênio, logo esta é inferida pela não inibição durante ambos os tratamentos (MISRA & FRIDOVICH, 1978).

3.6.2 Gel desnaturante

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE, 12 ou 15%) das proteínas extraídas, precipitadas e eluídas foi realizada, segundo o método de LAEMMLI (1970), utilizando uma cuba de gel vertical e carregada em tampão 1X (Trizma base 7,5mM, glicina 60mM e SDS 0,02%) com voltagem constante de 150V. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução corante de 0,1% azul de Coomassie G-250; 40% de metanol e 10% de ácido acético, por duas horas e depois imerso em solução descorante de 40% metanol e 10% ácido acético, até o aparecimento das bandas.

4. Resultados

4.1 Padronização do ensaio enzimático para a detecção da atividade de SOD

Para detecção da atividade de SOD nos extratos celulares e durante o processo de purificação o ensaio enzimático modificado por BITTENCOURT (1998), a partir de BEAUCHAMP & FRIDOVICH (1971) e BEYER *et al.* (1987), foi padronizado. Foram testadas modificações na concentração de NBT, no tempo de exposição à luz, no volume total do ensaio e nas dimensões do tubo de ensaio utilizado. A concentração de NBT mais adequada nas condições testadas, foi 35 μM , onde foi verificada a absorbância máxima a 650 nm (Figura 7). Os melhores tempos de exposição à luz foram determinados no intervalo de 5 a 7 minutos (Figura 8), com a solução de NBT preparada na hora do uso. O volume ideal para o ensaio foi de 1 mL e tipo de tubo de ensaio mais adequado foi o de vidro com 1mm de espessura e dimensões de 75 mm x 8 mm.

A padronização do ensaio enzimático da atividade SOD foi determinada utilizando a enzima CuZnSOD bovina purificada (Sigma) (Figura 9) e um extrato protéico obtido de *M. anisopliae*, onde as proteínas foram precipitadas com 95% de sulfato de amônio, contendo três atividades SOD (Fe, Mn, CuZn) (Figura 10).

Além dos parâmetros de concentração de reagentes, do tempo e do volume do ensaio, também foi analisada a interferência dos sais utilizados nas cromatografias (cloreto de sódio e cloreto de amônio). Até a concentração de 0,2 M, nenhum dos dois sais interferiu no ensaio (dados não mostrados).

4.2. Ensaios espectrofotométricos da atividade SOD utilizando inibidores

A detecção da atividade de SOD e a determinação de seu metal ligante são usualmente realizados através de géis nativos de poliacrilamida corados com NBT (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971; BEYER *et al.*, 1987) e tratados com inibidores específicos para as diferentes formas de SOD. Quando revelados na presença de riboflavina e exposto à luz forte, estes géis apresentam regiões acromáticas, em um gel corado uniformemente de azul. A coloração azul é devida a formação de formazan, a partir do NBT que é reduzido em presença de radicais superóxido. As SODs competem com o NBT pelo radical superóxido gerado na foto-redução da riboflavina, inibindo assim a

redução do NBT na sua posição de migração no gel. Este método é extremamente sensível, sendo capaz de detectar 16 ng de enzima (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

Uma alternativa mais rápida, e que apresenta a mesma sensibilidade, para a determinação das formas de SOD presentes em extratos e nas frações eluídas nas cromatografias, durante o processo de purificação, é a utilização de ensaios enzimáticos em presença de inibidores. Diversos inibidores foram testados: 2 mM de cianeto de potássio, 2 mM de peróxido de hidrogênio, 6 mM de azida sódica, 1 % de SDS, 1 % de Triton X-100, 1 mM de ortofenantrolina (OFT), 5 de cloreto de mercúrio, 10 mM de EDTA, 2 mM de 2-mercaptoetanol, 2 mM de ditioniol (DTT) e 2 mM de PMSF.

O uso dos inibidores cianeto de potássio e peróxido de hidrogênio, mostrou-se efetivo na discriminação das formas de SOD (Tabela 3), não apresentando interferência no ensaio, podendo ser rotineiramente utilizados. Embora não tenham interferido no ensaio, cloreto de mercúrio e PMSF, não foram efetivos na discriminação das diferentes SODs.

A utilização de azida sódica não apresentou o resultado esperado, pois para a concentração utilizada (6 mM), seriam esperados 10%, 20% e 60% de inibição da atividade da CuZnSOD bovina, MnSOD de *E. coli* e FeSOD de *E. coli*, respectivamente (MISRA & FRIDOVICH, 1978). Concentrações maiores que 6 mM de azida interferiram no ensaio, diminuindo a redução do NBT à formazam, mascarando a atividade enzimática de SOD. SDS, OFT e Triton X-100 inibiram a reação de redução do NBT, mascarando o efeito da adição de SODs. Os agentes redutores 2-mercaptoetanol e DTT reduziram o NBT mesmo na ausência de riboflavina e/ou TEMED, mascarando o efeito de inibidores de SOD. Devido a estes resultados estes compostos não foram utilizados nos ensaios de inibição.

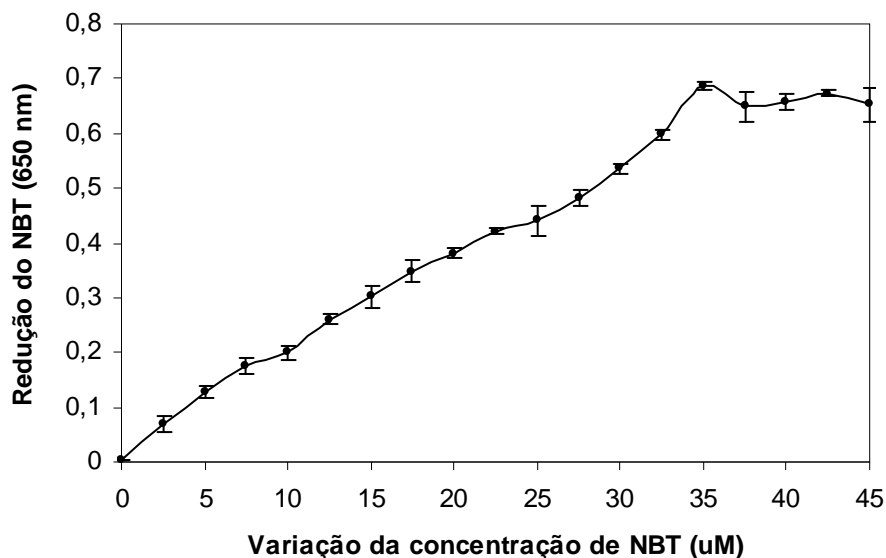


Figura 7. Determinação da curva de redução do NBT. O tempo de exposição à luz foi de 5 minutos e o volume de ensaio 1 mL. O ponto indicado pela seta representa a concentração ótima, a qual foi utilizada nos ensaios posteriores. Os ensaios foram realizados em triplicata, com duas repetições. Em cada ponto está representado o desvio padrão. Os valores de absorbância são relativos a redução do NBT.

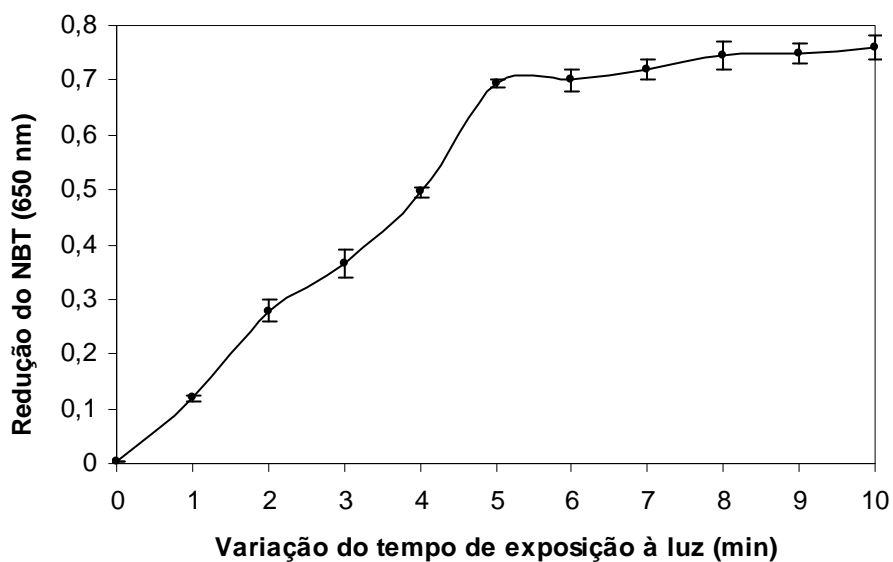


Figura 8. Determinação do tempo ótimo de exposição à luz. O volume de ensaio 1 mL e a concentração de NBT foi de 35 µM. O tempo ótimo de exposição está indicado pela seta e foi utilizado nos ensaios posteriores. Os ensaios foram realizados em triplicata, com duas repetições. Em cada ponto está representado o desvio padrão. Os valores de absorbância são relativos a redução do NBT.

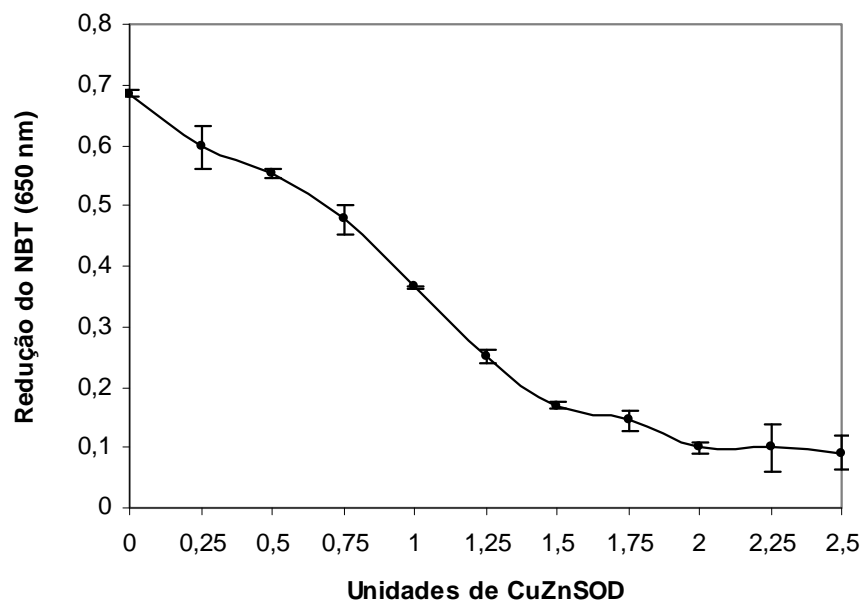


Figura 9. Determinação da curva de redução do NBT para a CuZnSOD bovina (Sigma). O ponto correspondente à uma unidade está mostrado pela seta. Os ensaios foram realizados em triplicata, com duas repetições. Em cada ponto está representado o desvio padrão. Os valores de absorbância são relativos a redução do NBT.

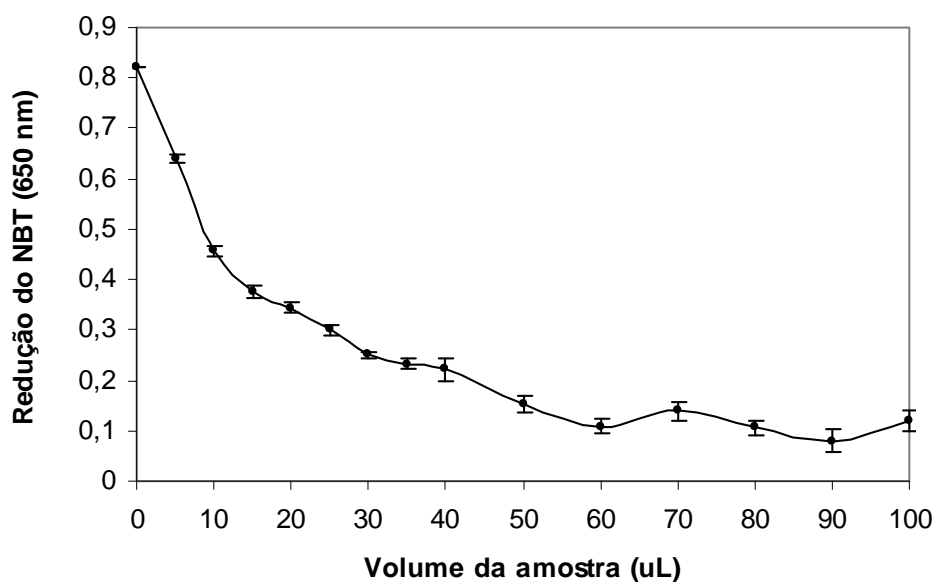


Figura 10. Determinação da curva de redução do NBT para o extrato P95% de *Metarhizium anisopliae*. O extrato contém as três formas de SOD: CuZn, Mn e Fe. Os ensaios foram realizados em triplicata, com duas repetições. Em cada ponto está representado o desvio padrão. Os valores de absorbância são relativos a redução do NBT.

4.3 Purificação das SODs

4.3.1 Obtenção dos extratos celulares

Para a purificação das SODs de *M. anisopliae* o micélio liofilizado foi macerado, homogeneizado (extrato total = ET) e precipitado com 50% (P50%) e 95% (P95%) de sulfato de amônio, em duas etapas antes da aplicação na coluna. Os volumes dos extratos (ET, P50% e P95%), a quantidade de proteínas totais e a atividade enzimática de cada etapa estão mostrados na Tabela 2.

A análise por gel de atividade de SOD revelou a presença de três metaloenzimas ativas e com migração distintas em todos os extratos. A figura 11 apresenta um destes géis de atividade, onde se observa a presença de pelo menos três atividades, evidenciadas pelas inibições: (i) uma de migração mais lenta que foi inibida por KCN e por H₂O₂ comportando-se como uma CuZnSOD; (ii) uma de migração intermediária, logo abaixo da CuZnSOD, identificada como MnSOD, pois não foi durante nenhum dos tratamentos, e (iii) uma de migração mais rápida que não foi inibida por KCN, mas que desaparece quando o gel é tratado com H₂O₂, sendo por isso classificada como uma FeSOD. A Figura 12 mostra o perfil eletroforético, em gel desnaturante, das proteínas presentes nestes extratos.

Tabela 2. Etapas de purificação de CuZnSOD de *M. anisopliae*.

Preparações	Volume (mL)	Proteína Total (mg)	Enzima (U)	Atividade específica (U/mg de proteína)	Purificação Parcial/Total	Rendimento %
ET	120	1095,60	30612,24	27,84	-	100
P50%	20	366,04	666,66	1,82	-	2,18
P95%	25	283,30	3571,43	12,60	0,45 / 0,45	11,66
DEAE-Sephacel	25	5,60	560,50	100,09	7,94 / 3,59	15,70
Afinidade (Cu ²⁺)	9	0,81	74,00	91,42	0,9 / 3,28	2,08 / 13,2

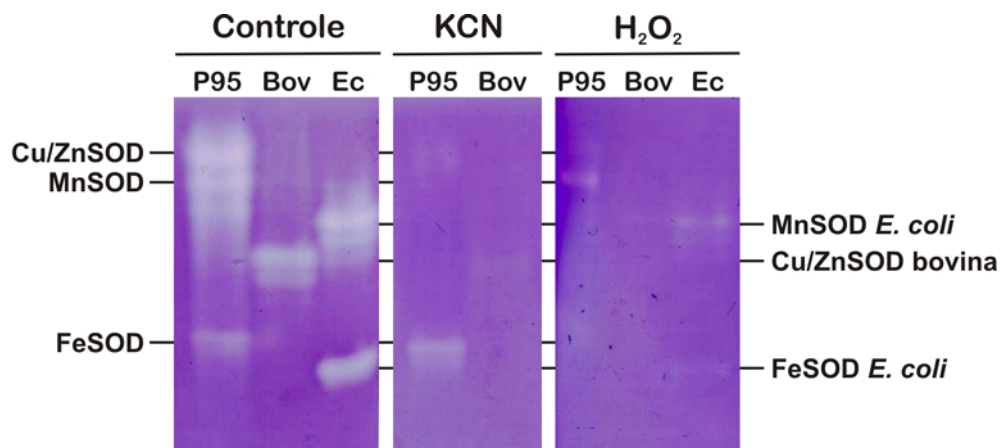


Figura 11. Análise eletroforética da atividade de SOD do extrato P95%. Gel nativo corado com NBT e tratado com inibidores. Controle, sem inibidor; KCN, inibição com 10 mM de KCN; H₂O₂, inibido com 10 mM de H₂O₂ / 1 mM de KCN; P(5, extrato P95% de *M. anisopliae*; Bov, CuZnSOD bovina purificada; Ec, extrato de *E. coli* contendo atividade MnSOD e FeSOD. Esse gel evidencia a atividade de SODs, representadas pelas regiões acromáticas.

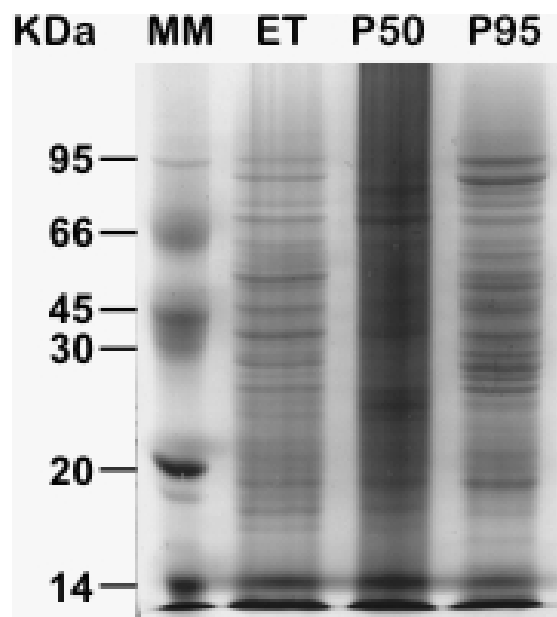


Figura 12. Análise eletroforética, em SDS-PAGE (15%), dos extratos celulares de *M. anisopliae*. Foram aplicados 5 μ L de cada amostra. MM, marcador de massa molecular; ET, extrato total [46 μ g]; P50, extrato P50% [15 μ g]; P95, extrato P95% [12 μ g]. O gel foi corado com azul de Coomassie G-250.

4.3.2 Purificação de CuZnSOD

A fração P95% foi selecionada para as etapas seguintes da purificação, pois apresentou uma atividade total e específica relativamente altas, contendo menos proteínas contaminantes, além de manter as três atividades SODs descritas de *M. anisopliae* (Tabela 2 e Figuras 11 e 12).

4.3.2.1 Cromatografia em resina de troca iônica

A fração P95% foi submetida à cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephacel, como mostra o cromatograma da Figura 13. O pH das frações eluídas não apresentou alteração significativa. Dois picos de absorção a 280 nm foram obtidos, sendo um pico antes da aplicação do gradiente de NaCl e o outro após a aplicação do gradiente. O ensaio enzimático revelou a presença de dois picos da atividade SOD, um antes do gradiente de NaCl e outro após o gradiente (Figura 13).

A análise dos géis nativos corados com NBT e do SDS-PAGE (Figuras 14 e 15) mostrou a presença de uma única atividade SOD, com migração mais lenta, no primeiro pico de atividade eluído da coluna (Figura 14 A e B), bem como a presença de poucas proteínas nas frações de 6 a 10 (Figura 15). A maior atividade é encontrada na fração 8 (Figura 14). No segundo pico de atividade SOD, frações de 24 a 39, observou-se a presença de atividade SOD com migração mais rápida nas frações 25 e 26 (Figura 14D). No gel desnaturante foi observada a presença de diversas proteínas contaminantes nestas frações (Figura 16).

A análise do gel nativo corado com NBT e tratado com os inibidores, permitiu caracterizar a atividade SOD eluída na fração 8 como uma CuZnSOD e a eluída na fração 25, como FeSOD (Figura 14A e B).

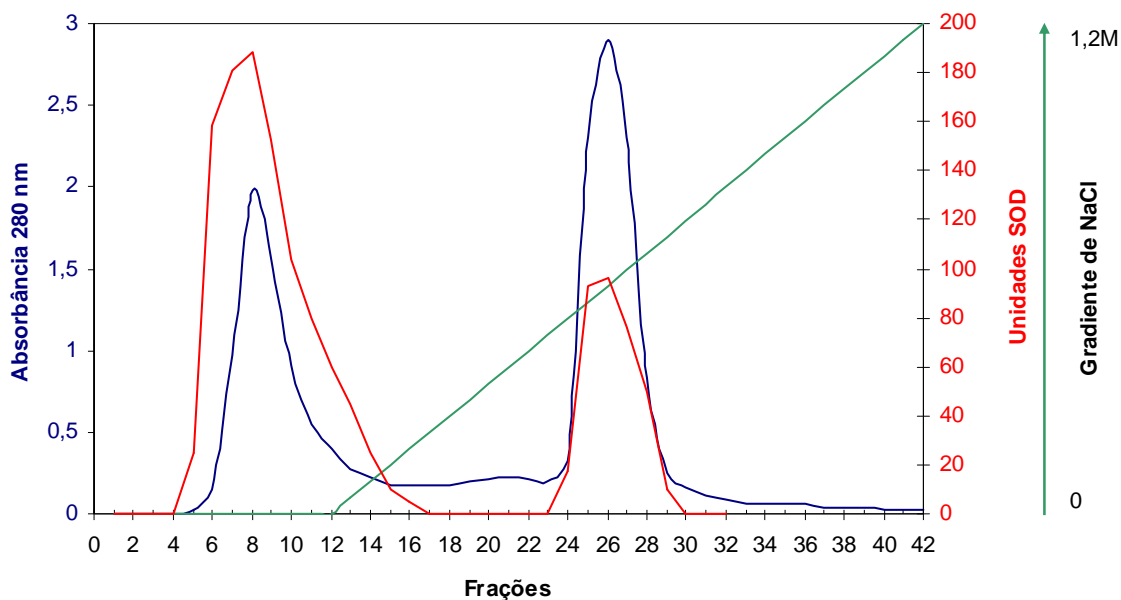


Figura 13. Perfil cromatográfico do extrato de *M. anisopliae* após cromatografia de troca iônica. Foram aplicados 15 mL da fração P95% em coluna 16/10 equilibrada com 60 mL de tampão 50 mM Tris.HCl / 1 mM EDTA, pH 7,8. A amostra foi eluída com 100 mL do mesmo tampão acrescido de NaCl, em um gradiente de 0-1,2 M. Fluxo de 2 mL/min e frações de 5 mL.

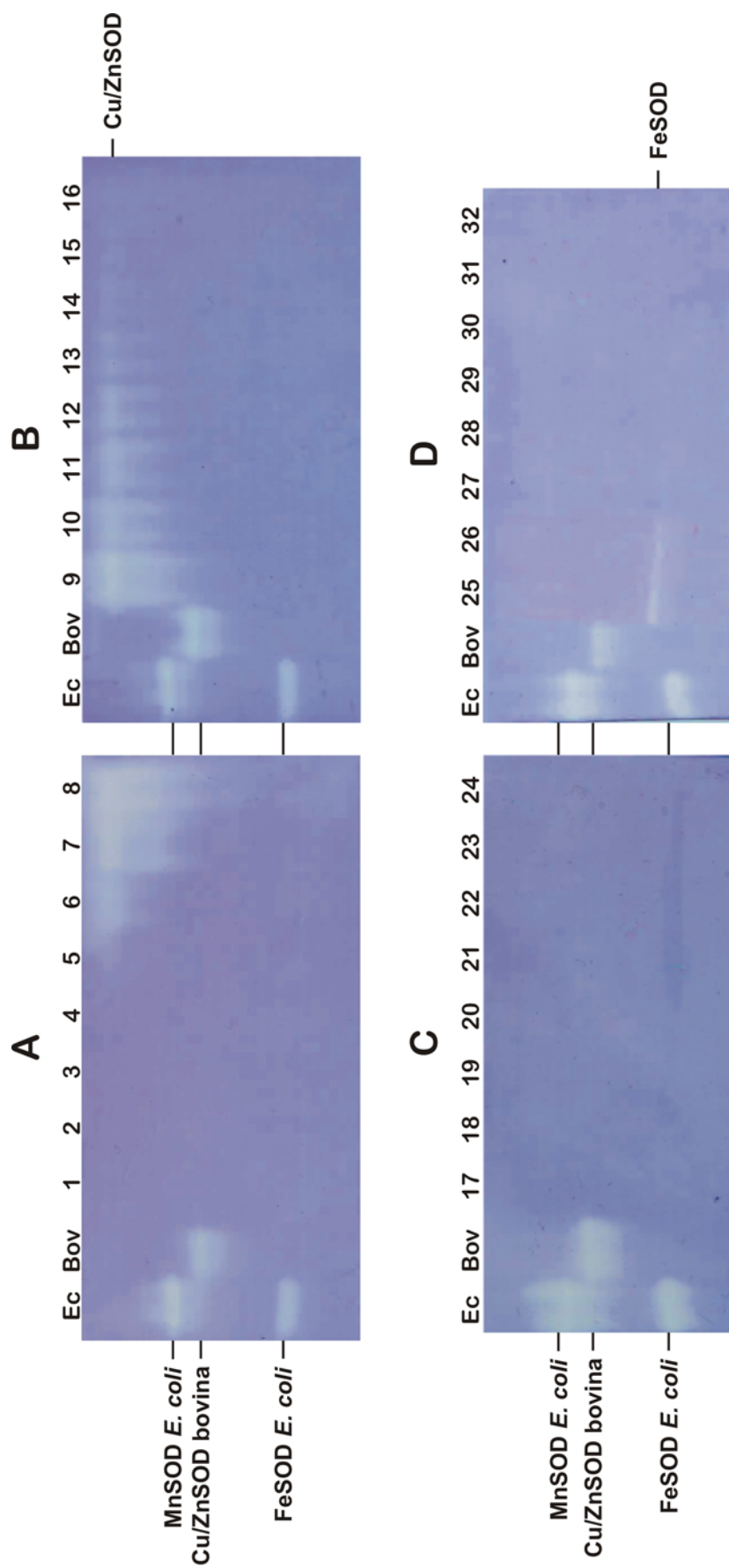


Figura 14. Análise eletroforética da atividade SOD, das frações eluídas da cromatografia de troca iônica. Gel nativo corado com NBT. Observar as bandas acromáticas, indicando atividade SOD. Foram aplicados no gel 20 uL de cada fração. A, Frações de 1 a 8; B, Frações de 9 a 16; C, Frações de 17 a 24; D, Frações de 25 a 32; Ec, extrato de *E. coli* contendo as atividades MnSOD e FeSOD; Bov, CuZnSOD bovina purificada (Sigma).

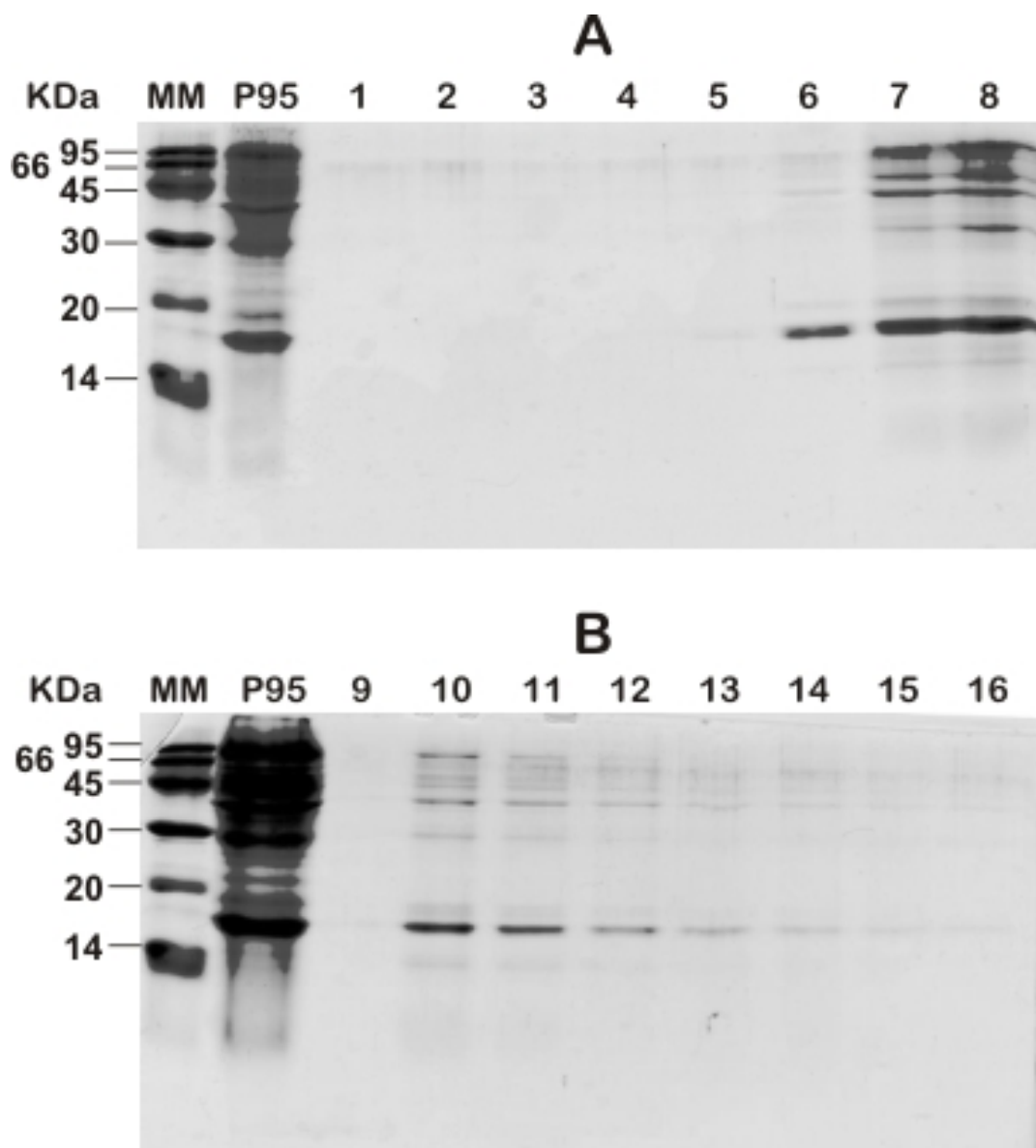


Figura 15. Análise eletroforética, em SDS-PAGE (15%), das frações eluídas da cromatografia de troca iônica. Foram aplicados no gel 20 μ L de cada fração. A, Frações de 1 a 8; B, Frações de 9 a 16; MM, marcador de massa molecular; P95 extrato P95% de *M. anisopliae*. O gel foi corado com azul de Coomassie G-250.

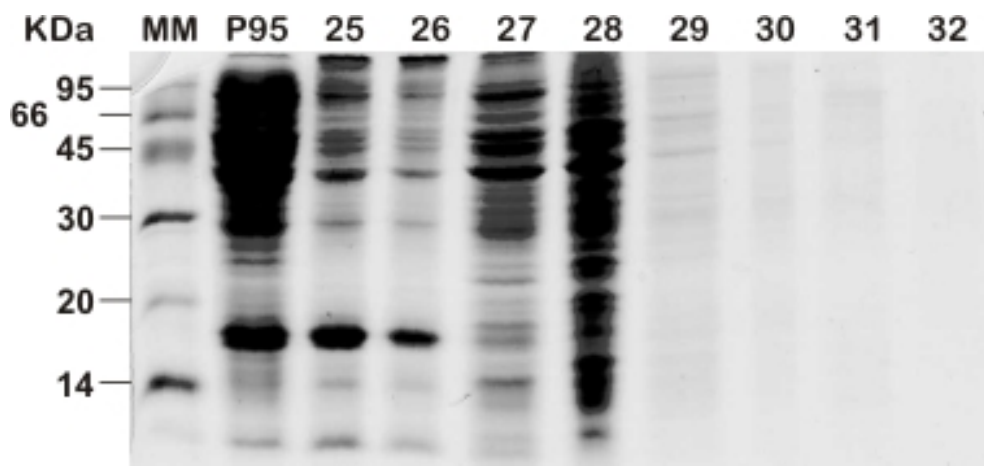


Figura 16. Análise eletroforética, em SDS-PAGE (15%), das frações eluídas da cromatografia de troca iônica. Frações de 25 a 32. MM, marcador de massa molecular; P95 extrato P95% de *M. anisopliae*. Foram aplicados no gel 20 μ L de cada fração. Os géis foram corados com azul de Coomassie G-250.

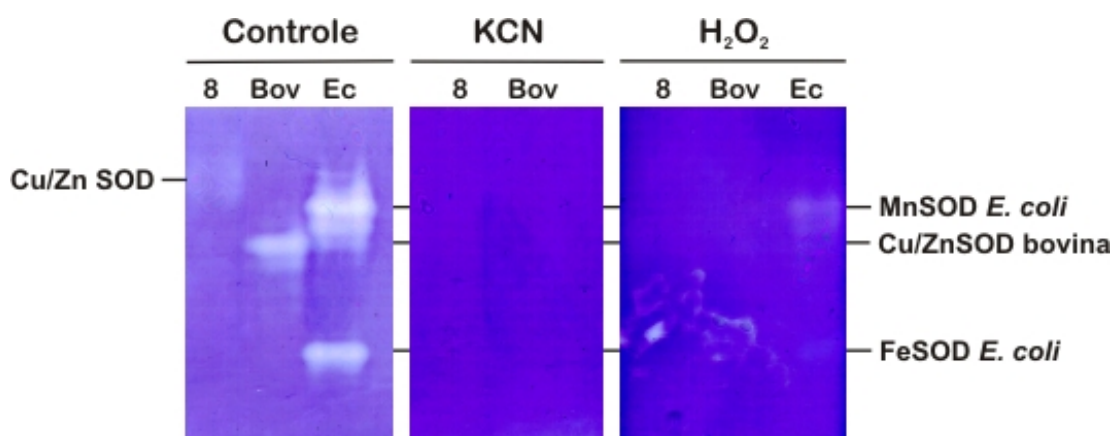


Figura 17. Determinação da atividade de CuZnSOD na fração 8 da cromatografia de troca iônica. Gel nativo corado com NBT e tratado com inibidores. Controle, sem inibidor; KCN, inibição com 10 mM de KCN; H_2O_2 , inibido com 10 mM de H_2O_2 / 1 mM de KCN; P(5, extrato P95% de *M. anisopliae*; Bov, CuZnSOD bovina purificada; Ec, extrato de *E. coli* contendo atividade MnSOD e FeSOD. Esse gel evidencia a atividade de SODs, representadas pelas regiões acromáticas.

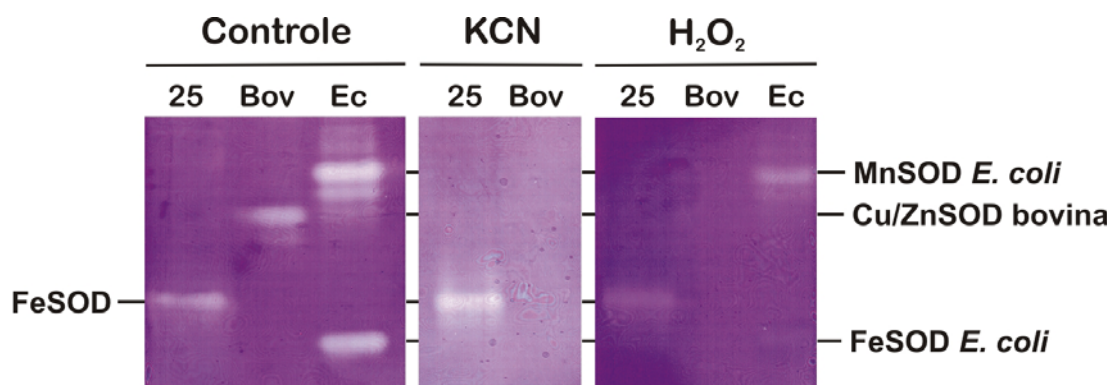


Figura 18. Determinação da atividade de FeSOD na fração 25 da cromatografia de troca iônica. Gel nativo corado com NBT e tratado com inibidores. Controle, sem inibidor; KCN, inibição com 10 mM de KCN; H₂O₂, inibido com 10 mM de H₂O₂ / 1 mM de KCN; P(5, extrato P95% de *M. anisopliae*; Bov, CuZnSOD bovina purificada; Ec, extrato de *E. coli* contendo atividade MnSOD e FeSOD. Esse gel evidencia a atividade de SODs, representadas pelas regiões acromáticas.

4.3.2.2 Purificação das SODs por cromatografia em resina de afinidade

As frações eluídas da cromatografia de troca iônica, e que continham atividade SOD, foram reunidas em duas frações separadas: DEAE-(frações de 6 a 10), contendo a atividade CuZnSOD e DEAE-(frações 25 e 26), contendo a atividade FeSOD.

A fração DEAE-(6 a 10) foi aplicada em coluna Hit rap Chelating Sepharose - 1mL (Amersham Biosciences) saturada com Cu²⁺ (Figura 19). O pH das frações eluídas não apresentou variação significativa. A absorvância a 280 nm revelou a presença de um pico de absorção após a aplicação do gradiente de cloreto de amônio (Figura 19).

A análise da atividade de SOD por géis nativos corados com NBT e do SDS-PAGE mostrou a presença de uma única atividade SOD, com migração mais lenta, no pico de proteína eluído da coluna (Figura 20), bem como a presença de poucas proteínas em todas as frações, exceto na fração 9 (Figura 21). As frações 5 a 7, apresentaram apenas uma banda de proteína com massa molecular entre 14-20 KDa (Figura 21).

As frações 5, 6 e 7 foram reunidas, denominadas AFI-(5 a 7), e testadas para atividade SOD, tanto por gel nativo corado com NBT, quanto por ensaio espectrofotométrico, utilizando inibidores.

A análise em gel nativo corado com NBT e tratado com inibidores, indica que a SOD presente nesta fração é uma CuZnSOD (dados não mostrados). A análise por ensaio espectrofotométrico também revelou tratar-se de uma CuZnSOD (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização da atividade SOD da proteína purificada de *Metarhizium anisopliae*. Percentual de inibição e comparação com padrões.

Inibidores	<i>MaSOD</i> ^a	Controles		
		<i>BovCuZnSOD</i> ^b	<i>EcMnSOD</i> ^c	<i>EcFeSOD</i> ^d
Sem inibidor	0	0	0	0
2 mM Cianeto de potássio	100	100	0	0
2 mM Peróxido de hidrogênio	100	100	0	100
6 mM Azida sódica	0	0	0	0
2 mM PMSF	100	100	100	0
10 mM EDTA	0	0	0	0
5 mM Cloreto de mercúrio	100	50	0	0

^a *MaSOD* - proteína purificada de *M. anisopliae*; ^b *BovCuZnSOD* - CuZnSOD bovina purificada (Sigma); ^c *MnSOD* de *E. coli* purificada (Sigma); ^d *FeSOD* de *E. coli* purificada (Sigma).

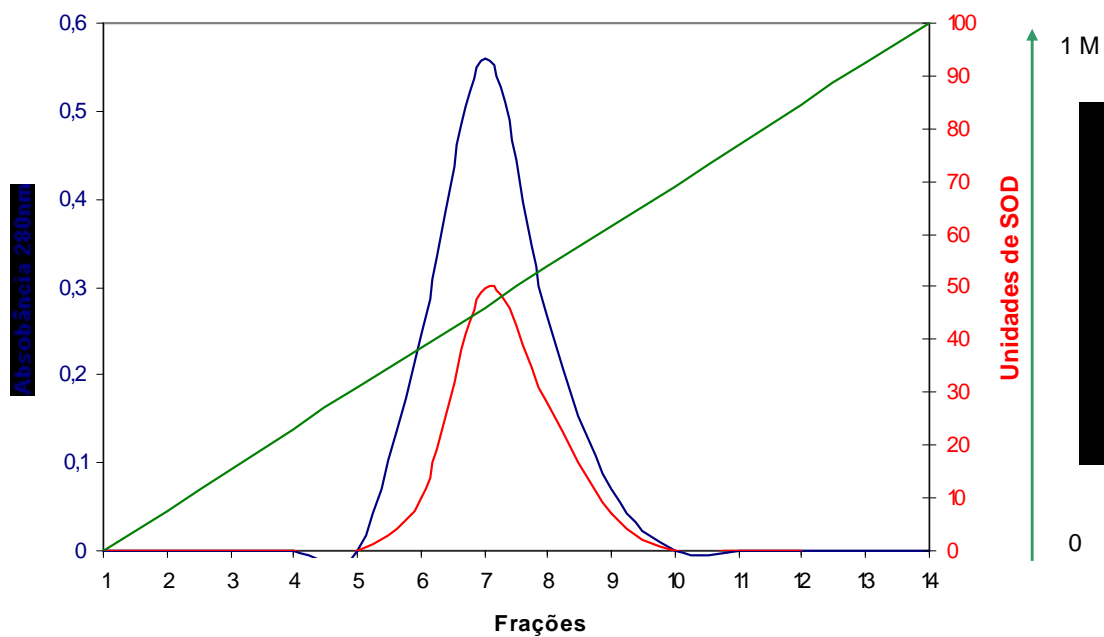


Figura 19. Perfil cromatográfico da fração DEAE (6-10) em cromatografia de afinidade. Foram aplicados 25 mL da fração DEAE (6-10) em coluna HiTrap Chelating Sepharose de 1 mL, saturada com Cu^{2+} e equilibrada com 25 mL de tampão de ligação 0,02 M fosfato de potássio / 1 M de NaCl, pH 7,8. As frações foram eluídas com 42 mL do mesmo tampão acrescido de cloreto de amônio, em um gradiente de 0-1 M. Fluxo de 1 mL/min e frações de 3 mL.

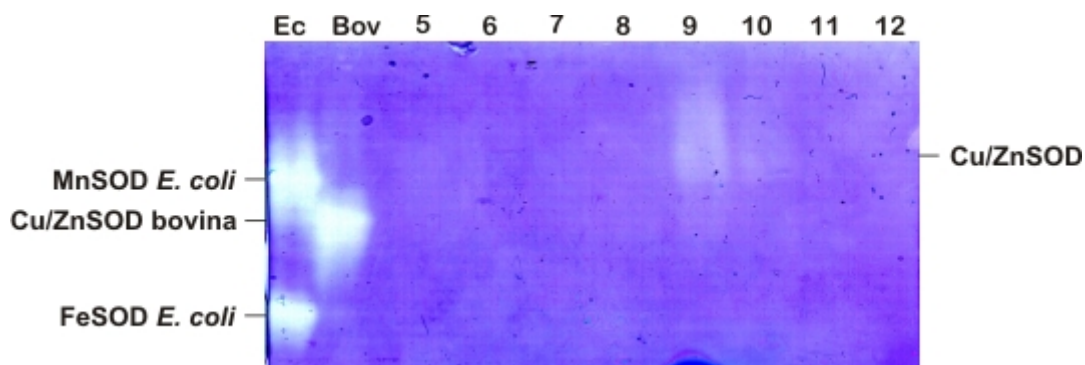


Figura 20. Análise da atividade SOD, das frações eluídas da cromatografia de afinidade. Gel nativo corado com NBT. Observar as bandas acromáticas, indicando atividade SOD. Foram aplicados no gel 50 μ L de cada fração. Os números representam as frações eluídas da coluna. Ec, extrato de *E. coli* contendo as atividades MnSOD e FeSOD; Bov, CuZnSOD bovina purificada (Sigma).

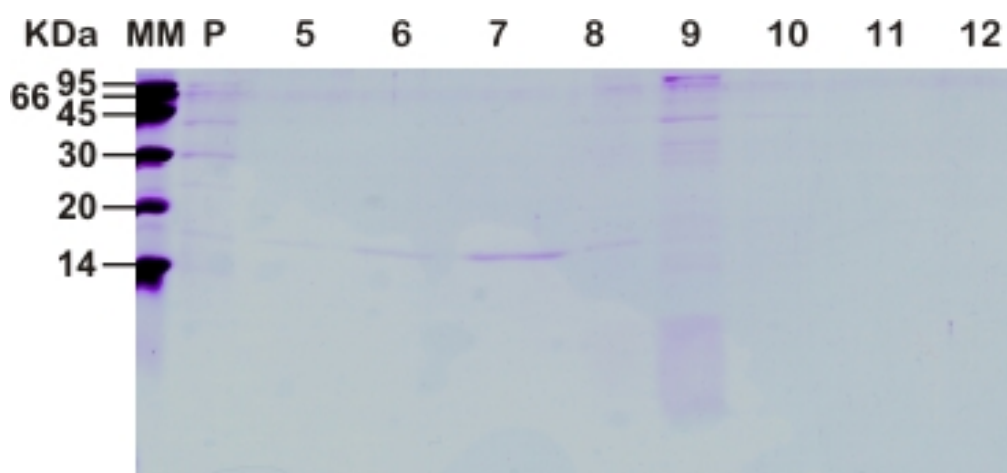


Figura 21. Análise eletroforética, em SDS-PAGE (15%), das frações eluídas da cromatografia de afinidade. Os números representam as frações eluídas da coluna. MM, marcador de massa molecular; P, Fração DEAE-(6-10). Foram aplicados no gel 20 μ L de cada fração. Os géis foram corados com azul de Coomassie G-250.

5. Discussão

Superóxido dismutases são metaloenzimas amplamente distribuídas entre os organismos e desempenham um importante papel na defesa celular contra danos provocados por espécies reativas de oxigênio mediados pelo radical superóxido, um subproduto do metabolismo oxidativo. São classificadas em quatro grupos, dependendo de seu cofator metálico: CuZnSOD (McCORD & FRIDOVICH, 1969); MnSOD (FRIDOVICH, 1975), FeSOD (YOST & FRIDOVICH, 1973) e NiSOD (YOUN *et al.*, 1996a e b; KIM *et al.*, 1998).

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para determinar a atividade dessas enzimas. Muitas são baseadas na atividade inibitória da enzima na redução de um *scavenger* do elétron extra do radical superóxido, gerado sob condições padrão. Vários sistemas geradores de radicais superóxido, tais com xantina-cantina oxidase, flavina fotorreduzida, redução de NADH e *pulse radiolysis*, bem como vários *scavengers* de elétrons, tais como citocromo *c* e o azul de nitrotetrazólio (NBT), têm sido utilizados nestas técnicas. O primeiro ensaio deste tipo foi desenvolvido por McCORD & FRIDOVICH (1969), onde a atividade é quantificada em termos de sua inibição da redução do citocromo *c* pelo radical superóxido, gerado pela reação da xantina-xantina oxidase. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo *c*. Entretanto, esse ensaio não pode ser facilmente aplicado a extratos que possam conter atividade de citocromo oxidase ou citocromo *c* peroxidase. Radicais superóxido são conhecidos por reduzir NBT a formazan, e BEAUCHAMP & FRIDOVICH (1971) sugeriram a substituição do citocromo *c* por este corante para minimizar a interferência de outras enzimas no ensaio, razão pela qual o NBT foi o corante escolhido para uso neste trabalho.

Já foram relatados alguns problemas em relação ao uso do NBT, como a influência do O₂ atmosférico em ensaios que utilizam a glicose oxidase como agente redutor deste corante (LIOCHEV & FRIDOVICH, 1995), sendo por isso adotado o sistema de geração de radicais pela foto-redução da riboflavina. Além disso, o NBT forma mono- e diformazan, os quais são pouco solúveis em água, e tendem a se precipitar. Esta precipitação durante a reação pode interferir na leitura espectrofotométrica do ensaio, principalmente em volumes pequenos e/ou altas concentrações de NBT são utilizados, como observado neste trabalho. Na concentração de 35 µM de NBT e no volume de 1 mL,

selecionados para uso nos ensaios deste trabalho, não foram detectados problemas de precipitação ou aglutinação.

O ensaio padronizado neste trabalho mostrou-se adequado e eficaz para a detecção de SODs em extratos celulares brutos e/ou fracionados, podendo ser adotado como técnica padrão no laboratório. Além disso, o ensaio não foi afetado pela presença de baixas concentrações de cloreto de sódio ou de amônio, o que possibilita seu uso sem a necessidade de diálise das frações oriundas das cromatografias. A adição de 10 mM EDTA ao ensaio, não apresentou qualquer interferência no mesmo, ou inibição da atividade enzimática, podendo ser utilizado na preparação dos extratos e em protocolos de eluição destas proteínas de colunas de afinidade com metal quelado.

A utilização de ensaios indiretos baseados numa série de reações consecutivas e paralelas, não permite a determinação direta de parâmetros cinéticos verdadeiros para as SODs. Isto se deve à ausência de resposta linear ao aumento da concentração da enzima e produção de radicais superóxido em concentrações muito menores, além de não serem apropriados para estudos de mecanismo de reação. Um ensaio direto para esta enzima certamente é preferível, mas devido à natureza de seu substrato, isto não é prontamente possível, pois seria necessário o emprego de técnicas e equipamentos mais sofisticados, raramente disponíveis na maioria dos laboratórios, como *electron spin resonance*, *pulse radiolysis*, *stopped-flow-rapid-freeze EPR spectrometers* (FRIDOVICH, 1974), razão pela qual nenhum parâmetro cinético foi medido neste trabalho.

Além de sua função intrínseca, as SODs estão implicadas em outros processos com a adesão e a sinalização celular (SALVEMINI *et al.*, 1989; PRICE *et al.*, 1994; LAMBOY *et al.*, 1995) e na patogenicidade (TOUATI, 2002). Diversos organismos patogênicos, entre eles os fungos, possuem a capacidade de secretar enzimas para se proteger em ambiente hostil, como descrito, por exemplo, em *Aspergillus fumigatus* (HAMILTON & HOLDOM, 1999).

A possibilidade do uso de fungos entomopatogênicos para o controle de artrópodes, tem aumentado o interesse na significância biológica das SODs na interação entre hospedeiro-patógeno, com interesse particular em sua possível função na sobrevivência do patógeno durante o processo de infecção. Uma grande variedade de fungos possui pelo menos duas das três formas mais comuns de SODs. Além da MnSOD mitocondrial, CuZnSODs têm sido encontradas em vários fungos que são patogênicos para plantas e animais, incluindo *Humicola lutea* (DOLASHKA-ANGELOVA *et al.*, 1999a e b),

Cryptococcus neoformans (CHATUVERDI *et al.*, 2001), *Candida albicans* (HWANG *et al.*, 1999; RHIE *et al.*, 1999). *Botrytis cinerea* (GUL-AD *et al.*, 2000), diversas espécies de aspergillus (HOLDOM *et al.*, 1996; HOLDOM & HAMILTON, 1999), *Uromyces appendicullatis* (LAMBOY *et al.*, 1995) e *Fusarium oxysporum* (KONO *et al.*, 1995).

Metarhizium anisopliae possui pelo menos três atividades SOD, identificadas como CuZnSOD, MnSOD e FeSOD. A presença destas três atividades distintas pode ser explicada por algumas hipóteses como: a capacidade destas enzimas de protegerem diferentes alvos celulares de danos provocados por oxirradicais, como demonstrado para a FeSOD e MnSOD de *E. coli* (HOPKIN *et al.*, 1992); a proteção dos constituintes celulares do fungo contra espécies reativas de oxigênio, produzidas pelo próprio fungo para romper o tecido do hospedeiro; e maior patogenicidade (SCHRANK *et al.*, 1993).

Alguns estudos demonstraram que a exposição de *M. anisopliae* à radiação solar pode afetar negativamente a germinação dos esporos do fungo (ZIMMERMAN, 1982; ALVES *et al.*, 1998; BRAGA *et al.*, 2001), devido à presença de raios ultravioletas (UV). Existem evidências de que a radiação UV pode gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente induzir danos celulares e ao DNA (TYREL & PIDOUX, 1989; WEI *et al.*, 1997); portanto, a atividade de SODs como agentes de proteção pode significaram fator importante de virulência. BITTENCOURT (1998) observou que esporos de *M. anisopliae* continham maior quantidade de FeSOD em relação às outras formas de SOD, que pode sugerir que a FeSOD seja uma enzima de proteção dos esporos. No entanto, essa hipótese ainda necessita de maiores evidências para sua comprovação.

A demonstração da presença de FeSOD em *M. anisopliae* e em *F. oxysporum* abre diversas perspectivas interessantes em relação a : i) evolução das SODs, pois FeSOD é normalmente acreditada como sendo uma forma procariótica; ii) os genes que as codificam; e iii) o papel fisiológico de cada uma delas. Sugere ainda, que esta enzima pode estar mais freqüentemente presente em eucariotos do que se supunha, a exemplo das CuZnSODs procarióticas, que apenas recentemente começaram a ser descritas (BENOV & FRIDOVICH, 1994; KROLL *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1998).

Em nosso trabalho também foi observada a presença de três enzimas SODs nos extratos celulares de *M. anisopliae*. As atividades SOD encontradas foram determinadas em géis nativos corados com NBT como sendo: uma atividade de migração mais rápida e sensível à H₂O₂, identificada como FeSOD; uma SOD de migração intermediária, não inibida por KCN ou H₂O₂, identificada como MnSOD; e uma SOD de migração mais lenta,

sensível a KCN e H₂O₂, identificada como CuZnSOD. Em alguns géis de atividade, foi observada a presença de uma banda extra de atividade SOD, próxima a de migração lenta, igualmente inibida por KCN. Esta banda extra, comum em géis que utilizam riboflavina, é geralmente sugerida como um excesso de enzima ou uma variante e, em alguns casos, a mesma enzima não totalmente saturada com o íon metálico ou que tenha sofrido alguma modificação irreversível (FRIDOVICH, 1974, 1975; VALENTINE & PANTOLIANO, 1981 *Apud* SCHRANK, 1988).

A metaloenzima CuZnSOD de *M. anisopliae* foi isolada e purificada, apresentando uma massa presumida em géis desnaturantes, de aproximadamente 20 KDa, conforme anteriormente descrito por BITTENCOURT (1998). Comparado ao protocolo de BITTENCOURT (1998), a cromatografia de gel filtração foi substituída, com sucesso, por uma cromatografia de afinidade, apresentando ganho no rendimento total de 92%, em relação ao rendimento final encontrado na gel filtração. Em relação à amostra inicial (P95%), o fator de purificação foi de 140% maior que o encontrado por BITTENCOURT (1998).

Nos ensaios espectrofotométricos, a CuZnSOD purificada de *M. anisopliae* foi inibida por 2 mM de KCN, conforme previsto, uma vez que a CuZnSOD é uma enzima sensível ao CN⁻ (ROTILIO *et al.*, 1972). Inibição da atividade em presença de 2 mM de peróxido de hidrogênio também foi observada, de acordo com o descrito na literatura para esta enzima (PRIVALE & FRIDOVICH, 1987). PMSF (2 mM) e cloreto de mercúrio (5 mM) inibiram a atividade da enzima, no entanto este resultado não está de acordo com o esperado, pois estes inibidores são conhecidos por sua afinidade por serinas e cisteínas reativas, que não estão presentes no centro ativo da enzima (TAINER *et al.*, 1983). Essa inibição da atividade enzimática pode ser devido a alguma ligação inespecífica destes inibidores em algum resíduo não-reativo presente na enzima, provocando alguma mudança conformacional como a descrita, por exemplo, para acetilcolinaesterase em presença de PMSF (MOSS & FAHRNEY, 1978) ou um impedimento estérico como observado para urease em presença de ácido-para-amino-benzóico (PABA), um inibidor equivalente ao cloreto de mercúrio.

As duas outras formas de SODs de *M. anisopliae*, FeSOD e MnSOD, também estavam presentes nos extratos, no entanto, não foi possível a sua purificação total. A enzima MnSOD não foi detectada em nenhuma fração durante as cromatografias, A FeSOD foi detectada no segundo pico de A₂₈₀ na cromatografia de troca iônica, mas a

análise, por géis desnaturantes destas frações revelou a presença de diversas proteínas, o que impossibilitou sua aplicação direta em resina de gel filtração.

Por possuírem alta similaridade, tanto estrutural, quanto na sua seqüência presumida de aminoácidos (PARKER *et al.*, 1987; PARKER & BLAKE, 1988), as formas Fe- e MnSOD são bastante difíceis de serem isoladas e purificadas. Uma alternativa é o uso da cromatografia de afinidade, em resinas saturadas com cofatores metálicos específicos para cada uma delas. Nenhum extrato de *M. anisopliae* contendo atividade FeSOD ou MnSOD, foi eficientemente purificado nas resinas testadas em nosso trabalho. A não ligação dessas formas de SOD na resina saturada com Cu^{2+} era esperada, devido a especificidade quase absoluta pelo metal (BEYER *et al.*, 1989). No entanto, a aplicação das frações contendo atividade FeSOD em resina saturada com Fe^{2+} , não resultou numa purificação da enzima, pois a proteína não ficou retida na coluna. Uma alternativa para a purificação destas formas de SOD pode ser a retirada dos íons metálicos do centro ativo das enzimas, através de diálise sucessiva da amostra (BOUNDS *et al.*, 2002), antes de aplicá-la em resinas saturadas com Fe^{2+} ou Mn^{3+} ; assim, a eluição da enzima reconstituída poderia ser efetuada pela aplicação de EDTA ou cloreto de guanidina.

Em nosso trabalho a enzima CuZnSOD de *M. anisopliae* foi purificada e caracterizada, apresentando uma massa molecular de ~20 KDa e sensibilidade a cianeto de potássio e peróxido de hidrogênio, sendo a cromatografia de gel filtração substituída, com sucesso, por uma cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC).

A purificação de cada uma das SODs descritas para *M. anisopliae*, é um passo importante para a elucidação da função destas enzimas durante processo metabólicos e no processo de infecção de *M. anisopliae* em seus hospedeiros. A produção de anticorpos mono- e policlonais contra estas proteínas, e sua posterior aplicação na determinação da localização celular de cada uma, é um destes passos. Além disso, pode facilitar o isolamento de genes que codificam para as SODs, possibilitando a obtenção de mutantes e/ou linhagens transgênicas e estudos da expressão destas proteínas.

6. Referências bibliográficas

- ALVES, S. B. (1986) Agentes entomopatogênicos no controle microbiano. In: Alves, S. B. Controle Microbiano de Insetos. Editora Manole Ltda. 407p.
- ALVES, S. B. (1998) Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Editora da Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.
- AMASINO, R. M. e CROWELL, D.N. (1991) Nucleotide sequence of an iron superoxide dismutase complementary. *Plant. Physiol.*, 96: 1393-1394.
- ARKING, R.; BUCK, S.; BERRIOS, A.; DWYER, S. e BAKER, G.T. 3d (1991) Elevated paraquat resistance can be used as a bioassay for longevity in a genetically based long-lived strain of *Drosophila*. *Dev. Genet.*, 12(5): 362-370.
- AZEVEDO, J. L. (1998) Controle microbiano de insetos e seu melhoramento genético. In: *Controle Biológico, vol. 1*. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 264p.
- BANNISTER, J.V.; BANNISTER, W.H. e ROTILIO, G. (1987) *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 22(2): 111-160.
- BARRIGA, O. O. ; ANDUJAR, F. e ANDRZEJEWSKI, W. J. (1993) Manifestations of immunity sheep repeatedly infested with *Amblyomma americanum* tick. *J. Parasitol.*, 77: 703-709.
- BARSON, G.; RENN, N e BYWATER, A.F. (1994) Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the housefly (*Musca domestica* L.) a pest of intensive animal units. *J. Invert. Pathol.*, 64: 107-113.
- BASSANESSI, M.C. (1992) Superóxido dismutases em *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de mestrado. 137pp. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica. UFRGS. Porto Alegre.
- BEAUCHAMP, C. e FRIDOVICH, I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44: 276-287.
- BENOV, L. ; CHANG, L.Y.; DAY, B. e FRIDOVICH, I. (1995) Cooper, Zinc superoxide dismutase in *Escherichia coli*: periplasmatic localization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 319(2) : 508-511.
- BENOV, L.T. e FRIDOVICH, I (1994) *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 269(41): 25310.
- BEYER, W., IMLAY, J. e FRIDOVICH, I. (1991) Superoxide Dismutases. *Prog. Nucl. Acid Res.*, 40:221-253.

- BEYER, W.F., JR., REYNOLDS, J.A. e FRIDOVICH, I. (1989) Differences between the manganese- and the iron-containing superoxide dismutases of *Escherichia coli* detected through sedimentation equilibrium, hydrodynamic, and spectroscopic studies. *Biochemistry*, 28: 4403-4409.
- BITTENCOURT, S. E. (1998) Purificação, caracterização parcial e localização de cobre zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado. 77p. Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular. UnB. Brasília.
- BOGO, M. R. ; QUEIROZ, M. V. ; SILVA D. M.; GIMÉNEZ-PECCI, M. P.; AZEVEDO, J. L. e SCHRANK, A. (1996) Double-stranded RNA and isomeric virus-like particles in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.*, 100: 1468-1472.
- BORDO, D.; DJINOVIC, K. e BOLOGNESI, M. (1994) Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *J. Mol. Biol.*, 238: 366-386.
- BORGES, M; LEAL, S.C.M.; TIGANO-MILANI, M.S. e VALADARES, M.M.C.. (1993). Efeito do feromônio de alarme do percevejo verde, *Nezara viridula* (L) (HIMENOPTERA: PETATOMIDAE), sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. . *An. Soc. Entomol. Brasil*, 22(3): 505-512.
- BORGSTAHL, G.E.O., PARGE, H.E., HICKEY, M.J., BEYER, W.F., JR., HALLEWELL, R.A. e TAINER, J.A. (1992) The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell*, 71: 107-118.
- BOS, C. (1988) The importance of peridomestic environmental management for the control of the vectors of Chagas' Disease. *Revista Argentina de Microbiologia*, 20: 58-62.
- BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRANDEN, S.; DE RYCKE, R.; BOTTERMAN; SYBESMA, C.; VAN MONTAGU, M. e INZÉ, D. (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *The Embo Journal*, 10 (7): 1723-1732.
- BOWLER, C.; VAN MONTAGUE, M. e INZÉ, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 83-116.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

- BUCK, K. W. (1986) Fungal Virology- an overview. In: Buck, K. W. (ed.). *Fungal Virology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 2-84.
- CLARKSON, J. M. e CHARNLEY, A. K (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 5: 197-203.
- CONGRESS U.S. (1995) Office of Technology Assessment, Biologically Based Technologies for Pest Control, OTA-ENV-636 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office).
- COOPER, J.B., MCINTYRE, K., BADASSO, M.O., WOOD, S.P., ZHANG, Y., GARBE, T.R. e YOUNG, D. (1995) X-ray structure analysis of the iron-dependent superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis* at 2.0 Å resolution reveals novel dimer-dimer interactions. *J. Mol. Biol.*, 246: 531-544.
- CORREIA, A. C. B.; FIORIN, A. C.; MONTEIRO, A. C. e VERÍSSIMO, C.J. (1998) Effects of *Metarhizium anisoplaea* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 189-191.
- COUTINHO, H.L.C. (1996) Diversidade microbiana e agricultura sustentável. *Whorkshop biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas*. Campinas. P. 17.
- DA SILVA VAZ JR. (1997) Caracterização de proteínas de *Boophilus microplus* como imunógeno em vacina contra o carrapato. Tese (Doutor em Bioquímica). Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.
- DAVIES, K.J.A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I General aspects. *J. Biol. Chem.*, 162: 9895-9901.
- FARR, S.B. e KOGOMA, T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.*, 55: 561-585.
- FARRANT, J.L.; SANSONE, A.; CANVIN, J.R.; PALLEN, M.J.; LANGFORD, P.R.; WALLIS, T.S.; DOUGAN, G. e KROLL, J.S. (1997) *Mol. Microbiol.*, 25: 785-796.
- FEE, J.A. (1991) Regulation of *sod* genes in *Escherichia coli*: relevance to superoxide dismutase function. *Molecular Microbiology*, 5(11): 2599-2610.
- FENTON, H.J.H. (1894) Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.*, 65: 899.
- FENTON, H.J.H. (1899) Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. *Proc. Chem. Soc.*, 25: 224.
- FERRON, P. (1978) Biological control of insect pests by entomopathogenic fungi. *Annual Review of Entomology*, 23: 409-442.

- FERRON, P. (1981). Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In *Microbial Control of Pests and Diseases* (ed. H. D. Burges), pp. 465-481. Academic Press: London, U. K..
- FRANKEL, E.N. (1985) Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progress in Lipid Research.*, 23: 197-221.
- FRAZZON, A.P; VAZ JUNIOR, I.S; MASUDA, A.; SCHRANK, A. e VAINSTEIN, M.H. (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*,94(1-2):117-125
- FRIDOVICH, I. (1974) Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology*, 41:35-91
- FRIDOVICH, I. (1975) Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.*, 44: 147-159.
- GARDNER, P.R. e FRIDOVICH, I. (1991) Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.*, 266: 1478-1483.
- GEBICKI, J.M. e BIELSKI, B.H.J. (1981) Comparison of the capacities of the perhydroxyl and superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 103: 7020-7022.
- GILLESPIE, A.T. (1988) In: *Fungi in biological control systems*. Burge, M.N., ed.. 37-60.
- GIMÉNEZ-PECCI, M. P. (1996) Caracterização de partículas virais e RNA de dupla fita isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado. 147p. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. UFRGS. Brasil.
- GOETTEL, M.S.; ST. LEGER, R.J.; BHARI, S.; JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R. e STAPLES, R.C. (1990) Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using *Aspergillus nidulans* *benA3* gene. *Current Genetics*, 17: 129-132.
- GONZALES, J. C. (1995) O controle do carrapato do boi. 2a. ed. Edição do Autor, porto Alegre.
- GRACE, S.C. (1990) Phylogenetic distribution of superoxide dismutase supports an endosymbiotic origin for chloroplasts and mitochondria. *Life Sci.*, 47: 1875-1886.
- HABER, F. e WEISS, J. (1934) The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. Royal Soc. A.*, 147:332.
- HAMILTON, A.J.; HOLDOM, M.D. e HAY, R.J. (1995) Specific recognition of purified Cu,Zn superoxide dismutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 495-496.

- HARRIS, R.J.; HARCOURT, S.J.; GLARE, T.R.; ROSE, E.A. e NELSON T.J. (2000) Susceptibility of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: vespidae) to generalist entomopathogenic fungi and their potential for wasp control. *J. Invertebr. Pathol.*, 75(4):251-258.
- HASSAN (1989) Microbial superoxide dismutase. *Advances in Genetics*, 26: 65-97.
- HASSAN, H.N. (1988) Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radicals Biol. Med.*, 5: 377-385.
- HATZINIKOLAOU, D.G; TSOUKIA, C.; KEKOS, D. e MACRIS, B. (1997) An efficient and optimized purification procedure for the superoxide dismutase from *Aspergillus niger*. Partial characterization of the purified enzyme. *Bioseparation*, 7: 39-46.
- HOLDOM, N. D.; HAY, R.J. e HAMILTON, A. J. (1995) Purification N-terminal amino acid sequence and partial characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Free Radical Res.* 22: 519-531.
- HOLDOM, N. D.; HAY, R.J. e HAMILTON, A. J. (1996) The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infection and Immunity*, 64 (8) : 3326 – 3332.
- HOPKIN, K.A.; PAPAIZIAN, M.A. e STEINMAN, H.M. (1992) Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in *Escherichia coli* K-12*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 24253-24258.
- IKEDA, K.; MATSUMI, S.; MAGARA, T. e NAKAGAWA, S. (1995) Purification and characterization of canine MnSOD and its immunohistochemical localization in the canine heart compared with that of cooper-zincSOD. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27: 1257-1265.
- IMLAY, J.A. e LINN, S. (1986) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240: 1302-1309.
- JACKSON, S.M. e COOPER, J.B. (1998) An analysis of structural similarity in the iron and manganese superoxide dismutase based on known structures and sequences. *Biometals*, 11(2): 159-173.
- JAMES, E.R. (1994) Superoxide dismutase. *Parasitology Today*, 10(12): 481-484.

- JUAREZ, M.P; CRESPO, R.; FERNANDEZ, G.C.; LECUONA, R. e CAFFERATA, L.F. (2000) Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *triatoma infestans*, a chagas disease vector. *J. Invertebr. Pathol.*;76(3):198-207.
- KAAKEH, W.; REID, B.L. e BENNET, G.W. (1996) Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes) and Hidramethylnon among German cockroaches (Dictyoptera: Blatellidae). *J. Entomol. Sci.*, 31: 378 – 390.
- KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; e OUNA, E. A. (1996) Prospects for biological control of lives ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium Anisopliae*.. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 15-20.
- KAAYA, G.P. e MUNYINYI, D.M. (1995) Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse flies (*Glossina* ssp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66:237-241.
- KANEMATSU, S. e ASADA, K. (1979) Ferric and manganic superoxide dismutase in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 195: 535-545.
- KIM, T.S.; JUNG, Y. NA, B.K.; KIM, K.S. e CHUNG, P.R. (2000) Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*. *Infect Immun.*, 68(7): 3941-3948.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- LAH, M.S.; DIXON, M.M.; PATTRIDGE, K.A.; STALLINGS, W.C.; FEE, J.A. e LUDWIG, M.L. (1995) Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: Comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, 34: 1646-1660.
- LAMBOY, J. S. ; STAPLES, R. C. e HOCH, H. (1995) Superoxide dismutase: a differentiation protein expressed in *Uromyces* germilings during early appressorium development. *Experimental Mycology*, 19: 284-296.
- LEZAMA-GUTIERREZ, R.; TRUJILLO-DE LA LUZ, A.; MOLINA-OCHOA, J.; REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O.; PESCADOR A.R.; LOPEZ-EDWARDS, M. e ALUJA, M. (2000) Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field trials. *J. Econ. Entomol.*, 93(4):1080-1084.

- LI, T.; CHEN, A.Y.; YU, C. ; MAO, Y.; WANG, H. e LIU, L.F. (1999) Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. *Genes & Development*, 13: 1553 – 1560.
- LIM, J.-H., YU, Y.G., HAN, Y.S., CHO, S., AHN, B.-Y., KIM, S.-H. e CHO, Y. (1997) The crystal structure of an Fe-superoxide dismutase from the hyperthermophile *Aquifex pyrophilus* at 1.9 Å resolution: Structural basis for thermostability. *J. Mol. Biol.*, 270: 259-274.
- LIVESAY, D.R.; JAMBECK, P.; ROJNUCKARIN, A. e SUBRAMANIAM, S. (2000) Conservation of function in the CuZn superoxide dismutase protein family. (*in review*).
- LUDWIG, M.L.; METZGER, A.L.; PATTRIDGE, K.A. e STALLINGS, W.C. (1991) Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*. A structural model refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 219(2): 335-358.
- LYSANSKY, S.G e COOMBS, J. (1992) Technical improvements to biopesticides. *In: Brighton Crop Protection Conference. Pests and diseases. Proceedings, Farnham: BCPC*, 345-350.
- MANN, T., e KLEILIN, D. (1938) Homocuprein and heptacuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc. R. Soc. London B.*, 126:303-315
- MARKLUND, S.L. (1990) Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem. J.*, 266(1):213-219.
- MARTIN, M.E.; BYER, B.R.; OLSON, M.O.J; SALIN, M.L.; ARCENEUX, J.E.L. e TOLBERT, C. (1986) A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active either manganese or iron as a cofactor. *J. Biol. Chem.*, 261: 9361-9367.
- MARX, J.L. (1985). Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science*, 235: 529-531.
- MATSUMOTO, T.; TERAUCHI, K.; ISOBE, T.; MATSUOKA, K. e YAMAKURA, F. (1991) Iron- and manganese-containing superoxide dismutase from *Methylobionas*: identity of the protein moiety and amino acids sequence. *Biochemistry*, 30: 3210-3216.
- MAY, B.P. e DENNIS, P.P. (1989) Evolution and regulation of the gene encoding superoxide dismutase from the archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *J. Biol. Chem.*, 264:12253-12258.
- MCCORD, J.M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 108(8): 652 –659.

- McCORD, J.M. e FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 244: 6049-6055.
- McKERSIE, B.D. (1996) [ON LINE] Oxidative stress. <http://www.agronomy.psu.edu/Courses/Agro518/Oxygen.htm>. Arquivo baixado 16 de outubro de 1999. Dept of Crop Science, University of Guelph.
- MEEKER, D. (1987) What pests costs Floridians. *Research-87*. Institute of Food and Agricultural Research, University of Florida. P11.
- MELZER, MJ. e BIDOCHKA, M.J. (1998) Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implication for fungal growth and virulence. *Mycologia*, 90(4): 586-594.
- MESSIAS, C.L. (1998) Controle microbiano de vetores transmissores de doenças de chagas. *In: Controle Biológico, vol. 1*. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 264p.
- METSCHNIKOFF, E. (1879) *Zapiski Imperatorskogo Obshchestva Sel'skogo Khlyzaistra Yuzhnoi Rossii*, 17-50
- MISRA, H.P. e FRIDOVICH, I (1978). Inhibition of superoxide dismutase by azide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 189:317-322.
- NOLAN, J.; WILSON, J. T.; GREEN, P. E. e BIRD, P. E. (1989) Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust. Vet. J.*, 66: 179-182.
- NUSS, D.L. e KOLTIN, Y. (1990) Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28: 37-58.
- OLEINICK, N.L., CHIU, S., RAMAKRISHMAN N. e XUE, L. (1986) The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Brit. J. Cancer*, 55: Suppl. 8:135-140.
- PARKER, M.W. e BLAKE, C.C. (1988) Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS Lett.*, 229: 377-382.
- PARKER, M.W., BLAKE, C.C., BARRA, D., BOSSA, F., SCHININA, M.E., BANNISTER, W.H. e BANNISTER, J.V. (1987) Structural identity between the iron- and manganese-containing superoxide dismutases. *Protein Engineering*, 1: 393-397.
- PESCE, A.; BATTISTONI, A.; STROPPOLO, M.E.; POLIZIO, F.; NARDINI, M.; KROLL, J.S.; LANGFORD, P.R.; O'NEILL, P.; SETTE, M.; DESIDERI, A. e

- BOLOGNESI, M. (2000) Functional and crystallographic characterization of *Salmonella typhimurium* Cu,Zn superoxide dismutase coded by the sodCI virulence gene. *J. Mol. Biol.*, 302(2): 465-478.
- PINTO, A. S.; BARRETO, C. C.; SCHRANK, A.; ULHOA, C. J. e VAINSTEIN, M. H. (1997) Purification and characterisation of an extracellular chitinase from entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 322-327.
- PRICE, A. H.; TAYLOR, A. ; RIPLEY, S. J., GRIFFITHS, A., TREWAVAS, A. J. e KNIGHT, M. R. (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell.*, 6: 1301-1310.
- PRIVALE, C. T. e FRIDOVICH, I. (1987) Induction of superoxide dismutase in *Escherichia coli* by heat shock. *Proc. Natl Acad Sci USA.*, 84: 2723-2726.
- PROMISE (2000) [On Line] <http://www.bmbgsi11.leeds.ac.uk./bmbknd/promise>. Arquivo baixado em 01 de outubro de 2000.
- RAHA, S. e ROBINSON, B.H. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.*, 25(10): 502-508.
- RAND, K. N.; MORRE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLANDSEN, P. e COBON, G. S. (1989) Cloning and expression of protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9657-9661.
- RENN, N. ; BYWATER, A.F. e BARSON, G. (1999) A bait formulated with *Metarhizium anisopliae* for the control of *Musca domestica* L. (Dipt., Muscidae) assessed in large-scale laboratory enclosures. *J. Appl. Ent.*, 123: 309-314.
- REX, J.H.; BENNETT, J.E.; GALLIN, J.I.; MALECH, H.L. e MELNICK, D.A. (1990) Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J. Infect. Dis.*, 162: 523-528.
- ROBERTS, J. A. (1968) Resistance of cattle to tick *Boophilus microplus* (Canestrini) II Stages of the life cycle of the parasite wich resistance is manifested. *J. Parasitol.*, 54: 667-673.
- ROBINSON, D.S.; DONNELLY, J.K.; LAWLOR, S.M.; FRAZIER, P.J. e DANIELS, N.W.R. (1996) Wheat superoxide dismutase isoenzymes. *J. Cereal Sci.*, 23: 93-101.
- SALVEMINI, D.; DE NUCCI, G.; SNEDDON, J. M. e VANE, J. R. (1989) Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *Br. J. Pharmacol.*, 97: 1145-1150.

- SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N. Y.*
- SANCHES-MORENO, M; MONTEOLIVA-SANCHES, M.; ORTEGA, F.; RAMOS-CORMENZANA, A e MONTEOLIVA, M. (1989) Superoxide dismutase in strains of genus *Flavobacterium*: isolation and characterization. *Arch. Microbiol.*, 152: 407-410.
- SCANDALIOS, J.G. (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv. Genet.*, 28:1-41.
- SCANDALIOS, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 101:7-12.
- SCHMIDT, M., MEIER, B. e PARAK, F. (1996) X-ray structure of the cambialistic superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii* active with Fe or Mn. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1: 532-541.
- SCHRANK, A. ; BASSANESSI, M. ; PINTO JR, H. ; COSTA, S. V. ; BOGO, M. R. e SILVA, M. S. N. (1993) Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Ciência e Cultura.*, 45: 200-205.
- SCHRANK, I. S. (1988). An *in vitro* mutagenesis study of a metalloenzyme gene. Ph. D. thesis, UMIST, England.
- SEHN, A.P. e MEIER, B. (1994) Regulation of an *in vivo* metal-exchangeable superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii* exhibiting activity with different metal cofactors. *Biochem. J.*, 304: 803-808.
- SPIEGELHALDER, C.; GERSTENECKER, B.; KERSTEN, A., SCHILTZ, E. e KIST, M. (1993). Purification of *Helicobacter pylori* SOD and cloning and sequencing of the gene. *Infection and Immunity*, 61 (12): 5315-5325.
- ST LEGER, R. J. ; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C. e ROBERTS, D. W. (1990) Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.*, 136: 1779-1789.
- ST LEGER, R. J. ; JOSHI, L. ; BIDOCHKA, M.J. e ROBERTS, D.W. (1996) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 93: 6349-6354.

- ST. LEGER, R. J. ; ROBERTS, D. W. e STAPLES, R. C. (1991) A model to explain differentiation of appressoria by germlings of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invert. Pathol.*, 57: 299-310.
- STADTMAN, E.R. (1986) Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.*, 11:11-12.
- STEINMAN, H.M. (1993) Function of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 175(4): 1198-1202.
- STODDARD, B.L., HOWELL, P.L., RINGE, D. e PETSKO, G.A. (1990) The 2.1-Å resolution structure of iron superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*. *Biochemistry*, 29: 8885-8893.
- STRYER, L. (1996) Bioquímica. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 4^a. Ed.
- SWISS-3DIMAGE (2000) [On Line] Database of annotated 3D images. <http://www.expasy.ch/databases/swiss-3dimage/image>. Arquivos baixados em 01 de outubro de 2000.
- TAINER, J.A; GETZOFF, E.D.; RICHARDSON, J.S. e RICHARDSON, D.C. (1983) Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, 308: 284-287.
- VAN CAMP W., VAN MONTAGU M. e INZE D. (1994) Superoxide dismutases. In: C. H. Foyer and P. M. Mullineaux (eds). Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. *CRC Press Inc.* Boca Raton; USA. 317-341
- WAGLAND, B. M. (1975) Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. I. Responses on previously unexposed cattle to four infestations with 20.000 larvae. *Aust. J. Agri. Res.*, 26: 1073-1080.
- WAGLAND, B. M. (1978) Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. *Aust. J. Agri. Res.*, 29: 401-409.
- WU, H.C.H.; TSAI-WU, J.; HUANG, Y.; LIN, C.; LIOUA G. e LEE, F. (1998) Identification and subcellular localization of a novel Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Letters*, 439: 192-196.
- YOUNG, A. S. e MORZARIA, S. P. (1986) Biology of *Babesia*. *Parasitol. Today*, 2: 211-219.

- YU, B. P. (1995) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1): 139-164.
- ZELEDON, R. e RAABINOVICH, J. E. (1988) Chagas' Disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vector. *Annual Review of Entomology*, 26: 101-133.
- ZHIOUA, E.; BROWNING, M.; JOHNSON, P. W.; GINSBERG, H. S. e LEBRUN, R.A. (1997) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (acari: ixodidae). *The Journal of Parasitology*, 83: 815-818.