

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

**LIPASES DE *Metarhizium anisopliae*: PURIFICAÇÃO PARCIAL,  
REGULAÇÃO E SECREÇÃO DURANTE O PROCESSO DE  
INFECÇÃO DO CARRAPATO BOVINO *Boophilus microplus***

Dissertação de Mestrado

**Walter Orlando Beys da Silva**

Porto Alegre, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**LIPASES DE *Metarhizium anisopliae*: PURIFICAÇÃO PARCIAL, REGULAÇÃO  
E SECREÇÃO DURANTE O PROCESSO DE INFECÇÃO DO CARRAPATO  
BOVINO *Boophilus microplus***

**Walter Orlando Beys da Silva**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

ORIENTADORES: Marilene Henning Vainstein  
Augusto Schrank

Porto Alegre, 2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPERGS.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilene Henning Vainstein pela confiança, respeito, apoio e orientação desde o meu ingresso no laboratório.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Augusto Schrank pelo respeito, incentivo e orientação.

Ao Prof. Dr. Carlos Termignoni pelas várias sugestões e contribuições durante o desenvolvimento do trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Carlini pela leitura do manuscrito, valorosas sugestões e pelo uso do software para análise dos zimogramas

Ao amigo Alexandre José Macedo pelos conselhos, contribuições e orientações durante meu mestrado.

Aos professores Dr. Adriano Brandelli, Dr. Carlos Termignoni e Dr. Cirano Ulhoa pela avaliação do meu trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Irene Schrank pela leitura da dissertação.

Aos colegas e amigos Markus, Antônio, Renata, Hugo, Simone, Rose, Adriana, Clarisse, Fabiano, José, Cláudio, Kátia, Lenise, Broetto, Marco Aurélio, Baratto, Márcia, Luciano, Valéria, Sydnei, Juliano e Charley pela convivência, apoio e aprendizado.

Aos muitos colegas e amigos espalhados em diversos laboratórios que me auxiliaram ou compartilharam momentos importantes durante o mestrado.

Aos amigos Sílvia e Luciano Saucedo pelo apoio e convivência.

Ao bolsista de iniciação científica e amigo Lucas André Dedavid e Silva pela dedicação, convivência e contribuição no desenvolver deste projeto.

A pequena grande amiga Ana Paula Fölmer Corrêa pela competência, apoio, convivência e contribuição em grande parte deste trabalho.

A família da Lucélia pelo apoio e incentivo.

A minha mãe, meus irmãos, minha irmã, minha sobrinha e meus tios Milton e João Fernando pelo apoio, confiança, estímulo e orgulho do meu trabalho.

A Lucélia, minha noiva, colega e amiga por ter sido fundamental neste trabalho e por ser fundamental na minha vida.

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	7
Lista de figuras e tabelas	8
Resumo	9
Abstract	11
<b>1. Introdução</b>	<b>12</b>
1.1. O controle biológico	12
1.2. O controle biológico e <i>Metarhizium anisopliae</i>	14
1.3. Taxonomia de <i>M. anisopliae</i>	16
1.4. O processo de infecção	17
1.5. Fatores de virulência de <i>M. anisopliae</i>	22
1.6. Lipases	27
1.6.1. Lipases e lipídeos	29
1.7. Lipases e sistemas de infecção	30
1.8. Lipases e <i>M. anisopliae</i>	34
<b>2. Objetivos</b>	<b>38</b>
2.1. Objetivo Geral	38
2.2. Objetivos específicos	38
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>39</b>
3.1. Linhagem do fungo <i>M. anisopliae</i> e manutenção	39
3.2. Meios de cultivo	39
3.2.1. Meio de Cove completo (MCc)	39
3.2.2. Meio de Cove modificado (MCm)	40
3.3. Suspensão de esporos de <i>M. anisopliae</i>	40
3.4. Bioensaio com carrapatos bovinos <i>Boophilus microplus</i>	40
3.4.1. Extração das proteínas da superfície de carrapatos dos bioensaios	41
3.5. Cultivo de <i>M. anisopliae</i> em meio líquido com diferentes fontes de carbono	41
3.6. Ensaio enzimáticos	42
3.6.1. Atividade de lipase	42
3.6.2. Atividade de quitinase	43
3.6.3. Atividade de protease	44
3.7. Quantificação de proteínas totais	44
3.8. Preparação das amostras para eletroforese	45
3.9. Eletroforese	45
3.9.1. Gel SDS-PAGE	45

3.9.2. Zimograma	46
3.10. Análise densitométrica das bandas de atividade de zimogramas	47
3.11. Purificação parcial de lípases	47
3.11.1. Resina de gel filtração BioGel A 0,5m	47
3.11.2. Resina de troca iônica DEAE-Sepharose	48
3.12. Análise estatística	48
<b>4. Resultados</b>	<b>49</b>
4.1. Desenvolvimento de uma estratégia para detecção da atividade de lipase durante a infecção de <i>B.microplus</i>	49
4.2. Quantificação da atividade lipolítica de <i>M. anisopliae</i> durante a infecção do carrapato <i>B.microplus</i>	51
4.3. Regulação da secreção de lipases frente a diferentes fontes de carbono	54
4.4. Purificação parcial de lípases	60
<b>5. Discussão</b>	<b>65</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>74</b>
<b>6. Referências bibliográficas</b>	<b>75</b>
<b>7. Anexo</b>	<b>89</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A <sub>280</sub>	absorbância em comprimento de onda igual a 280 nanômetros
cm	Centímetro
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	ácido etilodiaminotetracético, sal sódico
g	grama, aceleração da gravidade
h	Hora
kDa	quilodaltons = 1.000 daltons
L	Litro
M	Molar
MCc	meio de Cove completo
MCM	meio de Cove modificado
mg	Miligrama
min	minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MUF	Metilulbeliferil
NAcGlc	<i>N</i> -acetilglicosamina
nm	Nanômetro
OD	densidade óptica em absorbância em comprimento de onda
pNP	p-nitrofenil
p/p	peso por peso
p/v	peso por volume
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s	Segundos
SDS	dodecilsulfato de sódio
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
Triton X-100	éter octilfenólico de decaetilenoglicol
Tween	Polisorbitano
U	unidade de atividade enzimática
V	Volts
v/v	volume por volume

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de infecção e possível mecanismo de penetração do fungo <i>M. anisopliae</i> em seus hospedeiros.	19
<b>Figura 2.</b> Constituição básica do tegumento de artrópodes.	21
<b>Figura 3.</b> Reações catalisadas por lipases.	28
<b>Figura 4.</b> Possíveis funções de lipases microbianas extracelulares durante o processo de infecção.	35
<b>Figura 5.</b> Estratégia para quantificação da atividade de lipase de <i>M. anisopliae</i> durante o processo de infecção de <i>B. microplus</i> .	50
<b>Figura 6.</b> Zimogramas de atividade de lipase com substrato MUF-butilato de diferentes tempos de infecção de <i>M. anisopliae</i> em <i>B. microplus</i> e análise densitométrica das bandas de atividade.	53
<b>Figura 7.</b> Atividade de lipase de sobrenadantes de cultivo de <i>M. anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos.	56
<b>Figura 8.</b> Detecção de atividade lipolítica em zimogramas de sobrenadantes de cultivo de <i>M. anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono.	59
<b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> em resina BioGel A 0,5m.	61
<b>Figura 10.</b> Perfil de eluição das proteínas secretadas por <i>M. anisopliae</i> .	63
<b>Figura 11.</b> Perfil eletroforético da purificação parcial de lipases secretadas por <i>M. anisopliae</i> cultivado com 1% de óleo de oliva.	64
<b>Tabela 1.</b> Produtos comercializados a base de <i>M. anisopliae</i>	16
<b>Tabela 2.</b> Atividade de lipase durante a infecção do carrapato <i>B. microplus</i> .	51
<b>Tabela 3.</b> Atividade específica de lipase de sobrenadantes de cultura de <i>M. anisopliae</i> em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos.	57
<b>Tabela 4.</b> Atividade específica de protease, quitinase e determinação de massa seca de <i>M. anisopliae</i> .	58



## RESUMO

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) são serino hidrolases de considerável relevância fisiológica e potencial uso industrial. O fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* é um dos mais importantes e bem estudados agente biológico para o controle de muitos artrópodes-praga incluindo o carrapato bovino *Boophilus microplus*. Lipases secretadas por *M. anisopliae* podem estar potencialmente envolvidas no processo de infecção do hospedeiro, porém, estudos sobre estas enzimas vêm sendo negligenciados em fungos. Neste trabalho, desenvolvemos uma estratégia simples objetivando detectar e quantificar a atividade de lipase durante a infecção de *B. microplus* por *M. anisopliae*. Além disso, estudamos os efeitos de diferentes fontes de carbono, incluindo componentes do tegumento do hospedeiro, na secreção de lipases por *M. anisopliae* em sobrenadantes de cultura. Apresentamos, também, a purificação parcial de uma lipase secretada em cultura líquida de *M. anisopliae*. A atividade de lipase aumentou de 0,03 U para  $0,207 \pm 0,021$  U e de  $0,033 \pm 0,002$  U para  $0,358 \pm 0,05$  U durante a infecção (6 a 96 horas) em carrapatos vivos e mortos, respectivamente, infectados por *M. anisopliae*. Em culturas líquidas observamos altos níveis de atividade lipolítica principalmente em culturas suplementadas com quitina mais lipídeo animal. Nos zimogramas a atividade de lipase foi detectada em carrapatos infectados mortos e vivos em todos tempos testados como também em todos sobrenadantes de cultura analisados. A purificação parcial foi realizada com dois passos cromatográficos incluindo uma cromatografia de troca aniônica

que apresentou somente um pico de atividade no gradiente salino. Esperamos que os resultados apresentados neste trabalho contribuam para elucidar a função desempenhada pelas lipases no processo de infecção do hospedeiro de *M. anisopliae*.

## ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are serine hydrolases of considerable physiological significance and industrial potential. The filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is one of the most important and best-studied biological agent for control of many arthropod pests including the cattle tick *Boophilus microplus*. Lipases secreted by *M. anisopliae* could potentially be involved in the host infection process but studies about these enzymes have been neglected mainly in fungi. In this work, we developed a simple strategy aiming to detect and quantify lipase activity during *B. microplus* infection by *M. anisopliae*. Moreover, we studied the effects of different carbon sources, including components of the tegument of host, on lipase secretion by *M. anisopliae* in culture supernatants. We presented, also, a partial purification of secreted lipolytic enzyme in *M. anisopliae* liquid culture. Lipase activity increases from  $0.03 \pm 0$  U to  $0.207 \pm 0.021$  U and from  $0.033 \pm 0.002$  U to  $0.358 \pm 0.05$  U during infection (6 to 96 hours) in live and dead ticks, respectively, infected by *M. anisopliae*. In liquid cultures we observed high levels of lipolytic activity mainly in cultures supplemented of chitin plus animal lipid. In zymograms, lipase activity was detected in infected dead and live ticks in all times tested as well as in all analyzed liquid culture supernatants. A partial purification was achieved with two chromatographic steps including an anionic exchange chromatography that presents only one peak of lipase activity in the saline gradient. We hope that results presented in this work contributes to elucidate the role played by lipases in *M. anisopliae* host infection process.

## **1. INTRODUÇÃO**

Atualmente, existe uma tendência mundial, oriunda principalmente dos países europeus e de outros países mais desenvolvidos sócio-economicamente, no consumo de alimentos e outros derivados agropecuários produzidos de maneira orgânica, sem o emprego de agentes químicos. A busca por alternativas mais limpas de produção e metodologias menos agressivas ao meio ambiente direcionam, cada vez mais, estudos científicos visando uma diminuição dos efeitos danosos causados pela intervenção humana em suas diversas relações com o ecossistema. Entre estes estudos, vem aumentando significativamente a busca por métodos alternativos ao controle químico para o controle de pragas domésticas e da agropecuária. O controle químico de pragas acarreta inúmeras desvantagens nas quais se destacam, (i) a persistência no ambiente e os danos recorrentes deste fato; (ii) os efeitos deletérios sobre a saúde humana e animal; (iii) a contaminação das reservas de água e do solo; (iv) o desenvolvimento de pragas resistentes pelo uso constante dos agentes químicos empregados no controle de pragas; e, (v) o alto custo dos defensivos agrícolas. Desta maneira o controle biológico de pragas surge cada vez mais como uma alternativa viável sob diversos aspectos e o seu emprego e estudo vêm aumentando significativamente nos últimos anos.

### **1.1. O controle biológico**

A constante degradação do meio ambiente e a cobrança cada vez mais intensa da sociedade por metodologias novas e alternativas resultam em um

aumento significativo das pesquisas científicas visando a diminuição da agressão que o ecossistema vem sofrendo por intervenção do homem.

O controle biológico se baseia em um dos fundamentos básicos das relações ecológicas entre os seres vivos de que cada espécie, seja animal, vegetal ou microbiana, possui inimigos naturais. Desta forma, organismos capazes de inibir o crescimento populacional de outros podem ser utilizados no controle de populações específicas que possam vir a se tornar pragas. Um agente biocontrolador eficiente deve propiciar uma redução significativa dos danos causados por um organismo praga, por morte ou redução de seu crescimento populacional (MELO & AZEVEDO, 1998). Comparado ao controle químico, o controle biológico apresenta inúmeras vantagens, especialmente quanto ao impacto ambiental, custo, manuseio, especificidade e desenvolvimento de resistência. Entretanto, os bioinseticidas, de maneira geral, apresentam ainda uma eficiência mais baixa em relação ao tempo de morte do organismo alvo, quando comparado ao controle químico. Esforços têm sido realizados com o intuito de potencializar o controle biológico utilizando microrganismos visando principalmente, otimizar a produção e o inóculo destes agentes, além de aumentar a estabilidade dos mesmos. O estudo das características básicas da relação entre o microrganismo e o seu respectivo hospedeiro tem permitido um melhor entendimento do processo de patogenicidade e de suas características específicas.

Entre os organismos utilizados como agentes no controle biológico de pragas, destacam-se os microrganismos pela facilidade de manuseio e aplicação, custo e conhecimento do processo de produção, além da eficiência pronunciada

de algumas espécies já amplamente utilizadas com este intuito. Entre os microrganismos utilizados no controle de pragas destacam-se os fungos filamentosos pois estes não necessitam ser ingeridos para que possam efetivar o controle do organismo-alvo, desenvolvendo-se diretamente sobre o tegumento do hospedeiro. Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados para o controle microbiano destes organismos, destacando-se os gêneros: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (SHAH & PELL, 2003). A grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens. Mais de 700 espécies de fungos pertencentes a aproximadamente 90 gêneros são agentes etiológicos de 80% das doenças de insetos (ALVES, 1998).

## **1.2. O controle biológico e *Metarhizium anisopliae***

Atualmente, *M. anisopliae* é um importante agente utilizado no controle biológico de pragas, tendo sua ação bastante estudada e amplamente utilizada (SHAH & PELL, 2003). Este fungo infecta mais de 300 espécies de insetos, incluindo pragas importantes tanto para agricultura como para pecuária (ALVES, 1998). No Brasil, *M. anisopliae* vem sendo utilizado como controlador da cigarrinha e da broca da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* e *Diatrea saccharalis*), da cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*), de percevejos da soja dos gêneros *Nezara* e *Piezodorus*, da broca do café (*Diploschema rotundicollee*) e da broca do rizoma (*Cosmopolites sordidus*) em bananeira (ALVES, 1998). Em trabalhos experimentais o fungo foi testado com sucesso

sobre larvas de *Lucilia sericata* (WRIGHT *et al.*, 2004), *Musca domestica* (ALVES, 1998) e ectoparasitos de abelhas *Varroa destructor* (KANGA *et al.*, 2003). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para alguns vetores de doenças humanas (SHERLOCK & GUITTON, 1982; SILVA & MESSIAS, 1986; SCHOLTE *et al.*, 2005) e para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (KAAYA *et al.*, 1996; ZHIOUA *et al.*, 1997; FRAZZON *et al.*, 2000). O primeiro relato de ocorrência natural de *M. anisopliae* infectando fêmea ingurgitada de carrapato foi realizado por DA COSTA *et al.* (2002), no município de Paracambi, no estado do Rio de Janeiro. Este fato evidenciou a possibilidade do uso de *M. anisopliae* como biocontrolador do carrapato bovino *B. microplus*, para o qual foi demonstrada elevada mortalidade em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas (BITTENCOURT *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1997; CORREIA *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 1998; BITTENCOURT *et al.*, 1999 e 2000; FRAZZON *et al.*, 2000; ONOFRE *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2004).

No Brasil, foi utilizado com sucesso, em 1965, para o controle da cigarrinha-da-cana e, a partir daí, houve a instalação de laboratórios na região Nordeste para viabilizar sua utilização no controle biológico (MARQUES *et al.*, 1981). Sua utilização tem aumentado nos últimos anos, atingindo milhares de hectares. Tal sucesso possibilitou a diminuição do uso de produtos químicos que inicialmente era de 150.000 ha/ano para 12.000 ha/ano, ou seja, uma redução de quase 90% (MELO & AZEVEDO, 1998), havendo ainda, perspectivas para sua utilização em nível comercial em outros países (FERNANDEZ, 2000). Atualmente surgem cada vez mais produtos formulados a partir dos conídios de *M. anisopliae* para o manejo orgânico de pragas em diferentes países e inclusive no Brasil (Tabela 1).

**Tabela 1- Produtos comercializados a base de *M. anisopliae*.**

<b>Produto</b>	<b>País</b>	<b>Empresa</b>
Meta-Guard	Índia	Ajayabio
Metabiol	Colômbia	Control Biologico
Destruxin	México	Biotropic
Metanat EF	Brasil	Natural Rural
Metanat PM	Brasil	Natural Rural
Metanat CE	Brasil	Natural Rural

Fonte: Ajayabio (2005), Natural Rural (2005), Control Biologico (2005), Biotropic (2005).

### **1.3. Taxonomia de *M. anisopliae***

*Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin é amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado facilmente no solo, onde sobrevive por longos períodos (ALVES 1998; FRANCESCHINI *et al.*, 2001). *M. anisopliae* foi classificado durante muito tempo como Deuteromiceto pertencente à classe Hiphomycetes (TULLOCH, 1976). Entretanto, utilizando análises de seqüências da região de ITS do rDNA, LIU *et al.* (2001; 2002) identificaram o fungo *M. anisopliae* var. *majus* como sendo a forma anamorfa de *Cordyceps brittlebankisoides*, classificando *M. anisopliae* var. *majus* como um ascomiceto.

Morfologicamente, *M. anisopliae* apresenta-se como um fungo filamentoso, com micélio hialino e septado, possuindo conidióforos característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas. São conhecidas duas formas de reprodução: a reprodução assexual, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo e a reprodução parassexual, que envolve os fenômenos de

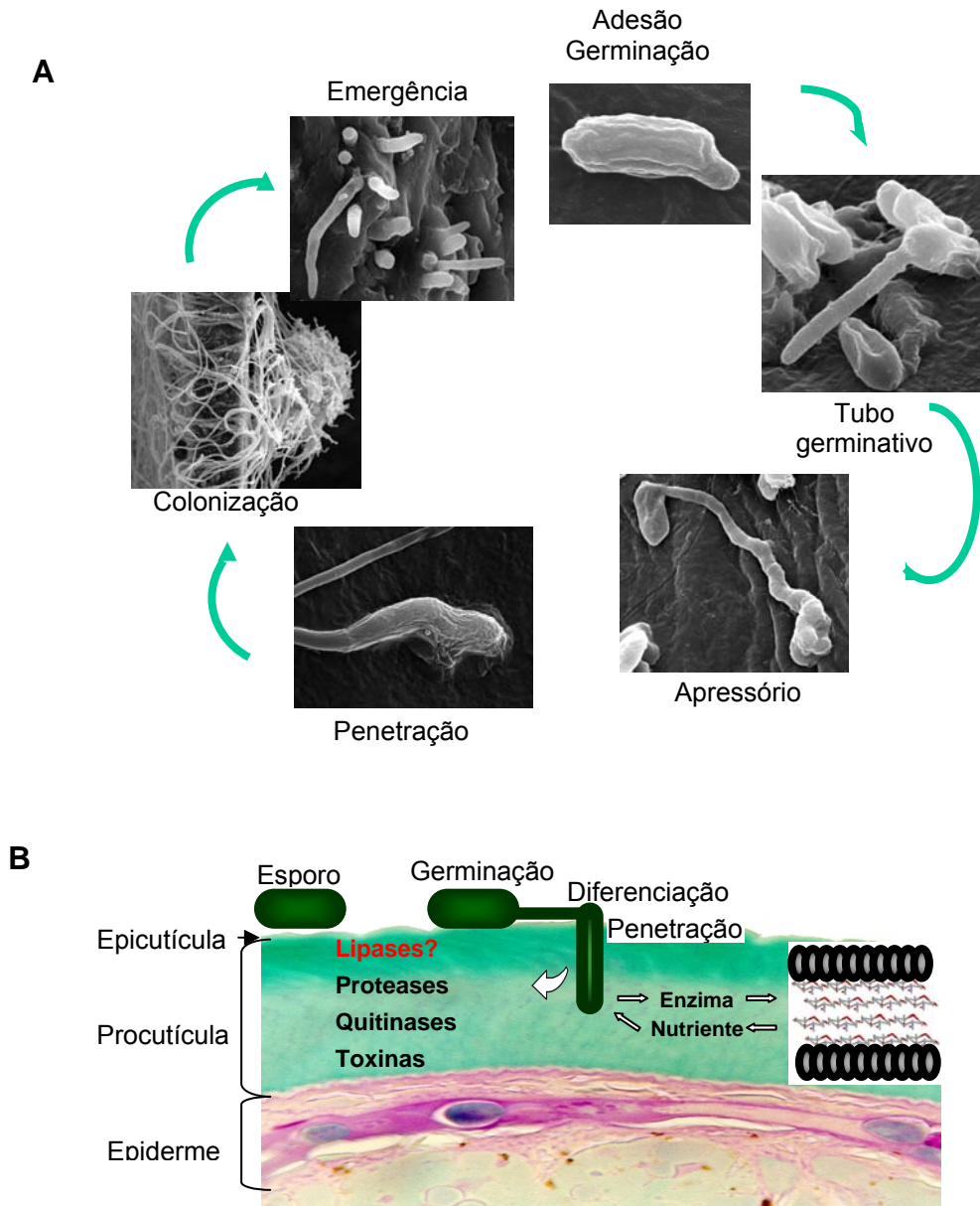


heterocariose e de recombinação mitótica. O desenvolvimento vegetativo de *Metarhizium* ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32°C, sendo a temperatura ideal entre 24 e 30°C e pH ótimo de 6,9 (DRIVER *et al.*, 2000; ARRUDA, 2005). No entanto, existe tolerância a um intervalo de pH relativamente amplo (2,0 a 8,5). Os requisitos nutricionais do fungo são poucos, podendo utilizar como fonte de carbono o amido, a glicose, o glicerol, a maltose, a sacarose e a quitina (ALVES, 1998). Em uma revisão da classificação, levando-se em consideração análises de seqüências do rDNA, DRIVER *et al.* (2000) reavaliaram a taxonomia do gênero *Metarhizium* e encontraram um alto nível de diversidade genética entre 123 isolados analisados. Seus resultados confirmaram a prevalência do grupo *M. anisopliae* e os autores reconheceram duas outras variedades (*M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum*), além de duas novas variedades de *M. flavoviride* (*M. flavoviride* var. *novazealandicum* e *M. flavoviride* var. *pemphigum*).

#### **1.4. O processo de infecção**

A patogenicidade de *M. anisopliae* sobre hospedeiros artrópodes depende de uma seqüência de eventos de ordem mecânica e bioquímica que ocorrem de maneira simultânea a partir da deposição do conídio sobre o tegumento do hospedeiro, seguido por germinação, penetração, colonização, exteriorização das estruturas do fungo e produção de esporos (ST LEGER *et al.*, 1991b; ARRUDA *et al.*, 2005).

O mecanismo de infecção ocorre pela combinação de dois processos: pressão mecânica, exercida pela extremidade modificada das hifas (apressório) e, degradação por enzimas hidrolíticas como proteases e quitinases (Figura 1) (KUCERA, 1980; ST. LEGER *et al.*, 1986a e 1991b; PINTO *et al.*, 1997; ALVES, 1998; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005). Encontrando condições ambientais favoráveis os esporos do fungo interagem hidrofobicamente com a cutícula do hospedeiro (BIDOCHKA *et al.*, 1997). A cutícula do hospedeiro é a principal barreira contra infecções e apresenta natureza química complexa nos artrópodes, sendo formada por duas camadas: a epicutícula e a procutícula (Figura 2). A procutícula compreende a maior parte da cutícula sendo sua composição basicamente de natureza protéica e quitinosa (CLARKSON & CHANRLEY, 1996). Nesta porção encontram-se, portanto, sítios específicos para ação de proteases e quitinases. Porém, para que o fungo alcance esta camada do tegumento é necessário que este transponha a epicutícula, camada superficial, composta majoritariamente por lipídeos esterificados, substratos específicos para a ação de lipases.



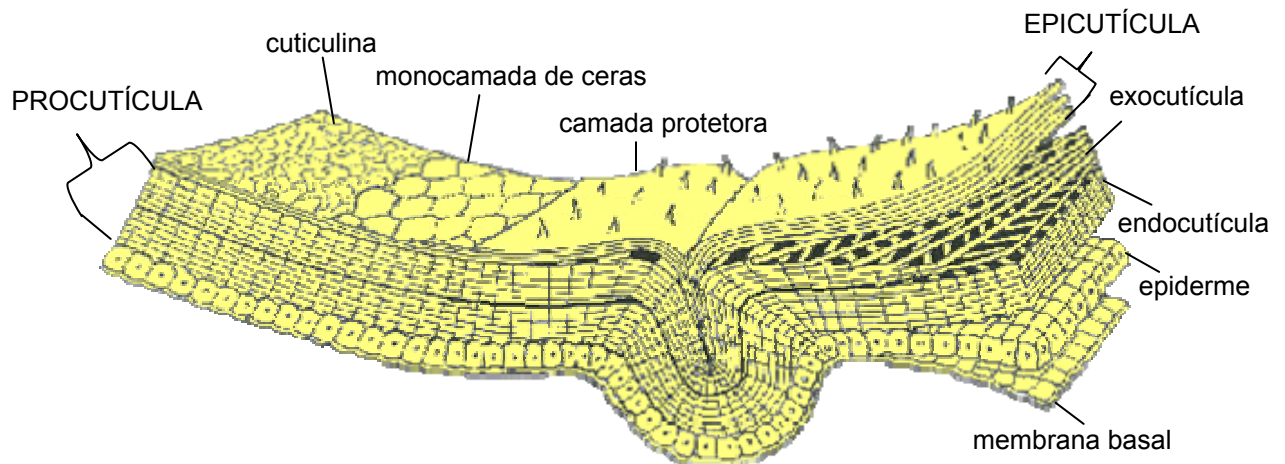
**Figura 1- Ciclo de infecção e possível mecanismo de penetração do fungo *Metarhizium anisopliae* em seus hospedeiros. (A) Ciclo de infecção sobre o carrapato bovino *B. microplus* (modificado de ARRUDA, 2005). (B) Durante o processo de penetração na cutícula dos hospedeiros o fungo secreta diversas enzimas hidrolíticas, com função relacionada a aquisição de nutrientes e degradação dos componentes do tegumento do hospedeiro. No detalhe uma representação esquemática da procutícula (cedida por SCHRANK, A.).**

A epicutícula é composta por pelo menos duas camadas distintas sendo a mais interna denominada de cuticulina composta por lipoproteínas, lipídeos polimerizados e polifenóis, e outra mais externa, uma camada orientada de ceras formada exclusivamente por lipídeos esterificados a partir de ácidos graxos (em sua maioria de cadeia longa) e álcoois (HUTCHINSON, 2005; MEYER, 2005). Em alguns insetos pode haver ainda uma camada protetora sobre esta camada de ceras com a função de protegê-la de processos abrasivos.

Na superfície do esporo ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas como proteases, esterases e N-acetilglicosidases, que auxiliam na adesão e na aquisição preliminar de nutrientes, causando modificações superficiais na cutícula do hospedeiro (ST LEGER *et al.*, 1990). Estes esporos germinam sobre o inseto produzindo um tubo germinativo, que, na extremidade, se modifica formando o apressório. *M. anisopliae* pode desenvolver o apressório *in vitro* ou *in vivo*, sendo influenciado pela superfície topográfica e por superfícies hidrofóbicas duras (ST. LEGER *et al.*, 1991b; MILNER, 2000). Após a formação do apressório, desenvolvem-se os grampos de penetração, que são caracterizados por uma alteração na parede celular da porção do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais fina e saliente (ST. LEGER *et al.*, 1991b; CLARKSON & CHARNLEY, 1996).

As primeiras enzimas comprovadamente secretadas no início da penetração são as proteases, que participam da hidrólise da porção protéica da cutícula. É possível que lipases precedam as proteases devido à camada de composição lipídica que é depositada na epicutícula dos artrópodes (ST LEGER

*et al.*, 1986a). Entretanto, muito pouco tem sido relatado em relação a estas enzimas que comprovadamente são secretadas por *M. anisopliae* (SILVA *et al.*, 2005). A atividade quitinolítica decorre à proteolítica devido à estrutura física da cutícula de artrópodes, pois, as fibras de quitina funcionam como sítios de ancoramento para algumas proteínas, estando, portanto recobertas por uma matriz de natureza protéica (BIDOCHKA *et al.*, 1997).



**Figura 2- Constituição básica do tegumento de artrópodes.** (modificado de <http://www.cals.ncsu.edu:8050>)

Após a penetração, inicia-se o processo de colonização. As hifas germinam, sofrem um engrossamento, ramificam-se e desenvolvem-se como blastosporos na hemocele. O fungo coloniza a cavidade interna do corpo do hospedeiro e produz metabólitos secundários, como ácidos orgânicos e toxinas ciclodepsipeptídicas, conhecidas como destruxinas (DTX) que vão pronunciar o processo patogênico. Foram descritos diferentes tipos de DTX: A, B, C, D e E, e outras 27 variantes (WANG *et al.*, 2003), as quais causam paralisia muscular e inibição da função de hemócitos e túbulos de Malpighi (BIDOCHKA *et al.*, 1997; MELO & AZEVEDO, 1998; KERSHAW *et al.*, 1999). As destruxinas, encontradas em *M. anisopliae* podem variar de acordo com o substrato utilizado pelo fungo. O tempo de colonização pode variar, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais (HSIAO & KO, 2001 e WANG *et al.*, 2003).

Os sintomas causados pela patogenia sobre o hospedeiro são perda da sensibilidade, descoordenação dos movimentos e paralisia, levando-o à morte (ALVES, 1998). Após a morte do hospedeiro, as hifas invadem órgãos internos e, com o esgotamento de nutrientes, se estendem para fora do tegumento. Sob condições ambientais apropriadas, ocorre a produção de esporos de coloração verde oliva que poderão ser disseminados pelo vento para infectar outros indivíduos (LAVERLAM, 1999).

### **1.5. Fatores de virulência de *M. anisopliae***

A grande variabilidade genética que apresenta esta espécie, resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência à luz ultravioleta (ALVES, 1998;

ARRUDA, 2005). Linhagens patogênicas de *Metarhizium* para uma espécie particular de hospedeiro, podem não apresentar as mesmas características de patogenicidade para outras espécies de artrópodes (HUXHAM *et al.*, 1989).

Para que as hifas atravessem a cutícula dos artrópodes, o reconhecimento e a resposta do hospedeiro parecem críticos para a seqüência de eventos que culmina em uma infecção eficiente. Sugere-se que várias classes de genes de patogenicidade estejam envolvidas nesse processo (FREIMOSER *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004).

Vários fatores têm sido apontados como possíveis determinantes de patogenicidade para *M. anisopliae*, entre os quais a produção de toxinas e a produção e secreção de enzimas hidrolíticas (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Alguns autores sugerem ainda, que a expressão diferenciada das superóxido-dismutases (SODs), enzimas que atuam como um sistema de defesa contra radicais livres de oxigênio (SCHRANK *et al.*, 1993; BITTENCOURT, 1998; BITTENCOURT *et al.*, 2004) e a presença de micovírus com genoma de dsRNA (GIMÉNEZ-PECCI *et al.*, 2002; TIAGO *et al.*, 2004) podem influenciar na virulência de *M. anisopliae*, comprometendo este potencial. Entretanto, poucos determinantes de patogenicidade foram funcionalmente caracterizados até o presente.

A possibilidade de correlação entre a virulência de fungos entomopatogênicos com a produção de enzimas que degradam a cutícula de insetos tem sido amplamente investigada. Entretanto, apenas a protease PR1A, uma protease do tipo subtilisina, está comprovadamente envolvida na entomopatogenicidade de *M. anisopliae* (ST. LEGER *et al.*, 1996a; JOSHI *et al.*,

1997). Quando cópias múltiplas do gene *pr1a*, fusionadas a um promotor constitutivo, foram inseridas em *M. anisopliae*, a sua eficiência no processo de infecção foi substancialmente aumentada, ocorrendo uma redução de 25% no tempo necessário para matar larvas de *Manduca sexta* em comparação com a linhagem selvagem (ST. LEGER *et al.*, 1996a). Entretanto, WANG *et al.* (2002) mostraram que mutantes espontâneos estáveis de *M. anisopliae* linhagem V275 deficientes para os genes *pr1a* e *pr1b* são capazes de infectar o inseto *Galleria mellonella*. A infecção ocorreu em níveis similares aqueles da linhagem selvagem, mas com uma redução na patogenicidade para outro inseto, *Tenebrio molitor*. Este fato demonstrou que estas proteases não são os únicos fatores envolvidos na patogenicidade (WANG *et al.*, 2002). Além disso nosso grupo pode comprovar que uma linhagem transformada de *M. anisopliae* superexpressando esta enzima não apresentou nenhuma alteração aparente na infecção do carrapato bovino, porém apresentou maior eficiência na morte de larvas de *Anticarsia gemnata* e da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (FRANCESCHINI, 2005).

*M. anisopliae* produz várias isoformas de proteases do tipo subtilisina PR1. No banco de seqüências *Genbank* encontram-se disponíveis seqüências de onze genes de protease da família das subtilisinas PR1 (PR1A a K), sendo essas encontradas em um banco de ESTs, estabelecido por FREIMOSER *et al* (2003). As diferentes isoformas das subtilisinas são oriundas de eventos de duplicação gênica e provavelmente estas isoformas estão relacionadas com a patogenicidade, aumento da adaptabilidade em diferentes ambientes e especificidade para o hospedeiro podendo ocorrer também com genes de outras



hidrolases envolvidas neste processo (BAGGA *et al.*, 2004; HU & ST LEGER, 2004).

A segunda classe de proteases com maior produção *in vitro*, quando *M. anisopliae* é cultivado em cutícula de insetos, é a de serino proteases relacionadas com tripsinas (PR2) (GILLESPIE *et al.*, 1998; ST. LEGER *et al.*, 1994). Duas destas isoformas de PR2 parecem estar associadas ao apressório, sugerindo que estão disponíveis durante os primeiros estágios da colonização da cutícula (ST. LEGER *et al.*, 1994). Embora o gene que codifica para uma destas serino proteases tenha sido clonado e caracterizado, ainda não está completamente elucidada a função de PR2 na patogenicidade. Entretanto, é possível que PR2 seja relevante na indução ou na ativação de PR1A (SMITHSON *et al.*, 1995).

As quitinases são outras enzimas hidrolíticas que, além de estarem envolvidas na morfogênese do fungo, podem também estar envolvidas na patogenicidade, como fatores de virulência. Acredita-se, que estas enzimas estejam relacionadas com a virulência durante o parasitismo em fungos fitopatogênicos, micopatogênicos e entomopatogênicos (HASSAN & CHARNLEY, 1989; ULHOA & PEBERDY, 1991; DE LA CRUZ *et al.*, 1992; ULHOA & PEBERDY, 1993; ST LEGER *et al.*, 1998; KISHMOTO *et al.*, 2002; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005). Provavelmente estas enzimas atuem sinergisticamente com as enzimas proteolíticas para solubilizar a cutícula do hospedeiro durante a penetração (ST LEGER *et al.*, 1986a, 1987, 1993 e 1998). Em relação ao entomoparasitismo, ainda não está completamente elucidado o papel das quitinases no processo de penetração da cutícula.

Apenas três genes que codificam quitinases de *M. anisopliae* foram clonados: genes *chit1*, *chi2* e *chi3* (BOGO *et al.*, 1998; FREIMOSER *et al.*, 2003; BARATTO, 2005) e um quarto gene, o gene *chi11* descrito por KANG *et al.* (1998). Entretanto, foi sugerido que o gene *chi11* é oriundo de *E. coli*, sendo seu isolamento um artefato da construção da biblioteca do fungo, pois o gene apresenta 100% de homologia com o gene *chiA*, identificado em um projeto genoma de *E. coli* (FRANCETIC *et al.*, 2000). SCREEN *et al.* (2001) demonstraram que transformantes de *M. anisopliae* var. *anisopliae* superexpressando o gene *chit1* (que codifica para uma quitinase de 42 kDa) de *M. anisopliae* var. *acridum* não alterou a patogenicidade contra *M. sexta*. Porém, isto não significa que estas enzimas não participem da infecção.

Estudando o complexo quitinolítico secretado por *M. anisopliae* var. *anisopliae* em condições de indução, PINTO *et al.* (1997) demonstraram a presença de pelo menos três enzimas quitinolíticas e mais recentemente, SILVA *et al.* (2005) detectaram pelo menos seis enzimas quitinolíticas. Uma destas quitinases, de 30kDa (CHIT30), apresenta atividade de endo e exoquitinase. Como esta capacidade provavelmente habilita esta quitinase a degradar mais eficientemente a quitina, é provável que desempenhe uma função importante durante o processo de penetração dos hospedeiros. SILVA *et al.* (2005) demonstraram a presença desta quitinase CHIT30 durante o processo de infecção e penetração de *M. anisopliae* sobre o carrapato bovino *B. microplus* através de imunolocalização, sugerindo a importância desta enzima no processo de patogenicidade. Em um trabalho com outro fungo entomopatogênico, *Beauveria bassiana*, a superexpressão de uma endoquitinase, denominada Bchit1,

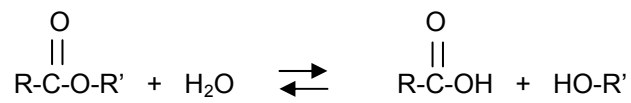
ocasionou um aumento da virulência para um afídeo (*Myzus persicae*), diminuindo 50% a sua concentração letal e em 50% o tempo que levou para matar os insetos adultos (FANG *et al.*, 2005), o que contribui para a conclusão que as quitinases são enzimas que estão potencialmente envolvidas na patogenicidade.

## **1.6. Lipases**

Lipases (triacilglicerol ester hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam, entre outras reações, a hidrólise das ligações éster de lipídeos gerando álcoois e ácidos graxos (Figura 3). São enzimas de considerável importância fisiológica e industrial, constituindo um dos mais importantes grupos de biocatalizadores com aplicação biotecnológica (JAEGER & EGGERT, 2002), por serem utilizadas nos mais variados segmentos industriais como a indústria química, de alimentos, farmacêutica, do papel, coureira, de cosméticos, detergentes, entre outras (SHARMA *et al.*, 2001; JAEGER & EGGERT, 2002; REETZ, 2002).

O número de lipases comerciais vêm crescendo desde os anos 80 em virtude da demanda por estes biocatalizadores visto suas características de grande potencial industrial (BORNSCHEUER *et al.*, 2002). A maioria das lipases comerciais é de origem microbiana, destacando-se alguns fungos filamentosos pelo baixo custo de extração, estabilidade térmica e de pH, especificidade a substratos e atividade em solventes orgânicos (SAXENA *et al.*, 1999).

### Hidrólise e esterificação



### Acidólise (reação de éster com ácido)



### Alcoólise (reação de éster com álcool)



### Transesterificação (reação de éster com éster)

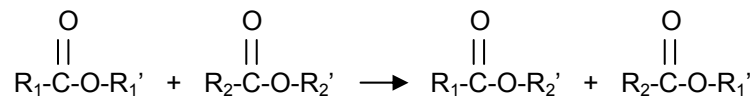


Figura 3- Reações catalisadas por lipases.

Ao contrário das esterases, as lipases possuem uma atividade pronunciada na interface óleo-água, fenômeno este que ocorre por características estruturais específicas pertencentes a este grupo de enzimas (JAEGER *et al.*, 1999; UEDA *et al.*, 2002). As lipases possuem um oligopeptídeo helicóide, uma espécie de “tampa” que protege o sítio ativo. Ao interagir com uma superfície hidrofóbica, o sítio ativo é exposto, permitindo livre acesso ao substrato; processo este característico das verdadeiras lipases, chamado de ativação interfacial (REETZ, 2002). O sítio ativo destas enzimas é caracterizado geralmente por uma tríade composta de serina, histidina e aspartato, crucial para todas reações catalisadas pelas lipases, sendo portanto, classificadas como serino hidrolases (JAEGER *et al.*, 1999; REETZ, 2002).

### **1.6.1. Lipases e lipídeos**

Os lipídeos, principal alvo de ação das lipases, possuem diversas funções no metabolismo e constituição de todos seres vivos, formando o quarto principal grupo de moléculas biológicas encontradas em todas as células e apresentando uma variedade estrutural maior do que todas as outras moléculas biológicas (VOET *et al.* 2000). Os lipídeos são caracterizados basicamente por possuírem um esqueleto carbônico, serem majoritariamente hidrofóbicos e a maioria dos seus constituintes ser insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos. Não são poliméricos mas têm, por suas características estruturais e químicas, a capacidade de se agregarem, exercendo neste estado sua mais característica função como matriz estrutural de membranas biológicas. Além de servirem como estoque de energia e como componentes estruturais de membranas celulares, são

também extremamente importantes como efetores biológicos. Os lipídeos atuam na sinalização intra e extracelular, transporte intracelular e transcrição gênica, entre outras funções (VOET *et al.* 2000; STEHR *et al.*, 2003). Diversas substâncias constituem este importante grupo de moléculas, como gorduras, óleos, ácidos graxos, algumas vitaminas, hormônios entre outras. Além disso, os lipídeos podem exercer a função de proteção contra dessecação ao formarem uma barreira impermeável a água, como é o caso dos lipídeos que ocorrem na cutícula de plantas e artrópodes, protegendo-os também contra predadores e infecções microbianas.

Lipídeos esterificados formados a partir de álcoois e ácidos graxos são os principais substratos para ação das lipases e, como substratos para estas, podem variar muito em sua composição, sendo imprescindível apenas a ligação éster, podendo ser tri, di ou monoacilgliceróis ou ainda moléculas lineares, cíclicas ou alifáticas.

Os produtos gerados a partir da ação de lipases podem desencadear processos fisiológicos importantes nos mais diversos organismos, seja em reações endógenas e benéficas do próprio metabolismo, como também em relações ecológicas e algumas vezes deletérias, como no caso de infecções por organismos parasitários, especialmente infecções microbianas.

### **1.7. Lipases e sistemas de infecção**

Além das diversas possibilidades de aplicação industrial e importância fisiológica, é crescente a evidência de que lipases são importantes fatores de virulência microbianos (STEHR *et al.*, 2003). Vem aumentando o número de

trabalhos relacionando as lipases e os mais diversos sistemas de infecção, ou comprovando papéis importantes exercidos por estas enzimas nestes sistemas.

Entre os muitos microrganismos estudados onde se caracteriza a participação de lipases durante seu processo de infecção, estão as bactérias. Algumas do gênero *Staphylococcus* são amplamente estudadas em relação à participação destas enzimas. *S. epidermidis*, descrito como um habitante comensal da pele de seres humanos, pode se tornar um patógeno oportunista e duas lipases secretadas durante o processo de infecção podem ter um papel importante, suportando o crescimento e a colonização ao clivar triacilgliceróis derivados do sebo (LONGSHAW *et al.*, 2000). Isolados clínicos de *S. aureus* oriundos de infecções profundas produzem lipases em níveis muito maiores que os isolados superficiais, indicando que estas enzimas possam ser importantes na nutrição ou na disseminação da bactéria (ROLLOF *et al.*, 1987). Estudos *in vitro* com lipase purificada de *S. aureus* mostraram que ela pode influenciar a quimiotaxia de células do sistema imune humano (ROLLOF *et al.*, 1988). Além disso, granulócitos incubados com a lipase mostraram um decréscimo em relação à capacidade fagocitária, possivelmente por danos estruturais na superfície de células imune causados pela enzima microbiana. Outra forte evidência da participação de lipases no processo de infecção de *S. aureus* é seu potencial imunogênico, já que anticorpos IgG anti-lipase foram detectados em pacientes infectados por este microrganismo (RYDING *et al.*, 1992). Outra importante bactéria que habita a pele de seres humanos é o agente causador da acne *Propionibacterium acnes*, que secreta muitas enzimas, incluindo lipases relacionadas com a colonização da pele humana. Ácidos graxos livres liberados

por ação da atividade lipolítica facilitam a adesão bacteriana e, conseqüentemente, facilitam a colonização dos folículos sebáceos (MISKIN *et al.*, 1997). As lipases também atuam no processo de infecção de *Pseudomonas aeruginosa* de maneira sinérgica com outras enzimas como uma fosfolipase C, desorientando a resposta imune, iniciando danos teciduais e estimulando processos inflamatórios (KÖNIG *et al.*, 1996). Por tudo isso fica evidente a relevância destas enzimas nos sistemas bacterianos de infecção. Porém, estes não são os únicos microrganismos onde as lipases participam ativamente.

Os fungos são outro importante grupo de microrganismos patogênicos. Leveduras do gênero *Malassezia*, apesar de constituírem a flora normal da pele de humanos, podem causar dermatites, infecções brandas de pele e até mesmo infecções sistêmicas. Seis de sete espécies de *Malassezia* requerem lipídeos exógenos para seu crescimento (PAPAVASSILIS *et al.*, 1999). A adição de um indutor de lipase aumentou o crescimento celular e induziu a transição desta levedura para seu estágio filamentosos, associado com a doença (STEHR *et al.*, 2003). Para a levedura negra *Hortea werneckii*, causadora de uma importante infecção de pele, a atividade lipolítica descrita por GÖTTLICH *et al.* (1995) aumentou a quantidade de interações hidrofóbicas por liberação de ácidos graxos livres, o que pode facilitar a adesão à superfície do hospedeiro e a conseqüente colonização do mesmo. Por meio de técnicas moleculares foi comprovada a expressão durante a infecção experimental de ratos de quatro genes correspondentes a lipases de *Candida albicans* (GILFILLAN *et al.*, 1998), uma levedura comensal que pode se tornar invasiva e patogênica e é bastante comum em amostras clínicas. Esta foi a primeira evidência de que lipases secretadas por



um fungo patogênico de humanos estão envolvidas no processo de infecção (STEHR *et al.*, 2003). STEHR *et al.* (2004) mostraram ainda que vários genes de lipases são expressos em níveis diferentes e em diferentes estágios de infecção em modelos experimentais e em amostras de pacientes infectados por *C. albicans*.

A participação de lipases também é caracterizada no sistema de infecção de fungos filamentosos fitopatogênicos. Em *Alternaria brassicicola*, uma lipase de superfície de esporo tem atividade patogênica crucial para o desenvolvimento do processo de infecção em folhas de couve flor, e parece estar associada com a adesão do esporo à superfície do hospedeiro e com a penetração na cutícula do mesmo (BERTO *et al.*, 1999). Além disso, esta enzima também possui uma atividade inespecífica de cutinase que pode contribuir durante o processo de infecção. Quando a atividade desta enzima foi bloqueada, as lesões resultantes da infecção foram reduzidas em torno de 90% (BERTO *et al.*, 1999). Em outro importante fitopatógeno, *Botrytis cinerea*, uma lipase mostrou ser um fator essencial para a patogenicidade pela sua presença inicial no sítio de infecção na folha do hospedeiro (COMMÉNIL *et al.*, 1999). Além disso, a inibição da atividade de lipase preveniu a infecção por *B. cinerea* de tecidos de folhas de tomateiros (COMMÉNIL *et al.*, 1998).

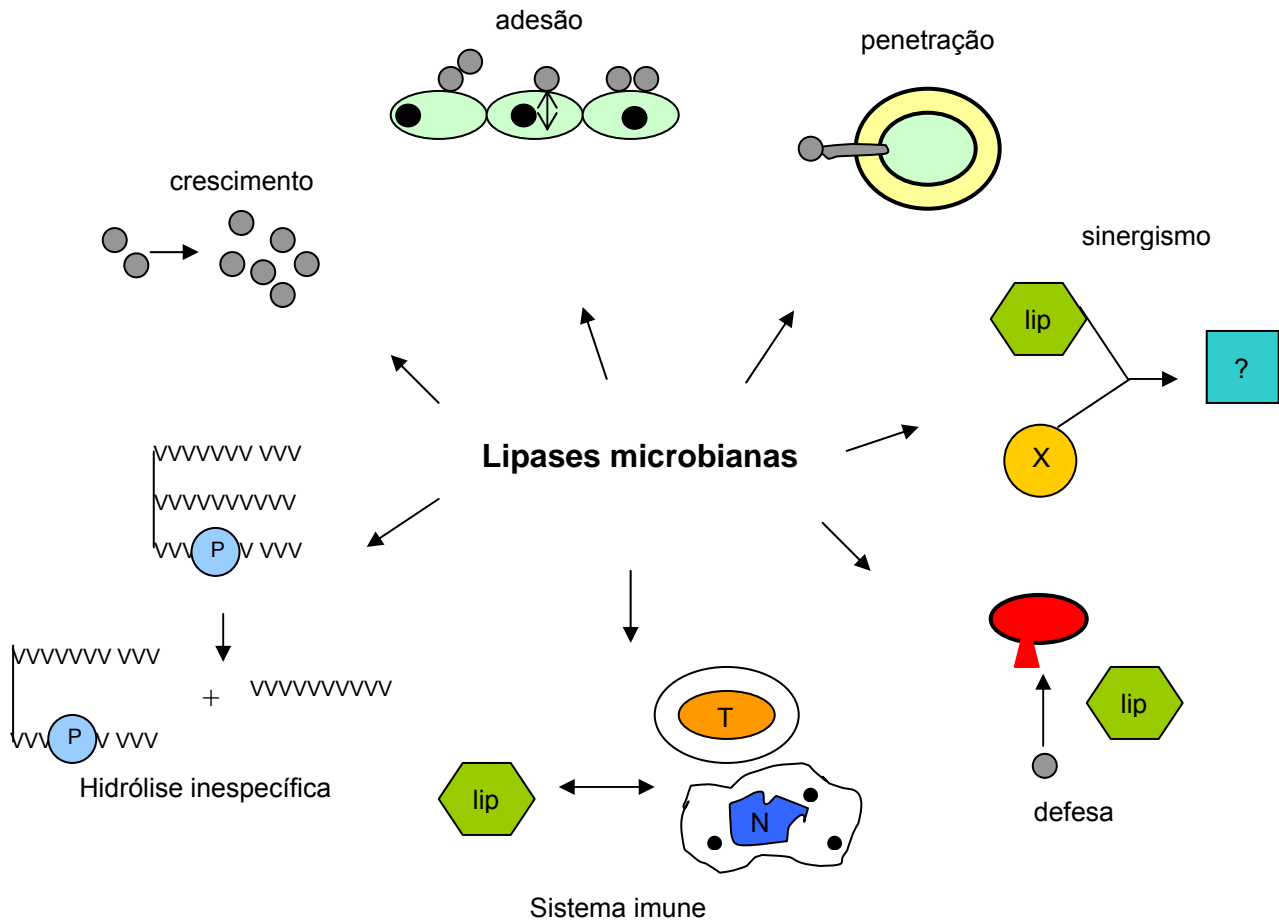
A caracterização de lipases nos mais diversos sistemas de infecção vem atribuindo diferentes papéis desempenhados por estas enzimas. Como descrito anteriormente, destacam-se algumas funções como influência na resposta imune, adesão, sinergismo entre outros (Figura 4). Apesar destas fortes evidências, estudos sobre lipases de fungos patogênicos vêm sendo negligenciados (STEHR

*et al.*, 2003). Em relação às lipases de fungos patogênicos de artrópodes ou microrganismos patogênicos destes organismos em geral, os estudos são muito escassos e publicações referentes às lipases durante o processo de infecção nestes sistemas específicos ainda não existem.

### **1.8. Lipases e *M. anisopliae***

Lipases e esterases estão também supostamente envolvidas no processo de infecção de *M. anisopliae*, pois dentre os constituintes da cutícula dos hospedeiros estão os lipídeos (ST. LEGER *et al.*, 1986a, 1991a; CLARKSON & CHARNLEY, 1996; SILVA *et al.*, 2005).

Recentemente, nosso grupo comprovou que *M. anisopliae* é capaz de produzir lipases induzidas por diferentes lipídeos como fonte de carbono (SILVA *et al.*, 2005). Apresentamos também uma metodologia de extração desta enzima, já que, após a cultura líquida de *M. anisopliae* nestes meios indutores, não detectávamos atividade lipolítica no sobrenadante de cultura, apesar do bom crescimento do fungo e do consumo da fonte lipídica presente no meio de cultivo. Esta dificuldade de detecção da atividade lipolítica em *M. anisopliae* pode ser um dos fatores que ocasionam a ausência de trabalhos no estudo destas enzimas neste sistema, apesar da grande possibilidade de que estas lipases possam estar presentes no processo de infecção. A produção de lipases por *M. anisopliae* relatada pelo nosso grupo foi o primeiro trabalho específico sobre lipases deste fungo. Anteriormente, apenas detecções pontuais de atividade de lipase foram relatadas (ROBERT & AL AIDROOS, 1985; ST LEGER *et al.*, 1986a; NAHAR *et al.*, 2004).



**Figura 4- Possíveis funções de lipases microbianas extracelulares durante o processo de infecção.** Crescimento: lipólise pode disponibilizar nutrientes; adesão: liberação de ácidos graxos livres aumenta a quantidade de interações hidrofóbicas, facilitando a adesão célula-célula e interação célula-superfície hospedeira; penetração: degrada camadas lipídicas, facilitando a penetração; sinergismo: lipases atuam com outras enzimas; defesa: degradação por lise de componentes celulares de outros microrganismos e células que interfiram na infecção do hospedeiro; sistema imune: lipases e seus produtos podem ter efeito em células imunes iniciando processos inflamatórios; hidrólise inespecífica: lipases podem exercer outras atividades como fosfolipólítica (modificado de STEHR *et al.*, 2003).

Atualmente, outras abordagens vêm sendo feitas a fim de se identificar outras proteínas participantes do processo de infecção de *M. anisopliae*, principalmente com o uso de ferramentas moleculares que permitem uma visão global do padrão de expressão deste fungo frente a componentes estruturais dos seus hospedeiros (FREIMOSER *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2004). No banco de ESTs (*expressed sequence tags*) estabelecido por FREIMOSER *et al.* (2003), foram identificadas seqüências parciais prováveis codificadoras de enzimas lipolíticas, sendo uma esterase e três lipases. Neste trabalho, FREIMOSER *et al.* (2003) cultivaram duas variedades de *M. anisopliae* em meios de cultura líquida acrescido com cutícula de insetos para indução de enzimas relacionadas com a infecção. Duas destas seqüências possivelmente correspondentes a enzimas lipolíticas foram identificadas para a variedade *anisopliae*, com um amplo espectro de hospedeiros e as outras duas para a variedade *acridum*, específica para gafanhotos.

A fim de contribuir na elucidação da possível participação de lipases durante o processo de infecção de hospedeiros artrópodes por *M. anisopliae*, objetivamos, neste trabalho, estudar a regulação da secreção de enzimas lipolíticas em diferentes meios indutores, bem como detectar esta atividade durante a infecção do carrapato bovino *B. microplus*. Para isso, desenvolvemos uma metodologia de detecção *in situ* de atividade lipolítica durante o processo de infecção sobre *B. microplus* e utilizamos diferentes meios de cultura com constituintes do tegumento de hospedeiros artrópodes e outros compostos de mesma natureza para comparação. Avaliamos a atividade lipolítica durante a

infecção em ensaios *in vivo* e *ex vivo* e comprovamos diferenças significativas de atividade lipolítica e crescimento do fungo nos diferentes meios testados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar o complexo lipolítico de *M. anisopliae* e sua possível participação durante o processo de infecção utilizando como modelo o carrapato bovino *B. microplus*.

### 2.2. Objetivos Específicos

Desenvolver uma metodologia capaz de detectar atividade de lipase de *M. anisopliae* durante a infecção do carrapato bovino *B. microplus*

Detectar atividade lipolítica durante o processo de infecção do carrapato bovino *B. microplus*

Avaliar a regulação da atividade lipolítica de *M. anisopliae* frente a diferentes fontes de carbono, incluindo compostos constituintes das cutículas dos hospedeiros deste fungo

Purificar uma lipase produzida em cultura líquida de *M. anisopliae*

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagem do fungo *M. anisopliae* e manutenção

O fungo *M. anisopliae* variedade *anisopliae*, linhagem E6, isolada de *Deois flavopicta* (Homoptera, Cercopidea), gentilmente cedida pelo professor João Lúcio de Azevedo (Coleção da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz- ESALQ-USP) foi utilizado para a realização desse trabalho. O microrganismo foi mantido em Meio de Cove completo (3.2.1).

#### 3.2. Meios de Cultivo

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. Aos meios de cultura sólidos, foi adicionado ágar para uma concentração final de 1,5%.

##### 3.2.1. Meio de Cove completo (MCc)

Composição: 1% de glicose; 0,6% de NaNO<sub>3</sub>; 0,15% de caseína hidrolisada; 0,05% de extrato de levedura; 0,2% de peptona. O pH foi ajustado para 7,0, utilizando NaOH 1M (COVE, 1966). Após esterilização em autoclave foram adicionados, assepticamente, 2% de solução de sais e 0,04% de solução de elementos traços. A solução de sais (KCl 2,6%; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,6%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7,6% (p/v)) e a solução de elementos traços (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,004%; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,04%; FeSO<sub>4</sub> 0,001%; MnSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,08%; NaMnO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,08%; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,08% (p/v)) foram esterilizadas separadamente em autoclave, aliquotadas e armazenadas até seu uso.

### 3.2.2. Meio de Cove modificado (MCm)

Composição: NaNO<sub>3</sub> 0,6%, glicose 0,2%, peptona 0,2% e extrato de levedura 0,05%. O meio foi esterilizado em autoclave.

### 3.3. Suspensão de esporos

*M.anisopliae* foi cultivado em placas de Petri contendo meio MCc sólido (3.2.1) e incubado a 28°C durante 5 dias, até a esporulação. Os esporos foram coletados com auxílio de alça de Drigalski em 3,0mL de solução de Tween 80 0,01% (v/v), esterilizada por filtração. A suspensão de esporos obtida foi lavada duas vezes com água destilada estéril por centrifugação (3000 x g durante 10 minutos). Os esporos foram ressuspensos em água destilada estéril e contados em câmara de Neubauer. Foi testada a presença de contaminantes nas suspensões, retirando-se 10 µl das mesmas e colocando-as em um tubo de ensaio contendo 3 mL de meio LB líquido (1% de triptona; 5% de extrato de levedura; 1% de NaCl (p/v). Suspensões contendo cerca de 10<sup>8</sup> esporos/mL foram estocadas a 4°C até o uso, por no máximo uma semana.

### 3.4. Bioensaio com carrapatos bovinos *Boophilus microplus*

Fêmeas ingurgitadas de *B.microplus* foram selecionadas por peso e tamanho para bioensaios. Os carrapatos foram desinfetados superficialmente com hipoclorito 2,5% por 30 segundos, lavados com solução salina 0,9%, seguida de duas lavagens com água destilada estéril. Após esta desinfecção, os carrapatos foram imersos em suspensão de esporos (10<sup>8</sup> esporos/mL) por 1



minuto e acondicionados em placas de Petri estéreis. Estas placas foram mantidas a 28<sup>o</sup>C e >80% umidade. Carrapatos controle foram tratados da mesma maneira, com exceção da imersão em suspensão de esporos. Carrapatos controle e inoculado foram coletados em diferentes tempos (6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120h) para as diferentes análises realizadas.

Nos ensaios com carrapatos mortos infectados, antes de efetuar o processo descrito acima, os carrapatos foram congelados a -20<sup>o</sup>C por 1 hora.

#### **3.4.1. Extração das proteínas da superfície de carrapatos dos bioensaios**

Para a extração das proteínas dos carrapatos oriundos dos bioensaios, 200µl de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,25% (v/v) de SDS (SIGMA) (SILVA *et al.*, 2005) foram adicionados por carrapato e misturados vigorosamente em vórtex por 2 minutos. Após este processo, os carrapatos foram removidos e a solução resultante foi centrifugada por 10 min / 10.000 rpm.

#### **3.5. Cultivo de *M. anisopliae* em meio líquido com diferentes fontes de carbono**

O fungo foi cultivado a partir de um inóculo de 10<sup>6</sup> esporos/mL em 20mL de Meio de Cove modificado (3.2.2.), suplementado com diferentes fontes de carbono e diferentes combinações, como: glicose 1%; glicose 0,2% + óleo de oliva 1%; glicose 1% + óleo de oliva 1%; glicose 1% + estereato de colesteril (colesterol esterificado) 1% (SIGMA); estereato de colesteril 1% + quitina cristalina 0,8% (SIGMA); estereato de colesteril 1% + quitina cristalina 0,8% + glicose 1% e

estereato de colesteril 1% (p/v). Os frascos foram incubados em agitador orbital a 150 rpm a 28°C. Após o crescimento por 48, 72 e 96 h, foi adicionado SDS 0,25% (v/v) para extração das enzimas, conforme descrito por SILVA *et al* (2005). Após agitação, as culturas foram filtradas em papel Whatman nº 1 para coleta do sobrenadante para análises em zimogramas e ensaios enzimáticos. O micélio coletado foi utilizado para determinação da biomassa por secagem em estufa a 80°C até estabilização do peso.

### **3.6. Ensaios enzimáticos**

#### **3.6.1. Atividade de lipase**

A atividade lipolítica presente nos sobrenadantes das culturas foi ensaiada utilizando diferentes p-nitrofenil (pNP) ésteres como substratos (WINKLER & STUCKMANN, 1979; SILVA *et al.*, 2005), tais como p-nitrofenil palmitato (pNPP – SIGMA), p-nitrofenil miristato (pNPM – SIGMA) e p-nitrofenil butirato (pNPB – SIGMA). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços com 10µL de amostra adicionados a 90µL de uma solução contendo 3mg de substrato (pNP) dissolvido em 1mL de isopropanol misturado a 9mL de 50mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 40mg de Triton X-100 e 10mg de goma arábica. Após 2h de incubação a 37°C, o aumento da absorbância foi medido espectrofotometricamente a 410nm em leitor de placas Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). O controle foi realizado adicionando-se tampão ao invés da amostra. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por

hora, nas condições descritas acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade de lipase durante o processo de infecção sobre o carrapato *B. microplus* foi determinada com o substrato pNPP preparado como descrito anteriormente. Os carrapatos infectados oriundos dos bioensaios foram totalmente imersos na solução de substrato em cubetas plásticas de 1,5mL. Após 30 minutos de incubação a 37<sup>0</sup>C, os carrapatos foram removidos e a absorbância foi medida espectrofotometricamente a 410nm utilizando como controle uma preparação com carrapato não infectado. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu$ mol p-nitrofenol por minuto nas condições descritas acima. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

### **3.6.2. Atividade de quitinase**

Para determinar a atividade enzimática de quitinase em sobrenadantes de cultivos foi utilizada quitina coloidal como substrato em uma modificação do método descrito por REISSIG *et al.* (1955). A reação continha 100 $\mu$ l da amostra, 100 $\mu$ l de tampão de acetato 50mM pH 5,4 e 100 $\mu$ l de 4mM de substrato diluído no mesmo tampão. As reações foram incubadas a 37<sup>0</sup>C durante 24h, sob agitação branda. A reação foi centrifugada e foram retirados 100 $\mu$ l, aos quais, adicionou-se 30 $\mu$ l de ácido bórico 0,8M pH 9,1. A mistura foi incubada a 100<sup>0</sup>C por 3 minutos e resfriada imediatamente em gelo. Foi adicionado 1,0mL de solução DMAB (*p*-Dimetilaminobenzaldeído 1%, HCl 1,25%) diluído 1X em ácido acético glacial e a mistura foi incubada a 37<sup>0</sup>C por 10 minutos para desenvolvimento e estabilização

da coloração. As reações foram quantificadas por medida de absorvância à 585nm em espectrofotômetro. Uma unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µmol de NAcGlc por minuto por mL a 37°C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O controle foi realizado adicionando-se tampão ao invés da amostra.

### **3.6.3. Atividade de protease**

Atividade de protease foi determinada usando azocaseína 2% (p/v) (SIGMA) como substrato (SANGORRÍN *et al.*, 2001). A 100µL de substrato foi adicionado 200µL de tampão fosfato 20mM pH 8,5 e 100µL de amostra. A mistura foi incubada a 50°C por 15 minutos. A reação foi parada adicionando 800µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. Os tubos foram centrifugados (15min/13.000rpm) e o produto foi medido espectrofotometricamente em 400nm. Brancos foram realizados adicionando-se TCA 20% antes da adição da amostra. Uma unidade (U) de protease foi definida como a quantidade de enzima que aumenta a absorvância em 0,1 unidade em 1h conforme condições acima. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

### **3.7. Quantificação de proteínas totais**

A medida de proteínas totais foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA Protein Assay - PIERCE), utilizando albumina bovina como padrão (SMITH *et al.*, 1985).

### **3.8. Preparação de amostras para eletroforese**

Alíquotas dos sobrenadantes de cultura líquida e amostras extraídas de carrapatos provenientes de bioensaios foram concentradas em ultraconcentrador (Centrivap Concentrator - LABCONCO). Após liofilização total das amostras, estas foram ressuspensas em tampão de amostra 1x (Tris-HCl 0,05M pH 6,8, glicerol 10% (v/v), traços de azul de bromofenol) no volume máximo de 20 $\mu$ L. Para géis SDS-PAGE as amostras foram ressuspensas em 20 $\mu$ L de tampão de amostra desnaturante 1x (Tris-HCl 0,05M pH 6,8, 2-mercaptoetanol 4%, SDS 2%, glicerol 10% (v/v), traços de azul de bromofenol).

### **3.9. Eletroforese**

Para a montagem e eletroforese dos géis foi utilizado o sistema “Mini Protean II Electrophoresis Cell” (Bio Rad), seguindo os procedimentos do fabricante.

#### **3.9.1. Gel SDS-PAGE**

As proteínas secretadas foram analisadas em gel desnaturante de poli-acrilamida segundo LAEMMLI (1970). A solução do gel separador 12% continha: Tris-HCl 0,375M pH 8,8, acrilamida-bisacrilamida (29:1 (p/v)) 10%, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,05% (v/v) e TEMED 0,05% (v/v). A solução do gel concentrador 4% continha: Tris-HCl 0,125M pH 6,8, acrilamida-bisacrilamida (29:1 (p/v)) 10%, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,05% (v/v) e TEMED 0,05% (v/v). O

sistema foi montado em cuba apropriada e preenchido com tampão de corrida 1x (Tris 0,3%, glicina 1,44% e SDS 0,1%(p/v)). As amostras ressuspensas em tampão de amostra desnaturante foram expostas a temperatura de 100°C por 5 minutos e aplicadas no gel. Após a eletroforese (30mA por aproximadamente 2h), os géis foram corados com azul de comassie coloidal (sulfato de amônio 10% (p/v), ácido fosfórico 2% (v/v), metanol 20% (v/v) e comassie blue G 0,05% (p/v) ou com nitrato de prata segundo BLUM *et al.* (1987).

### **3.9.2. Zimograma**

As proteínas secretadas foram analisadas em gel nativo de poliacrilamida 10% utilizando o substrato fluorogênico 4-metilumbeliferil (MUF)- butirato (SIGMA) de acordo com DIAZ, *et al.* (1999). A solução do gel separador 10% continha: Tris-HCl 0,375M pH 8,8, acrilamida-bisacrilamida (29:1 (p/v)) 10%, persulfato de amônio 0,05% (v/v) e TEMED 0,05% (v/v). A solução do gel concentrador 4% continha: Tris-HCl 0,125M pH 6,8, acrilamida-bisacrilamida (29:1 (p/v)) 10%, persulfato de amônio 0,05% (v/v) e TEMED 0,05% (v/v). Após a polimerização, o sistema foi montado em cuba apropriada, que foi preenchida com tampão de corrida 1x (Tris 0,3% (p/v) e glicina 1,44% (p/v)). As amostras foram aplicadas e foi realizada a eletroforese (20mA por aproximadamente 1h e 30 minutos). Após eletroforese, os géis foram imersos em 50mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 2% Triton X-100 e 10µM Metilumbeliferil (MUF)-butirato, mantidos a 37°C por 10min sob agitação branda (70rpm). As bandas de atividade foram reveladas sob luz ultravioleta (UV-B lamp Sankyo Denki G15T8E, Japão) e fotografadas.

### **3.10. Análise densitométrica das bandas de atividade dos zimogramas**

As bandas de atividade lipolítica dos zimogramas foram analisadas e quantificadas utilizando o programa UN-SCAN-IT gel software v.5.1 (Silk Scientific, Inc., Orem, UT). A intensidade de fluorescência foi expressa como porcentagem relativa em comparação com a banda de atividade lipolítica mais intensa (banda “II” canaleta 5 do zimograma dos carrapatos vivos infectados (Figura 6B), ao qual foi dado um valor arbitrário de 100.

### **3.11. Purificação parcial de lipases**

#### **3.11.1. Resina de gel filtração BioGel A 0,5**

*M. anisopliae* foi cultivado em biorreator de 10L com meio base (SILVA *et al.*, 2005) suplementado com óleo de oliva 1%. Após 50 horas de cultivo as proteínas foram extraídas com adição de Triton X-100 a 0,25% (v/v) seguido de agitação e 500mL do sobrenadante resultante foram concentrados 10 vezes por liofilização. 3 mL da amostra liofilizada, contendo aproximadamente 120U de atividade de lipase (determinada com pNP-palmitato), foram aplicados em coluna de gel filtração (1,8 x 90cm) com 180 mL de resina BioGel A 0,5m, a um fluxo de eluição de 15mL/h e as frações foram coletadas em intervalos de 12 minutos. O tampão de eluição utilizado foi Tris-HCl 50mM pH 8,0. Para cada fração coletada foi determinada a absorbância em 280nm, a atividade de lipase (substrato pNP-palmitato) e o volume coletado.

### **3.11.2. Resina de troca iônica DEAE-Sepharose**

As 5 últimas frações com atividade lipolítica provenientes da cromatografia em gel filtração foram reunidas e 4mL, contendo aproximadamente 10 U, foram aplicados em coluna de troca iônica DEAE-Sepharose contendo 5 mL de resina. O fluxo aplicado foi de 1mL/min e frações de 2mL foram coletadas. A lavagem da coluna foi realizada com 50mL de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0. A eluição das proteínas foi realizada com gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0M no mesmo tampão utilizado na lavagem. Para cada fração coletada foi determinada a absorvância em 280nm e a atividade de lipase (substrato pNP-palmitato).

### **3.12. Análise estatística**

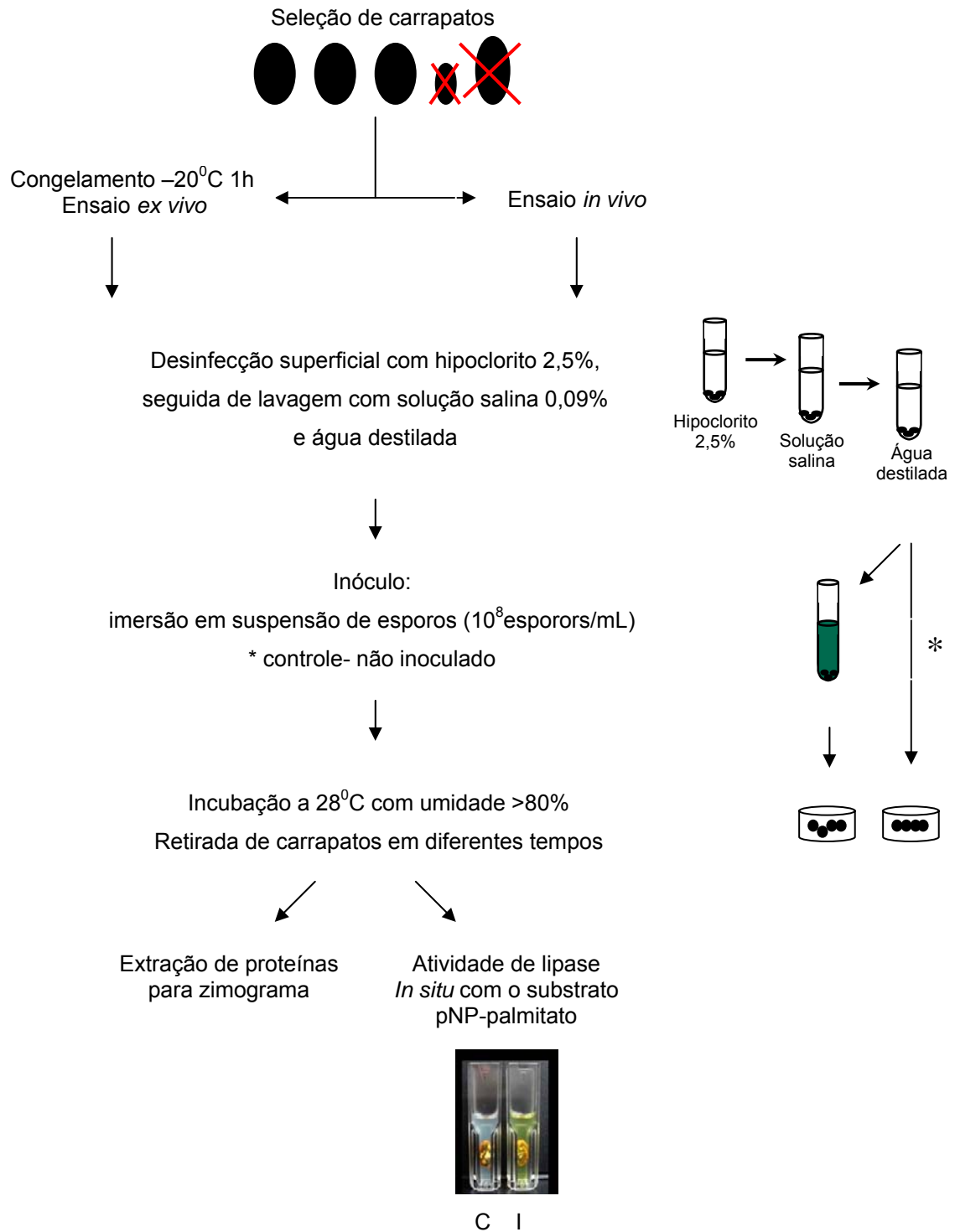
A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS 10.0 for Windows, onde foi utilizado o teste de Tukey ( $\alpha= 0,05$ ). Os resultados foram apresentados colocando-se letras ao lado das médias. Letras iguais indicam médias que não diferem significativamente.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Desenvolvimento de uma estratégia para detecção da atividade de lipase durante a infecção de *B. microplus*

Para realizarmos a detecção da atividade de lipase durante o processo de infecção do carrapato *B. microplus* utilizamos o substrato cromogênico específico para lipase pNPP e zimogramas com o substrato fluorogênico MUF-butirato. A estratégia desenvolvida consistiu na união dos bioensaios com técnicas clássicas de quantificação da atividade lipolítica. Somado a isso, a metodologia de extração de proteínas de *M. anisopliae* previamente descrita (SILVA *et al* 2005) e a quantificação da atividade com a imersão dos carrapatos infectados diretamente no meio de reação, conforme descrito na Figura 5.



**Figura 5- Estratégia para quantificação da atividade de lipase de *M. anisopliae* durante o processo de infecção de *B. microplus*. (C) controle; (I) inoculado (após 30 minutos de reação).**

#### 4.2. Quantificação da atividade lipolítica de *M. anisopliae* durante a infecção do carrapato *B. microplus*

A atividade lipolítica manteve-se constante durante as primeiras 48h de infecção em carrapatos vivos, com valores em torno de 0,03U/carrapato (Tabela 2). Em carrapatos mortos, a atividade lipolítica aumentou de  $0,033 \pm 0,002$ U (6h) para  $0,076 \pm 0,014$ U após 12h de infecção.

A colonização total dos carrapatos mortos por *M. anisopliae* ocorreu após 72h de infecção e a atividade de lipase alcançou  $0,350 \pm 0,013$ U, mantendo este nível após 96h. Carrapatos vivos morreram após 96h de infecção, com a atividade de lipase atingindo  $0,207 \pm 0,021$ U. A colonização total dos carrapatos vivos pelo fungo ocorreu após 120h com atividade de lipase atingindo  $0,312 \pm 0,068$ U (Tabela 2).

**Tabela 2- Atividade de lipase durante a infecção do carrapato *B. microplus*.**

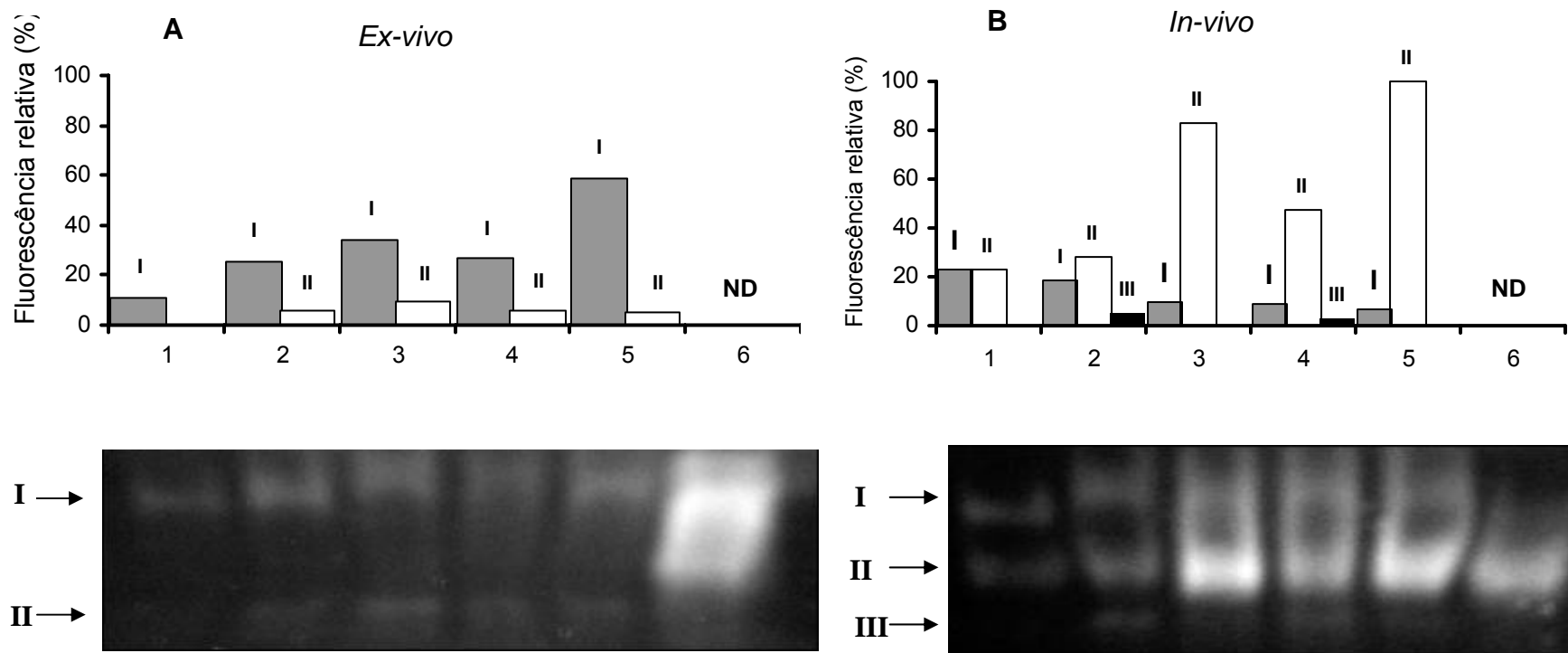
Tempo de infecção (h)	Atividade de lipase (U/ carrapato) *	
	Carrapatos vivos	Carrapatos mortos
6	$0,030 \pm 0$	$0,033 \pm 0,002$
12	$0,033 \pm 0,007$	$0,076 \pm 0,014$
24	$0,031 \pm 0,002$	$0,078 \pm 0,011$
48	$0,036 \pm 0$	$0,184 \pm 0,020$
72	$0,042 \pm 0,011$	$0,350 \pm 0,013$
96	$0,207 \pm 0,021$	$0,358 \pm 0,015$
120	$0,312 \pm 0,068$	Nd

\* A atividade de lipase foi determinada usando pNP-palmitato como substrato durante 30 minutos de reação e incubação a 37°C. A absorbância foi medida espectrofotometricamente a 410nm e os controles foram realizados utilizando carrapatos não infectados sob as mesmas condições. Nd- não determinado.

Nos zimogramas, controles não infectados, tanto vivos quanto mortos, não apresentaram bandas de atividade de lipase. Os zimogramas dos extratos enzimáticos preparados de carrapatos infectados vivos e mortos apresentaram bandas de atividade lipolítica (Figura 6). As bandas de atividade lipolítica foram detectadas em todos tempos de infecção testados e mostraram um padrão de bandas diferindo principalmente na intensidade das mesmas.

No zimograma de carrapatos mortos infectados (Figura 6A), aparecem duas bandas de atividade, com a banda de menor migração no gel, denominada "I", sendo a mais intensa e prevalente em todos os tempos analisados, aumentando sua fluorescência relativa com o progresso da infecção.

Durante a infecção de carrapatos vivos, foi detectada a banda "II" como sendo prevalente em todos os tempos testados e, como observado para a banda "I" em carrapatos mortos infectados, aumentando sua fluorescência relativa com o progresso da infecção. Para os carrapatos vivos infectados, a banda "I" correspondeu a 50% da atividade lipolítica total nas primeiras 6h de infecção. Nestes carrapatos, uma terceira banda de atividade foi observada em 12 e 48h de infecção (Figura 6B).



**Figura 6-** Zimogramas de atividade de lipase com substrato MUF-butirato de diferentes tempos de infecção de *M. anisopliae* em *B. microplus* e análise densitométrica das bandas de atividade. **(A)** carrapatos mortos infectados; **(B)** carrapatos vivos infectados. A densidade das bandas foi quantificada usando o programa UN-SCAN-IT gel™. **(1)** 6 h; **(2)** 12 h; **(3)** 24 h; **(4)** 48 h; **(5)** 72 h; **(6)** 96 h de infecção. Os géis foram carregados com 10µg de proteína. ND- não determinado.

### **4.3. Regulação da secreção de lipases frente a diferentes fontes de carbono**

Para o experimento de regulação da secreção de lipases, *M. anisopliae* foi cultivado em diferentes fontes de carbono (item 3.5) (Figura 7). Foram realizados ensaios com três substratos sintéticos: pNP-palmitato (16 carbonos), pNP-miristato (14 carbonos) e pNP-butirato (4 carbonos), sendo que este último também é substrato para esterases.

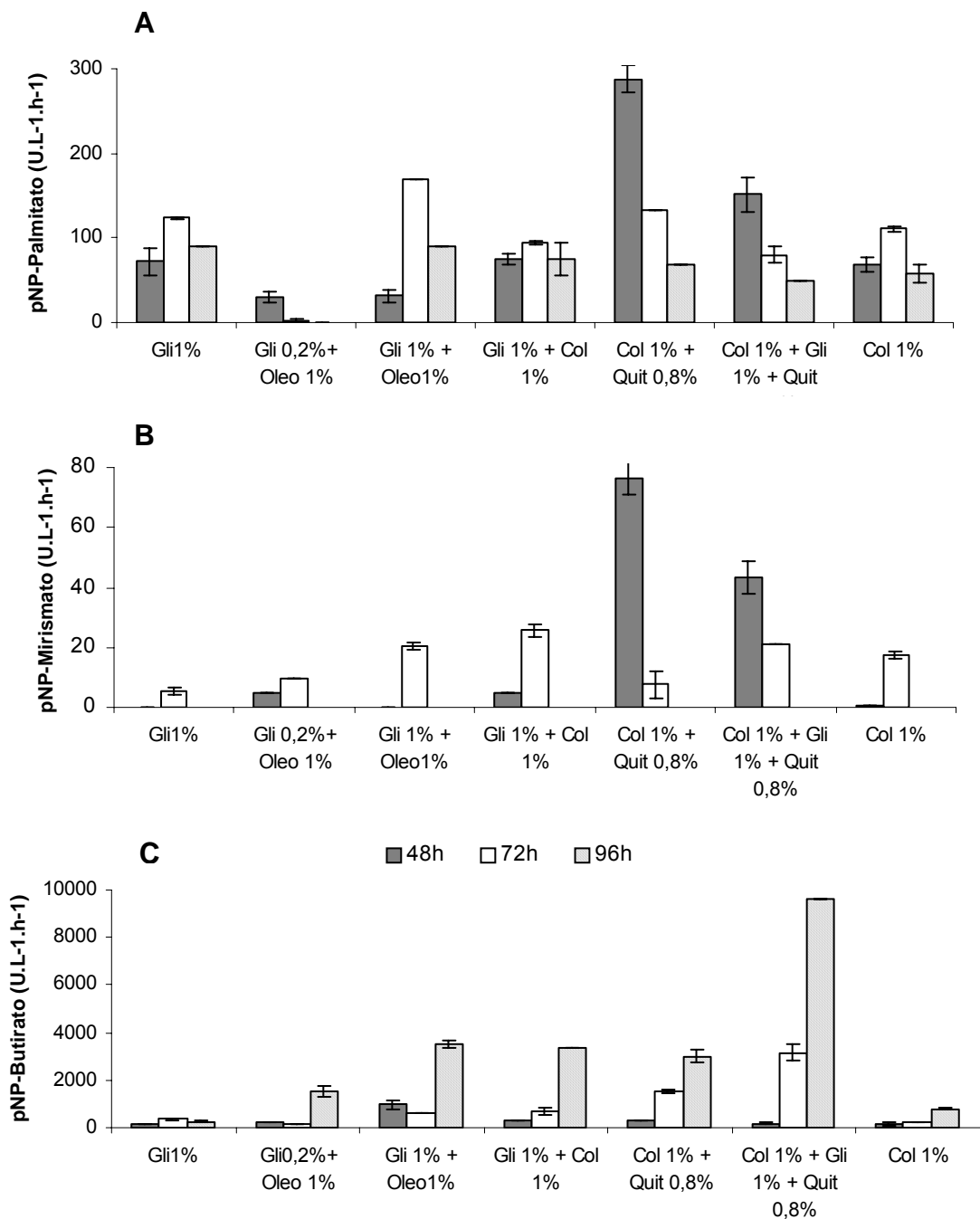
Quando utilizado pNP-palmitato como substrato, foi detectada atividade lipolítica em todos os meios testados. Porém, foi observada uma maior atividade de lipase nos meios que continham estereato de colesterol (colesterol esterificado) 1% + quitina cristalina 0,8% em 48h de cultivo, seguido de estereato de colesterol + quitina cristalina 0,8% + glicose 1%, decaindo com o progresso do tempo de cultivo (Figura 7A). Para os outros meios testados, foi detectada uma atividade maior de lipase em 72h, com exceção do meio contendo óleo de oliva 1% + glicose 0,2% que apresentou maior atividade em 48h. Neste meio, também houve uma menor indução de atividade lipolítica, utilizando pNP-palmitato como substrato, comparativamente com os outros meios testados em praticamente todos os tempos. Observa-se, geralmente, uma maior atividade específica em meios contendo estereato de colesterol, onde a maior atividade específica foi detectada em 48h com colesterol 1% + quitina 0,8% ( $0,98 \pm 0,006$  U/mg proteína) (Tabela 3).

Quando utilizado o substrato pNP-miristato, foi detectada maior atividade de lipase em meios contendo estereato de colesterol 1% e quitina cristalina 0,8% em 48h de cultivo (Figura 7B), sendo estes resultados similares aos

encontrados com pNP-palmitato. Foi detectada também atividade lipolítica em todos os meios. Porém, em 96h de cultivo não foi detectada atividade de lipase em nenhum dos cultivos. Para este substrato, a maior atividade específica foi detectada no meio contendo colesterol 1% + quitina 0,8% em 48h ( $0,27 \pm 0$  U/mg proteína) (Tabela 3).

Para o substrato pNP-butirato, foi detectada atividade de lipase em todos os meios testados até 96h de cultivo. A maior atividade encontrada foi no meio contendo estereato de colesteril 1% + quitina 0,8% + glicose 1% em 96h de cultivo (Figura 7C). Atividades menores foram detectadas nos meios contendo somente glicose 1% e colesterol 1%. Frente a este substrato, foram detectadas as maiores atividades específicas para lipase, atingindo o valor de  $20,8 \pm 0,014$  U/mg proteína em meio contendo colesterol 1% + quitina 0,8% + glicose 1% em 96h de cultivo (Tabela 3). O comportamento da atividade, utilizando este substrato, apresentou uma tendência diferente comparado com os outros dois substratos utilizados onde a atividade foi decrescendo com o progresso do cultivo de uma maneira geral.

Foram realizados ensaios enzimáticos para detecção de atividade de protease e quitinase com os sobrenadantes dos meios com as diferentes fontes de carbono testadas. Para protease, foi observada uma maior atividade nos meios que continham colesterol 1% e quitina 0,8% com ou sem glicose 1% em todos os tempos analisados (Tabela 4). A atividade específica de quitinase não apresentou diferenças relevantes entre os meios testados nos diferentes tempos analisados.



**Figura 7- Atividade de lipase de sobrenadantes de cultivo de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos. (A) pNP-palmitato (B) pNP-miristato (C) pNP-burirato. GLI- glicose; OLEO- óleo de oliva; COL- estereato de colesteril; QUIT- quitina.**



**Tabela 3- Atividade específica de lipase de sobrenadantes de cultura de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono e em diferentes tempos.**

Fontes de carbono	pNP-palmitato (U/μg prot)	pNP-miristato (U/μg prot)	pNP-butilato (U/μg prot)
<b>48h</b>			
Glicose 1%	0,24 ± 0,009 <sup>c</sup>	0	0,4 ± 0,003 <sup>b</sup>
Glicose 0,2% + óleo de oliva 1%	0,16 ± 0,006 <sup>b</sup>	0,01 ± 0 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,004 <sup>d</sup>
Glicose 1% + óleo de oliva 1%	0,07 ± 0 <sup>a</sup>	0	1,8 ± 0,008 <sup>e</sup>
Glicose 1% + estereato de colesteril 1%	0,22 ± 0,007 <sup>c</sup>	0,01 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,011 <sup>c</sup>
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8%	0,98 ± 0,006 <sup>e</sup>	0,27 ± 0 <sup>c</sup>	1,1 ± 0,008 <sup>d</sup>
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8% + glicose 1%	0,16 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,05 ± 0 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,015 <sup>a</sup>
Estereato de colesteril 1%	0,87 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,01 ± 0,001 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,01 <sup>f</sup>
<b>72h</b>			
Glicose 1%	0,30 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,003 <sup>b</sup>
Glicose 0,2% + óleo de oliva 1%	0,01 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,005 <sup>c</sup>	0,5 ± 0,005 <sup>a</sup>
Glicose 1% + óleo de oliva 1%	0,31 ± 0,002 <sup>c</sup>	0,04 ± 0,001 <sup>c</sup>	1,2 ± 0,013 <sup>c</sup>
Glicose 1% + estereato de colesteril 1%	0,29 ± 0,005 <sup>c</sup>	0,08 ± 0,002 <sup>d</sup>	2,1 ± 0,005 <sup>e</sup>
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8%	0,45 ± 0,028 <sup>d</sup>	0,03 ± 0,001 <sup>b</sup>	6,5 ± 0,011 <sup>f</sup>
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8% + glicose 1%	0,20 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,05 ± 0 <sup>c</sup>	7,3 ± 0,015 <sup>g</sup>
Estereato de colesteril 1%	0,66 ± 0,004 <sup>e</sup>	0,11 ± 0,002 <sup>e</sup>	1,4 ± 0,025 <sup>d</sup>
<b>96h</b>			
Glicose 1%	0,19 ± 0,004 <sup>b</sup>	0	0,7 ± 0,003 <sup>a</sup>
Glicose 0,2% + óleo de oliva 1%	0	0	6,7 ± 0,007 <sup>d</sup>
Glicose 1% + óleo de oliva 1%	0,19 ± 0,003 <sup>b</sup>	0	6,2 ± 0,003 <sup>c</sup>
Glicose 1% + estereato de colesteril 1%	0,28 ± 0,002 <sup>d</sup>	0	14,1 ± 0,005 <sup>f</sup>
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8%	0,21 ± 0,006 <sup>c</sup>	0	12 ± 0,016 <sup>e</sup>
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8% + glicose 1%	0,07 ± 0,002 <sup>a</sup>	0	20,8 ± 0,014 <sup>g</sup>
Estereato de colesteril 1%	0,38 ± 0,002 <sup>e</sup>	0	6 ± 0,028 <sup>b</sup>

± desvio padrão (baseado em triplicata)

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> resultados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

**Tabela 4- Atividade específica de protease, quitinase e determinação de massa seca de *M. anisopliae*.**

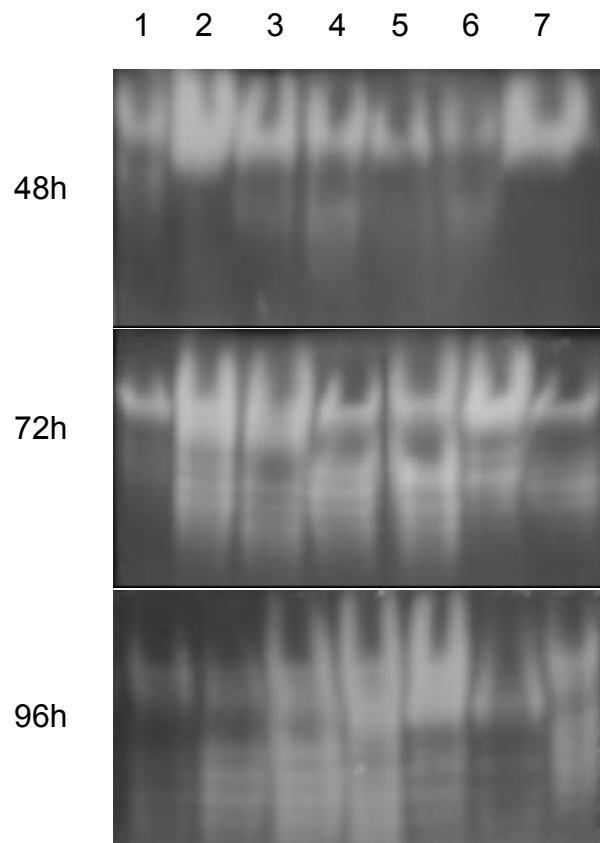
Fontes de carbono	Protease (U/ $\mu$ g prot)	Quitinase (U/ $\mu$ g prot)	Massa seca (g)
<b>48h</b>			
Glicose 1%	0	0,0002	Nd
Glicose 0,2% + óleo de oliva 1%	0	0,0004	Nd
Glicose 1% + óleo de oliva 1%	0	0,001	Nd
Glicose 1% + estereato de colesteril 1%	0	0,0004	Nd
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8%	0,004	0,0008	Nd
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8% + glicose 1%	0,0002	0,001	Nd
Estereato de colesteril 1%	0	0,002	Nd
<b>72h</b>			
Glicose 1%	0,0035	0,0005	Nd
Glicose 0,2% + óleo de oliva 1%	0,0028	0,0009	Nd
Glicose 1% + óleo de oliva 1%	0,0022	0,0005	Nd
Glicose 1% + estereato de colesteril 1%	0,0125	0,0009	Nd
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8%	0,136	0,0011	Nd
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8% + glicose 1%	0,058	0,0006	Nd
Estereato de colesteril 1%	0,0179	0,0015	Nd
<b>96h</b>			
Glicose 1%	0,017	0,001	0,077 $\pm$ 0,012
Glicose 0,2% + óleo de oliva 1%	0,0398	0,001	0,172 $\pm$ 0,023
Glicose 1% + óleo de oliva 1%	0,0196	0,0004	0,2 $\pm$ 0,012
Glicose 1% + estereato de colesteril 1%	0,0765	0,0016	0,277 $\pm$ 0,004
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8%	0,0848	0,001	0,295 $\pm$ 0,002
Estereato de colesteril 1% + quitina 0,8% + glicose 1%	0,098	0,0005	0,344 $\pm$ 0,029
Estereato de colesteril 1%	0,0405	0,0022	0,196 $\pm$ 0,018

Nd- não determinado

$\pm$  desvio padrão (baseado em triplicata)

O fungo foi cultivado em diferentes fontes de carbono por diferentes tempos.

Em zimogramas foram detectadas diversas bandas de atividade lipolítica em todos os meios testados (Figura 8). Pode-se observar um aumento na quantidade de bandas com a evolução do cultivo em praticamente todos os meios testados.

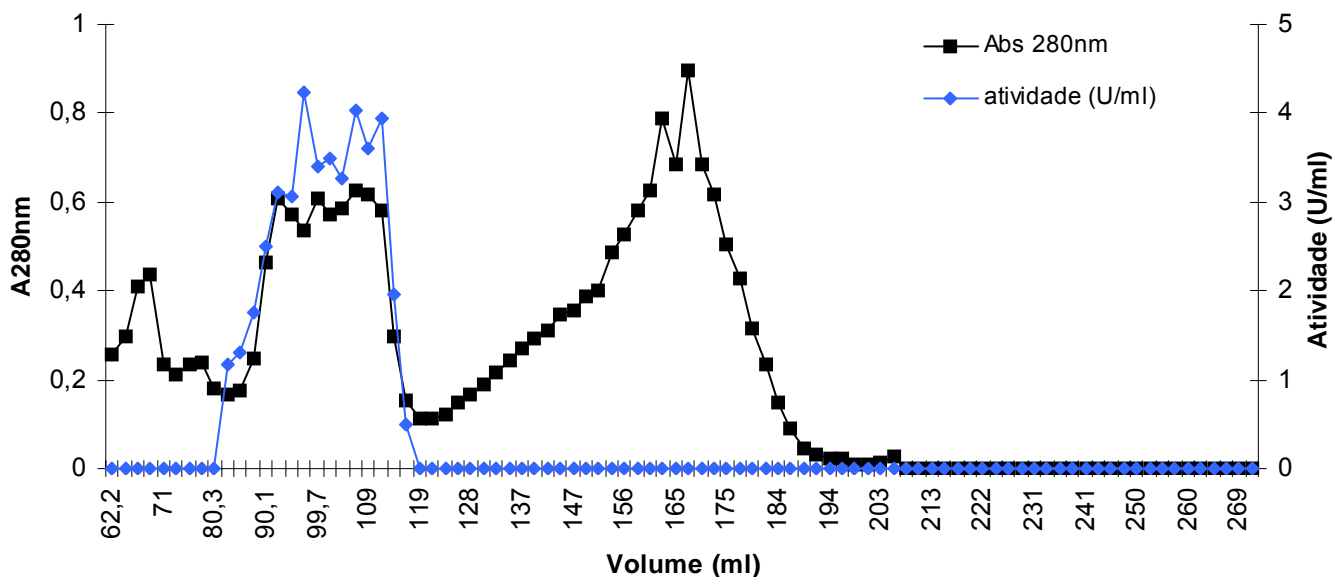


**Figura 8- Detecção de atividade lipolítica em zimogramas de sobrenadantes de cultivo de *M. anisopliae* em diferentes fontes de carbono. (1) glicose 1%; (2) glicose 0,2% + óleo de oliva 1%; (3) glicose 1% + óleo de oliva 1%; (4) glicose 1% + estereato de colesteril 1%; (5) estereato de colesteril 1% + quitina 0,8%; (6) estereato de colesteril 1% + quitina 0,8% + glicose 1%; (7) estereato de colesteril1%. Foram aplicados 10 $\mu$ g de proteína em cada canaleta.**

#### 4.4. Purificação parcial de lipase

Para extração das proteínas, após a cultura de *M. anisopliae* por 50h em meio base (SILVA *et al.*, 2005) suplementado com óleo de oliva 1%, foi adicionado Triton X-100 a uma concentração final de 0,25%. O efeito deste detergente sobre ácidos graxos e o próprio óleo residual da cultura do fungo, resulta em um sobrenadante com aparência leitosa, um emulsificado característico pela adição deste agente surfactante. Com a concentração do material em aproximadamente 10 vezes esta característica se intensificou tornando bem espesso o líquido resultante. Parte deste concentrado, 3mL, contendo aproximadamente 120 U de atividade de lipase, foi aplicado em coluna de gel filtração BioGel A 0,5m.

O perfil cromatográfico da atividade mostrou que houve um pico de atividade entre 80 e 119mL (Figura 9). As frações com aparência emulsificada, leitosa, foram eluídas entre as primeiras frações coletadas até parte do pico de atividade de lipase (entre 62 e 104 mL).

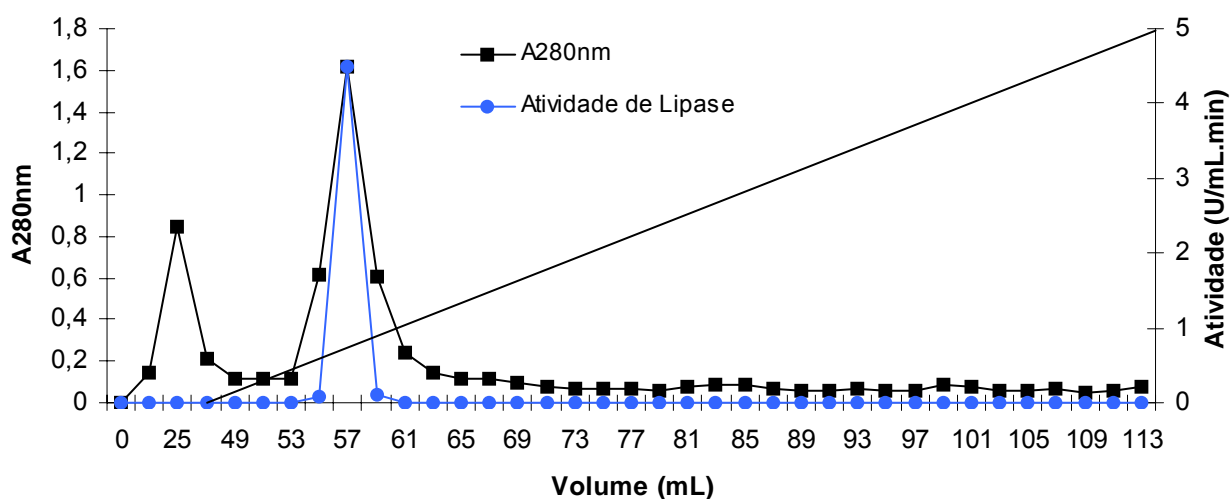


**Figura 9- Perfil cromatográfico das proteínas secretadas por *M. anisopliae* em resina BioGel A 0,5m.** Cromatografia em coluna BioGel A 0,5 (1,8 x 90cm) de proteínas secretadas por *M.anisopliae* cultivado em meio base com óleo de oliva 1% por 50 horas. Foi aplicado tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 (fluxo 15mL/h). Foram coletadas frações a cada 12 min.

As frações que apresentaram atividade de lipase e não apresentaram aspecto emulsificado, leitoso (entre 104 e 116mL), oriundas da cromatografia em gel filtração foram agrupadas e 4 mL correspondendo a aproximadamente 10 U de atividade de lipase foram aplicados em resina de troca iônica DEAE-Sepharose.

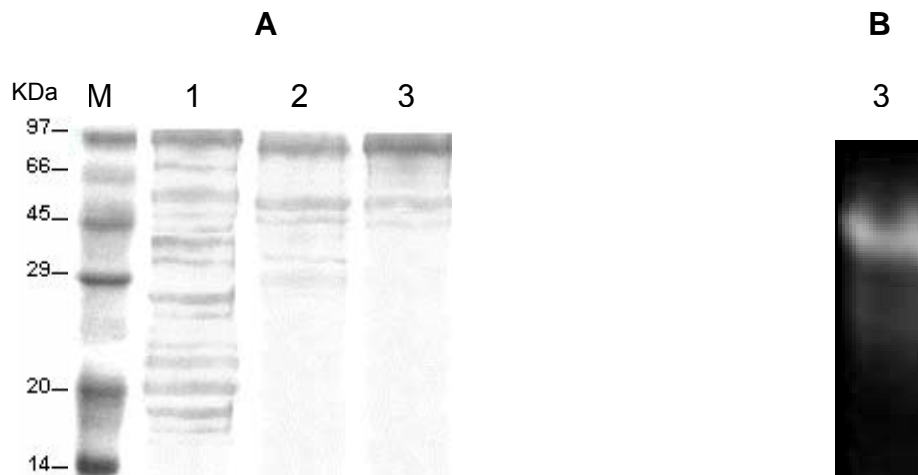
O perfil cromatográfico de atividade de lipase mostrou que há somente um pico de atividade, saindo logo no início do gradiente de NaCl (Figura 10). As amostras resultantes da purificação foram submetidas à análise eletroforética (SDS-PAGE) e a zimograma (Figura 11).

De acordo com o perfil eletroforético da purificação, as proteínas de massa molecular mais baixas são removidas na etapa de gel filtração. Com a etapa de cromatografia de troca iônica realizada, algumas proteínas com massa molecular de aproximadamente 30kDa foram removidas. No zimograma, a fração com atividade correspondente à cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose apresentou somente uma banda de atividade de lipase.



**Figura 10- Perfil de eluição das proteínas secretadas por *M. anisopliae*.**

4mL das frações agrupadas oriundas da gel filtração (BioGel A 0,5) foram aplicados em resina de troca iônica DEAE-Sepharose. Após aplicação, a coluna foi lavada com 50mL de tampão tris-HCl 50mM pH 8,0 (fluxo 1mL/min) e as proteínas eluídas com gradiente linear de NaCl (0-1,0M) no mesmo tampão. Frações de 2mL foram coletadas.



**Figura 11- Perfil eletroforético da purificação parcial de lipases secretadas por *M. anisopliae* cultivado com 1% de óleo de oliva. (A)- gel SDS-PAGE 12%. A coloração do gel foi feita com azul de comassie coloidal; (B)- zimograma. (M) marcador de massa molecular; (1) perfil cromatográfico de extrato bruto de *M. anisopliae*; (2) frações agrupadas da gel filtração (BioGel A 0,5) com atividade lipolítica e sem aspecto leitoso; (3) fração com atividade de lipase oriunda da troca iônica DEAE-Sepharose. Foram aplicados 20 $\mu$ g de proteína em cada canaleta no gel SDS-PAGE e 10 $\mu$ g de proteína no zimograma.**



## 5. DISCUSSÃO

Os fungos constituem um importante grupo de microrganismos patogênicos com muitos e diferentes fatores de virulência e estratégias para exercer sua patogenicidade. Considerando a aplicação de fungos patógenos de artrópodes, a elucidação de seus determinantes de patogenicidade é um passo importante para melhorar sua eficiência.

Estudos recentes têm ratificado a importância de quitinases e proteases durante o processo de infecção de *M. anisopliae* (DUTRA *et al.*, 2004; FREIMOSER *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005). Estudos atuais demonstram cada vez mais a importância de lipases em sistemas de infecção de diversos patógenos microbianos (STEHR *et al.*, 2003). Contrariamente ao que foi relatado anteriormente por ST LEGER *et al.* (1986a) e FREIMOSER *et al.* (2005), as lipases não são a última classe de depolimerases secretadas na cutícula do hospedeiro, sendo detectada sua atividade já em 6 horas de infecção (Figura 6 e Tabela 2). A detecção neste estágio bastante preliminar da infecção, ou seja, antes da germinação do esporo, nos leva a crer que possa haver pelo menos duas enzimas lipolíticas (Figura 6) que poderiam estar associadas ao esporo e seriam importantes para desencadear o processo de infecção, como já foi relatado em outros fungos filamentosos, fitopatogênicos, com um sistema infectivo evolutivamente próximo ao sistema de infecção de *M. anisopliae* (BERTO *et al.*, 1999; COMMÉNIL *et al.*, 1999).

Fêmeas ingurgitadas do carrapato bovino *B. microplus* têm um acréscimo de 215% de lipídeos na sua constituição neste estágio, aumentando

de 20 para 63 $\mu$ g por carrapato (HACKMAN & FILSHIE, 1982). Entre estes lipídeos, os mais abundantes são álcoois e ácidos graxos combinados por esterificação (HACKMAN & FILSHIE, 1982), formando assim substratos para ação de lipases. A infecção dos carrapatos mortos foi visualmente muito mais rápida se comparada à infecção em carrapatos vivos, com total colonização do hospedeiro ocorrendo em 72h, quando a atividade de lipase alcançou valores de  $0,35 \pm 0,013$  U, mantendo-se neste nível até 96h (Tabela 2). Os carrapatos vivos morreram após 96h de infecção, com uma atividade de lipase de  $0,207 \pm 0,021$  U. A colonização total do hospedeiro morto (carrapato vivo infectado) ocorreu somente após 120h de infecção com níveis similares de atividade lipolítica alcançados comparado com o carrapato morto infectado. A evolução mais rápida da infecção nos carrapatos mortos pode ser reflexo de uma ausência de resposta do hospedeiro à infecção, favorecendo o desenvolvimento do fungo.

Zimogramas de carrapatos não infectados, mortos ou vivos, não apresentaram bandas de atividade lipolítica. Contrariamente, detectamos bandas de atividade em carrapatos infectados vivos e mortos para todos os tempos analisados (Figura 6). O padrão de bandas de atividade lipolítica foi similar quanto ao número e perfil de migração das bandas detectadas nas duas condições analisadas, com expressivas diferenças na intensidade de fluorescência destas bandas. As bandas detectadas durante a infecção dos carrapatos vivos ou mortos, parecem ser algumas das bandas detectadas nos zimogramas de extratos protéicos oriundos de culturas líquidas de *M. anisopliae* em meios com diferentes fontes de carbono, especialmente em 72h de cultivo

com os constituintes do tegumento de artrópodes (Figura 8). A diferença na banda de atividade prevalente (banda “I” em carrapato morto infectado e banda “II” em carrapato vivo infectado) pode estar relacionada principalmente, à diferença entre modelos de infecção testados, ou seja, a ausência de resposta à infecção do carrapato ao fungo no ensaio *ex vivo* e na conseqüente resposta no ensaio *in vivo*. Nos carrapatos vivos infectados encontramos a banda “II” como prevalente e a presença de uma terceira banda que possam estar associadas com a virulência do fungo e com o desenvolvimento de sua patogenicidade, respectivamente (Figura 6). Em carrapatos mortos, a ausência de resposta do hospedeiro à infecção do fungo pode favorecer a prevalência da banda “I” durante o progresso da infecção, baixos níveis da banda “II” e ausência da banda “III”. Portanto, é mais provável que a banda “I” não esteja diretamente envolvida com a virulência do fungo e sua atividade possa estar relacionada com a nutrição, como descrito para *S. aureus*, onde foram detectados altos níveis de atividade de lipase em isolados clínicos (ROLLOF *et al.*, 1987). A diferença no perfil de atividade lipolítica dos zimogramas e de ensaios enzimáticos durante o processo de infecção do hospedeiro pode ser explicada pela natureza dos substratos usados para as análises. O pNP-palmitato é um substrato específico para lipases, enquanto MUF-butirato pode ser também clivado por esterases, além de lipases. Outra importante diferença entre estes substratos além de pNP-palmitato ser cromogênico e MUF-butirato ser fluorogênico é o número de carbonos (comprimento) da cadeia de ácidos graxos, que podem determinar a preferência da enzima lipolítica.

Enzimas lipolíticas de diversos microrganismos patogênicos atuam de diversas maneiras na infecção e têm sua síntese regulada durante este processo (STEHR *et al.*, 2004; SCHOFIELD *et al.*, 2005). Os lipídeos formam a camada mais externa e protetora da epicutícula de carrapatos e outros artrópodes. Um papel imputado para enzimas lipolíticas é o aumento da adesão à superfície do hospedeiro no estágio inicial da infecção (STEHR *et al.*, 2003) como descrito por GÖTTLICH *et al.* (1995) para a levedura *Hortaea werneckii*, fato este que pode também estar ocorrendo no sistema de infecção de *M. anisopliae* sendo suportado pela atividade de lipase detectada nas primeiras 6 horas (Figura 6 e Tabela 2).

A estratégia nova, simples e rápida apresentada neste trabalho para detecção e quantificação de atividade lipolítica durante o processo de infecção de *M. anisopliae* (Figura 5) pode contribuir para elucidar a participação e as possíveis funções das lipases em outros sistemas de infecção, principalmente em patógenos de artrópodes. Embora a expressiva importância das lipases já tenha sido descrita para diversos microrganismos patogênicos (STEHR *et al.*, 2003), este é o primeiro relato de detecção de atividade lipolítica secretada durante o processo de infecção de artrópodes por um fungo patogênico. Na infecção de *B. microplus* por *M. anisopliae*, mostramos a detecção de atividade lipolítica já em 6 h de infecção e acompanhamos o aumento desta atividade com o progresso da colonização do hospedeiro. Além disso, visualizamos diferentes bandas de atividade durante este processo. Esta estratégia pode ser facilmente aplicada em processos de infecção de hospedeiros por diferentes

microrganismos, contribuindo para a elucidação do papel desempenhado pelas lipases como possíveis fatores de virulência.

Em microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, a secreção de enzimas é uma estratégia utilizada para degradação de substratos complexos não assimiláveis, liberando moléculas mais simples utilizadas nutricionalmente e importantes para o desenvolvimento e disseminação das células microbianas. Enzimas secretadas no meio extracelular podem desempenhar diversas funções relacionadas com a degradação de macromoléculas que podem liberar nutrientes metabolizáveis, auxiliar na penetração da cutícula do hospedeiro em processos patogênicos (ST LEGER *et al.*, 1991b) e degradação de compostos tóxicos. Muitos trabalhos vêm apresentando estudos de regulação da secreção de hidrolases em microrganismos e, em *M. anisopliae*, já foram publicados alguns trabalhos relacionados a proteases e quitinases (ST LEGER *et al.*, 1986a, 1986b; KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005). Porém, este tipo de abordagem nunca foi realizado com lipases de *M. anisopliae*.

Neste trabalho foram apresentadas diferenças de indução entre diversas fontes de carbono na atividade lipolítica frente a diferentes substratos. Com os diferentes substratos pNP-ésteres utilizados, foram detectadas atividades de lipase ou lipase/esterase (pNP-butilato) maiores nos meios contendo os constituintes do tegumento de artrópodes, quitina e estereato de colesterol. Este lipídeo, um éster formado a partir de colesterol e ácido esteárico, é característico de células animais. Comparativamente ao óleo de oliva, a outra fonte lipídica testada e de origem vegetal, o estereato de colesterol induziu

níveis maiores de atividade de lipase, principalmente quando combinada com quitina (Figura 7). A atividade específica também foi sempre maior nos meios contendo o lipídeo animal em todos tempos analisados e substratos testados. Além disso, os meios contendo estereato de colesteril e quitina, com ou sem glicose, propiciaram um melhor crescimento do fungo de acordo com os resultados da massa seca (Tabela 4). Isso pode sugerir que estes compostos específicos, presentes no tegumento de seus hospedeiros, são mais facilmente reconhecidos pelo fungo, induzindo maiores níveis de atividade de lipase. Pode sugerir também que *M. anisopliae* realmente está mais apto para o consumo destes compostos específicos, o que resultou no seu melhor desenvolvimento. Como descrito em muitos trabalhos, o óleo de oliva é uma fonte lipídica usualmente aplicada na indução de altos níveis de atividade lipolítica em fungos (SHIRAZI *et al.*, 1998; MAIA *et al.*, 1999), o que reforça nossa hipótese de relevância da especificidade que *M. anisopliae* possa ter por este lipídeo específico, o estereato de colesteril.

Ao contrário do que é visto para quitinases (KRIEGER DE MORAES *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2004) onde a glicose tem um importante papel regulatório na secreção destas enzimas, este resultado não foi evidenciado para secreção de enzimas lipolíticas, já que a glicose parece não ter exercido influência significativa na indução ou repressão da atividade de lipase.

Utilizando o substrato específico para lipases pNP-palmitato, com cadeia de ácidos graxos longa, 16 carbonos, detectamos uma maior atividade nas primeiras 48h de cultura nos meios contendo os constituintes do tegumento de artrópodes, quitina e estereato de colesteril, com um decréscimo na atividade

com o progresso da cultura, resultados similares aos encontrados utilizando pNP-miristato (14 carbonos) como substrato, porém, em níveis mais baixos. Utilizando o substrato pNP-butirato, ocorre o contrário, os maiores níveis de atividade foram alcançados tardiamente, em 96h. O meio contendo estereato de colesteril, quitina e glicose também induziu uma maior atividade para este substrato. Além disso, os níveis de atividade foram muito mais altos com este substrato, possivelmente, por ele não ser substrato exclusivo para lipases, sofrendo ação também de esterases que possam estar sendo secretadas. As atividades específicas em 72 e 96h (onde foram alcançados os maiores níveis de atividade) calculadas para este substrato também mostraram resultados muito superiores nos meios contendo os constituintes do tegumento de hospedeiros artrópodes, reforçando sua importância na secreção destas enzimas, lipases e esterases, possivelmente envolvidas na infecção do hospedeiro (ST. LEGER *et al.*, 1986a, 1991b; CLARKSON & CHARNLEY, 1996; SILVA *et al.*, 2005).

A atividade de protease foi significativamente maior, assim como para as enzimas lipolíticas descritas anteriormente, nos meios onde se encontravam os dois constituintes específicos do tegumento dos hospedeiros de *M. anisopliae* em todos os tempos analisados. Este resultado corrobora com a teoria de que as enzimas envolvidas na infecção atuem sinergisticamente de maneira complexada para degradar a cutícula do hospedeiro (ST LEGER *et al.*, 1987, 1993, 1996b, 1998), fato amplamente reportado, especialmente para proteases e quitinases e que agora, de acordo com este trabalho, pode ser complementado com as lipases. As poucas diferenças nos resultados de

atividade de quitinase podem ser resultantes da baixa sensibilidade do método utilizado.

Os zimogramas dos extratos protéicos dos diferentes meios de cultura líquida testados mostraram que *M. anisopliae* possui um vasto repertório de enzimas lipolíticas. Estas diferentes bandas de atividade lipolítica podem direcionar a especificidade por determinados hospedeiros e facilitar a degradação de diferentes compostos lipídicos. Como postulado para a levedura patogênica *C. albicans*, que também possui um extenso repertório de enzimas lipolíticas, o número significativo destas enzimas reflete a flexibilidade de adaptação do patógeno a mudanças ambientais (STEHR *et al.*, 2004) e o habilita para conquistar diferentes ambientes do hospedeiro com diversas constituições, podendo ser um mecanismo adaptativo para conquista de seus hospedeiros (STEHR *et al.*, 2003).

As lipases são enzimas muito particulares pela sua importância fisiológica, potencial biotecnológico e industrial e também por suas características diferenciais como substratos sobre as quais agem, características estruturais, especificidade, entre outras (JAEGER & EGGERT, 2002). Além disso, estas enzimas são muito variadas em suas propriedades, dependendo do microrganismo de origem (SHARMA *et al.*, 2001). Por todas essas particularidades, inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas para purificar estas enzimas (SHARMA *et al.*, 2001). A estratégia apresentada neste trabalho mostrou uma boa eficiência até a cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose, resultando em poucas bandas de massa molecular próximas a 60 KDa. Após esta etapa, processos de diálise ou uma nova etapa de gel



filtração no intuito de retirar o sal presente na fração com atividade, parecem desestabilizar a enzima, já que esta perde totalmente a atividade. Outras estratégias foram realizadas como precipitação por dessolvatação através de saturação com sulfato de amônio. Porém, este sal interfere no ensaio enzimático, e qualquer processo de diálise tentado resulta em perda completa de atividade. Estudos no intuito de purificar uma lipase de *M. anisopliae* são de extrema relevância, já que nenhuma enzima lipolítica deste fungo foi isolada até o momento.

Uma das grandes dificuldades de se estudar a participação de lipases nos sistemas de infecção em artrópodes é a ausência de trabalhos nesta área. Outros sistemas vêm sendo já muito bem estudados (BERTO *et al.*, 1999; STEHR *et al.*, 2003), porém não existem muitas técnicas ou metodologias disponíveis para detecção de atividade lipolítica durante o processo de infecção. Avanços nesta área são de extrema relevância para o entendimento deste importante fator já comprovado em outros sistemas de infecção e que podem contribuir, no futuro, para otimização de processos que utilizam microrganismos para o controle biológico de artrópodes.

Este trabalho visa contribuir no entendimento destes fatores possivelmente relacionados com o processo de infecção, mas pouco estudados em *M. anisopliae*, apesar de estarem já bem caracterizados em muitos outros sistemas microbianos. A negligência no estudo de lipases e enzimas lipolíticas em geral em fungos (STEHR *et al.*, 2003) ressalta a importância de estudos deste tipo. Nossos resultados ratificam a possibilidade destas enzimas participarem ativamente do processo de infecção do hospedeiro. Além disso, a

nova estratégia para detecção de atividade lipolítica durante o processo de infecção pode contribuir no estudo de lipases de outros sistemas ou em estudos futuros visando o melhor entendimento destas enzimas no processo de infecção de *M. anisopliae*.

## 6. CONCLUSÕES

- A estratégia desenvolvida para detecção de atividade de lipase de *M. anisopliae* foi satisfatória;
- *M. anisopliae* secreta lipases durante seu processo de infecção em *B. microplus*, desde os períodos iniciais deste processo até a total colonização do hospedeiro;
- A glicose parece não regular a secreção de lipases em cultura líquida;
- O constituinte lipídico de células animais testado, estereato de colesteril, induziu a produção de maiores níveis de atividade lipolítica por *M. anisopliae*, comparado com óleo de oliva;
- O lipídeo de células animais associado com quitina também induziu níveis altos de atividade lipolítica em *M. anisopliae*;
- O crescimento do fungo foi maior nos meios suplementados com constituintes da cutícula dos hospedeiros de *M. anisopliae*.
- *M. anisopliae* secreta diversas enzimas lipolíticas em cultura líquida.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAYABIO (2005) <http://www.ajaybio.com/prodbiostop.htm>. 30 de agosto.
- ALVES, S.B. (1998) **Controle microbiano de insetos**. Ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2<sup>a</sup> ed., Piracicaba.
- ARRUDA, W.; LUBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* structures during the penetration events leading to the infection of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Exp. Appl. Acarol.** (Aceito).
- ARRUDA, W. (2005) **Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus***. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BAGGA, S.; HU, G.; SCREEN, S. E.; and ST LEGER, R. J. (2004) Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**. 324:159-169.
- BARATTO, C.M. (2005) **Clonagem, regulação e transformação de genes de quitinases do entomopatógeno e acaricida *Metarhizium anisopliae***. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BARRETO, C.C.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. (2004) Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. **Curr. Microbiol.** 48: 102-107.
- BERTO, P.; COMMÉNIL, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. (1999) Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. **FEMS Microbiol. Lett.** 180:183-189.
- SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. (2005) Production and extraction of an extracellular lipase from the

- entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Proc. Biochem.** 40: 321-326.
- BIDOCHKA, M.J.; ST. LEGER, R.J.; ROBERTS, W.D. (1997) Mechanisms of Deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. **Mem. Entom. Soc. Canada.** 171:213-224.
- BIOTROPIC (2005) <http://www.biotropic.com.mx/productos.htm#>. 30 de agosto.
- BITTENCOURT, S. E. T. (1998) Purificação, caracterização parcial e localização de cobre zinco superóxido dismutase (CnZnSOD) do fungo entomopatogênico *metarhizium anisopliae*. Brasília, UnB.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. (1994) Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. **Rev. Universidade Rural- Série Ciência da Vida**, 16:32-38.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. (1999) Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Rev. Ciência Rural.** 29:351-354.
- BITTENCOURT, V. R. (2000) Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 916:555-558.
- BITTENCOURT, S. E. T.; de CASTRO, L. A.; FARIAS, S. E.; BAO, S. N.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. (2004) Purification and ultrastructural localization of a copper–zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. **Res. Microbiol.**155:681-687.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis.** 8:93-99.
- BOGO, M. R.; ROTA, C. A.; PINTO, H., Jr.; OCAMPOS, M., CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. (1998) A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. **Curr. Microbiol.** 37:221-225.

- BORNSCHEUER, U.T.; BESSLER, C.; SRIVINAS, R.; KRISHNA, S.H. (2002) Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **TRENDS Biotechnol.** 20:433-437.
- CASTRO, A. B. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; et al (1997) Eficácia *in vivo* do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Rev. Univ. Rural.** 19:73-82.
- CLARKSON, J. M. & CHARNLEY, A. K. (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends Microbiol.** 4:197-204.
- COMMÉNIL, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. (1998) Anti-lipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 52:1-14.
- COMMÉNIL, P.; BELINGHERI, L.; BAUW, G.; DEHORTER, B. (1999) Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* of grape berry cuticle. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 55:37:43.
- CONTROL BIOLÓGICO (2005) <http://www.controlbiologico.com/metabiol.htm>. 30 de agosto.
- CORREIA A.C.B.; FIORIN A.C.; MONTEIRO, A.C.; VERÍSSIMO, C.J. (1998) Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. **J.Inv. Pathol.** 71:189-191.
- COVE, D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Acta Biochem.Biophys.** 113:51-56.
- da COSTA. M.; SARQUIS, M. I. M.; BITTENCOURT, V. R. E. P. (2002) Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro state, Brazil. **Mycopathologia.** 154:207-209.
- de LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; MLORA, J.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A. (1992) Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **Eur.J.Biochem.** 206:859-867.

- DIAZ, P.; PRIM, N.; JAVIER PASTOR, F.I. (1999) Direct fluorescence based lipase activity assay. **Biotechniques**. 27:696-700.
- DRIVER, F.; MILNER, R.J.; TRUEMAN, J.W.H. (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycol. Resear.** 104:134-150.
- DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SCHRANK, I.S.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. (2004) Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Res. Microbiol.** 155:245-251.
- FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y. & PEI, P. (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bchit1* and its application to improve fungal strain virulence. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:363-370.
- FERNANDES, E. K.; da COSTA, G. L.; de MORAES, A. M.; BITTENCOURT, V. R. (2004) Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Basic Microbiol.** 44:270-274.
- FERNANDEZ, F. B. (2000) The employment of biological and non-chemical alternatives for insect plague control in sugarcane crops in Costa Rica. **International Sugar J.** 102:482-490.
- FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A.P.; BARATTO, C.M.; KOGLER, V.; SILVA, M.V.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. (2001) Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento.** 23: 32-37.
- FRANCESCHINI, M. (2005) **Envolvimento da protease PR1A na patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* e na infecção do carrapato *Boophilus microplus*.** Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- FRANCETIC, O.; BADAUT, C.; RIMSKY, S.; PUGSLEY, A. P. (2000) The ChiA (YheB) protein of *Escherichia coli* K-12 is an endochitinase whose gene is negatively controlled by the nucleoid-structuring protein H-NS. **Mol. Microbiol.** 35:1506-1517.
- FRAZZON, A.P.G.; VAZ Jr., I.V.S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. (2000) *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vet Parasitol.** 93:117-125.
- FREIMOSER, F. M.; SCREEN, S.; BAGGA, S.; HU, G.; ST LEGER, R. J. (2003) Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. **Microbiology** 149:239-247.
- FREIMOSER, F.M.; HU, G.; ST LEGER, R.J. (2005) Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. **Microbiology** 151:361-371.
- GILFILLAN, G.D.; SULLIVAN, D.J.; HAYNES, K.; PARKINSON, T.; COLEMAN, D.C.; GOW, N.A. (1998) *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology** 144:829-838.
- GILLESPIE, J. P.; BATERMAN, R. & CHANRLEY, K. (1998) Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium anisopliae* spp. For the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **J. Invertebr. Pathol.** 71:128-137.
- GIMÉNEZ-PECCI, M.P.; BOGO, M.R.; SANTI, L.; MORAES, C.K.; CORRÊA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. (2002) Characterization of mycoviruses and analyses of chitinases secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Curr. Microbiol.** 45:334-339.
- GÖTTLICH, E.; de HOOG, G.S.; YOSHIDA, S.; TAKEO, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. (1995) Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. **Mycosis** 38:489-494.
- HACKMAN, R.H.; FILSHIE, B.K. (1982) The tick cuticle. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Ed.), **Physiology of ticks – Current themes in tropical science**, vol. I. Pergamon Press, New York.



- HASSAN, A. & CHARNLEY, A. K. (1989) Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through dimilin-affected cuticle of *Manduca sexta*. **J. Invertebr. Pathol.** 54:117-124.
- HSIAO, Y. M. & KO, J. L. (2001) Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. **Toxicon.** 39:837-841.
- HU, G. & ST LEGER, R. J. (2004) A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. **J. Evol. Biol.** 17:1204-1214.
- HUTCHINSON, R. (2005) <http://www.roberth.u-net.com/ectoskel.htm>. 30 de agosto
- HUXHAM, I. M.; SAMUELS, K. D. L.; HEALE, J. B.; McCORKINDALE, N. J. (1989) *In vivo* and *in vitro* assays for pathogenicity of wild-type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species. **J. Invertebr. Pathol.** 53:143-151.
- JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications. **Annu. Rev. Microbiol.** 53:315-351.
- JAEGER, K.E.; EGGERT, T. (2002) Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.** 13:390-397.
- JOSHI, L.; ST LEGER, R. J.; ROBERTS, D. W. (1997) Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. **Gene** 197:1-8.
- KAAYA, G.P.; MWANGI, E.N.; OUNA, E.A. (1996) Prospects for biological control of livestock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** 67:15-20.
- KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. (1998) Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 165:267-271.

- KANGA, L. H.; JONES, W. A. & JAMES, R. R. (2003) Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. **J. Econ. Entomol.** 96:1091-9.
- KERSHAW, M. J.; MOORHOUSE, E. R.; BATEMAN, R.; REYNOLDS, S. E.; CHARNLEY, A. K. (1999) The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. **J. Invertebr. Pathol.** 74:213-223.
- KISHMOTO, K.; NISHIZAWA, Y.; TABELI, Y.; HIBI, T.; NAKAJIMA, M.; AKUTSU, K. (2002) Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Plant Sci.** 162: 655-662.
- KÖNIG, B.; JAEGER, K.E.; SAGE, A.E.; VASIL, M.L.; KÖNIG, W. (1996) Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). **Infect. Immun.** 64:3252-3258.
- KRIEGER DE MORAES, C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Curr. Microbiol.** 46:205-210.
- KUCERA, M. (1980) Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* for *Galleri mellonella* larvae. **J. Invert. Pathol.** 35:304-310.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227:680-685.
- LAVERLAM S.A. (1999) <http://www.cali.cetcol.net.com/~laverlam>. 27 de novembro.
- LIU, Z. Y.; LIANG, Z. Q.; WHALLEY, A. J.; YAO, Y. J.; LIU, A. Y. (2001) *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. **J. Invertebr. Pathol.** 78:178-182.
- LIU, H.; SKINNER, M.; PARKER, B. L.; BROWNBRIDGE, M. (2002) Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi

- against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **J. Econ. Entomol.** 95:675-681.
- LONGSHAW, C.M.; FARRELL, A.M.; WRIGHT, J.D.; HOLLAND, K.T.; (2000) Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. **Microbiology** 146:1419-1427.
- MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JR, M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. (1999) Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Rev. Microbiologia** 30:304-309.
- MARQUES, E.J.; VILLAS-BOAS, A.M.; PEREIRA, C.E.F. (1981) Orientações técnicas para a produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Em laboratórios setoriais. PLANALSUCAR, **Boletim técnico n.3**. p.5-23.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (1998) **Controle Biológico, volume I**. Ed. EMBRAPA, 262p.
- MEYER, J.R. (2005) <http://www.cals.ncsu.edu:8050/course/ent425/tutorial/integ.html>. 30 de agosto.
- MILNER, R. J. (2000) Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. **Biocontrol**. 21:47-50.
- MISKIN, J.E.; FARREL, A.M.; CONLIFFE, W.J.; HOLLAND, K.T. (1997) *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. **Microbiology** 143:1745-1755.
- MONTEIRO, F. A.; COSTA, J.; SOLE-CAVA, A. M. (1998) Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petrochii* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 92:897-900.
- NAHAR, P.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V. (2004) The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. **J. Inver. Pathol.** 85:80-88.
- NATURAL RURAL (2005) <http://www.naturalrural.com.br/produtos>. 30 de agosto.
- ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; de BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (2001) Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. **Am. J. Vet. Res.** 62:1478-1480.

- PAPAVASSILIS, C.; MACH, K.K.; MAYSER, P.A. (1999) Medium-chain triglycerides inhibit growth of *Malassezia*: implications for prevention of systemic infection. **Crit. Care Med.** 27:1781-1786.
- PINTO, A.S.; BARRETO, C.C.; SCHRANK, A.; ULHOA, C.J.; VAINSTEIN, M.H. (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Can. J. Microbiol.** 43: 322-327.
- REETZ, M.T. (2002) Lipases as practical biocatalysts. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 6:145-150.
- REISSIG, J.L.; STROMINGER, J.L.; LELOIR, L.F. (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **J. Biol. Chem.** 217:957-967.
- ROBERT, A. & AL AIDROOS, K.M. (1985) Acid production by *Metarhizium anisopliae*: Effects on virulence against mosquitoes and on detection of in vitro amylase, protease, and lipase activity. **J. Invert. Pathol.** 45:9-15.
- ROLLOF, J.; HEDSTROM, S.A.; NILSSON-EHLE, P. (1987) Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* strain from disseminated and localized infections. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B** 95:109-113.
- ROLLOF, J.; BRACONIER, J.H.; SODERSTROM, C.; NILSSON-EHLE, P. (1988) Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 7:505-510.
- RYDING, U.; RENNEBERG, J.; ROLLOF, J.; CHRISTENSSON, B. (1992) Antibody response to *Staphylococcus aureus* whole cell, lipase and staphylolysin in patients with *S. aureus* infections. **FEMS Microbiol. Immunol.** 4:105-110.
- SAXENA, R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. (1999) Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Curr. Sci.** 77:101-115.
- SANGORRÍN, M. P; FOLCO, E. J; MARTONE, C. M. (2001) Purification and characterization of proteinase inhibitor from white croaker skeletal muscle *Micropogon opercularis*. **Int J Biochem Cell Biol.** 33:691-99.

- SCHOFIELD, D.A.; WESTWATER, C.; WARNER, T.; BALISH, E. (2005) A differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. **FEMS Microbiol. Lett.** 244:359-365.
- SCHOLTE, E.; NJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W. & KNOLS, B. G. J. (2005) Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malaria J.** 2:1-8.
- SCHRANK, A.; BASSANESI, M.C.; PINTO Jr, H.; COSTA, S.V.; BOGO, M.; SILVA, M.S.N. (1993) Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura.** 45:200-205.
- SCREEN, S. E.; HU, G.; ST LEGER, R. J. (2001) Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **J. Invertebr. Pathol.** 78:260-266.
- SHAH, P. A. & PELL, J. K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 61:413-423.
- SHARMA R, CHISTI Y, BANERJEE U.C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.** 19:627-662.
- SHERLOCK, I.A. & GUITTON, N. (1982) Observações sobre a ação do fungo *Metarhizium anisopliae* Metsch. sobre algumas espécies de Triatomidae (Hemiptera, Reduviidae). **Rev. Inst. Med. Trop.** 24:234-39.
- SHIRAZI, S.H.; RAHMAN, S.R.; RAHMAN, M.M. (1998) Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 14:595-597.
- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. (1986) Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebrat. Path.** 48:368-74.
- SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M.; COLODEL. E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. **Res. Microbiol.** 156:382-392.

- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; *et al.* (1985) Measurement of the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 150:76-85.
- SMITHSON, S. L.; PATERSON, I. C.; BAILEY, A. M.; SCREEN, S. E.; HUNT, B. A.; COBB, B. D.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K.; (1995) Clarkson, J. M. Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene.** 166: 161-165.
- STEHR, F.; KRETSCHMAR, M.; KROGER, C.; HUBE, B.; SCHAFFER, W. (2003) Microbial lipases as virulence factors. **J. Molec. Cat. B: Enz.** 22:347-355.
- STEHR, F.; FELK, A.; GÁCSER, A.; KRETSCHMAR, M.; MAHN, B.; NEUBER, K.; HUBE, B.; SCHAFFER, W. (2004) Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. **FEMS Yeast Res.** 4:401-408.
- ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. (1986a) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. **J. Invert. Pathol.** 48: 85-95.
- ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. (1986b) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. **J. Gen. Microbiol.** 132:1509-1517.
- ST. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. (1987) Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Arch. Biochem. Biophys.** 253:221-232.
- ST. LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. (1990) Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Gen. Microbiol.** 136:1779-1789.
- ST. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. (1991a) Characterization of chitinase and chitinase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** 58:415-426.
- ST. LEGER, R.J.; GOETTEL, M. S.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. (1991b) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **J. Invert. Pathol.** 58:168-179.

- ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. (1993) Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Gen. Microbiol.** 139:237-243.
- ST. LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M.J. & ROBERTS, D.W. (1994) Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Arch Biochem Biophys** 313:1-7.
- ST. LEGER, R. L., JOSHI, L., BIDOCHKA, M. J. & ROBERTS, D. W. (1996a) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93:6349-6354.
- ST. LEGER, R. L., JOSHI, L., BIDOCHKA, M. J., RIZZO, N.W. & ROBERTS, D. W. (1996b) Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:1257-1264.
- ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. (1998) Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64:709-713.
- TIAGO, P. V.; FUNGARO, M. H.; de FARIA, M. R.; FURLANETO, M. C. (2004) Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on protease activities, conidia production, and virulence. **Can. J. Microbiol.** 50:335-339.
- TULLOCH, M. (1976) The genus *Metarhizium*. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** 66:407-411.
- UEDA, M.; TAKAHASHI, S.; WASHIDA, M.; SHIRAGA, S.; TANAKA, A. (2002) Expression of *Rhizopus oryzae* lipase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Molec. Cat. B: Enz.** 17:113-124.
- ULHOA, C. J. & PEBERDY, J. F. (1991) Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **J. Gen. Microbiol.** 137:2163-2169.
- ULHOA, C. J. & PEBERDY, J. F. (1993) Effect of carbon source on chitobiase production by *Trichoderma harzianum*. **Mycol. Res.** 97:45-48.
- VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. (2000) **Fundamentos de Bioquímica.** Ed. Artes Médicas, Porto Alegre.

- WANG, C.; TYPAS, M. A. & BUTT, T. M. (2002) Detection and characterization of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 213: 251-255.
- WANG, C.; SKROBEK, A. & BUTT, T. M. (2003) Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.** 85:168–174.
- WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.** 138:663-670.
- WRIGHT, C.; BROOKS, A. & WALL, R. (2004) Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Pest Manag Sci.** 60:639-44.
- ZHIOUA, E.; BOWING, M.; JONHSON, P.W.; GINSESBERG, H.S.; LEBRUM, R.A. (1997) Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromicetos) to *Ixodes scapularum* (Acari: Ixodidae). **J. Parasitol.** 83(5):815-818.



## ANEXO - Curriculum Vitae

Nome: WALTER ORLANDO BEYS DA SILVA

Idade: 24 anos (28/10/1980)

E-mail: walterbeys@cbiot.ufrgs.br

### 1) Títulos acadêmicos

- Licenciatura em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (2003)
- Bacharelado em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ênfase molecular, celular e funcional. (2003)
- Mestrado - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) - Centro de Biotecnologia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (em andamento).

### 2) Atividades científicas e técnicas

#### 2.1) Manuscritos publicados:

##### a) Periódicos científicos internacionais (indexados):

**SILVA, W.O.B.**, MITIDIERI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2005) Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, 40:321-326.

MACEDO, A.J., GAVA, R., **SILVA, W.O.B.**, DRIEMEIER, D., HENRIQUES, J.A.P., TERMIGNONI, C. (2005) Isolation and characterization of a novel subtilisin-like keratinolytic system from *B. subtilis* S14 exhibiting remarkable unhairing capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, 71:594-596.

## **2.2) Manuscritos submetidos:**

### **a) Periódicos científicos internacionais (indexados):**

**SILVA, W.O.B.**, CORRÊA, A.P.F., SANTI, L., DEDAVID E SILVA, L.A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2005) Lipolytic activity during the process of host infection by *Metarhizium anisopliae* in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology** (JIP-05-90)

SANTI, L., **SILVA, W.O.B.**, CORRÊA, A.P.F., VAINSTEIN, M.H. (2005) Pectinases production by a Brazilian strain *Penicillium oxalicum* using agroindustrial residues. **Enzyme and Microbial Technology** (ENZMICTEC-D-05-00237)

## **2.3) Trabalho de conclusão:**

Lipase: a novel *Metarhizium anisopliae* enzyme: production and solubilization – Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas / ênfase Molecular, Celular e Funcional - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## **2.4) Apresentação de pôster e/ou publicação de resumo em anais ou Salão de Iniciação Científica**

### **a) Estadual, regional ou salão IC:**

**SILVA, W.O.B.**, MACEDO, A.J., TERMIGNONI, C. (2000) Purificação parcial de uma queratinase de *Bacillus subtilis*. **Iniciação Científica em Relatos – Programa Interno de Bolsas de Iniciação Científica/PROPESQ/UFRGS**, Porto alegre – RS

MACEDO, A.J., **SILVA, W.O.B.**, TERMIGNONI, C. (2001) Characterization of a keratinase for use in the tannery industry. **Livro de resumos da III Reunião**

**Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, Porto Alegre – RS, p.77.**

- SILVA, W.O.B.**, MACEDO, A.J., TERMIGNONI, C. (2001) Partial purification of a *Bacillus subtilis* keratinase. **Livro de resumos da III Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, Porto Alegre – RS, p.43.
- SILVA, W.O.B.**, MACEDO, A.J., TERMIGNONI, C. (2002) Purificação parcial de uma queratinase de *Bacillus subtilis*. **XIII Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre – RS, p.328.
- SILVA, W.O.B.**, MITIDIÉRI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2002) isolamento e seleção de microrganismos para produção industrial de lipase. **XIV Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre – RS, p.476.
- MITIDIÉRI, S., **SILVA, W.O.B.**, SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2002) Isolamento e seleção de microrganismos para produção industrial de lipase. **Livro de resumos da IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, Porto Alegre – RS, p.51.
- SILVA, W.O.B.**, MITIDIÉRI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2002) Purificação de lipase do entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. **Livro de resumos da IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS**, Porto Alegre – RS, 79.
- SILVA, W.O.B.**, MITIDIÉRI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2003) Produção e solubilização de lipase de *Metarhizium anisopliae*. **XV Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre – RS, p.401.
- DEDAVID E SILVA, L.A., **SILVA, W.O.B.**, SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2004) Produção de *Metarhizium anisopliae* para o controle do carrapato bovino *Boophilus microplus*. **XVI Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre – RS, p.449.
- DEDAVID E SILVA, L.A., **SILVA, W.O.B.**, SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2004) Produção de *Metarhizium anisopliae* para o controle do carrapato

bovino *Boophilus microplus*. **Livro de resumos VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS**, Porto Alegre – RS, p.18.

**SILVA, W.O.B.**, MITIDIERI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2004) Produção e extração de lipase de *Metarhizium anisopliae*. **Livro de resumos VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS**, Porto Alegre – RS, p.85.

**SILVA, W.O.B.**, SANTI, L., CORRÊA, A.P.F., DEDAVID E SILVA, L.A., VAINSTEIN, M.H. (2004) Atividade lipolítica de *Metarhizium anisopliae* durante o processo de infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*. **Livro de resumos VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS**, Porto Alegre – RS, p.86.

#### **b) Nacional**

MACEDO, A.J., **SILVA, W.O.B.**, TERMIGNONI, C. (2001) Characterization of a keratinase for use in the tannery industry. **Livro de resumos da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq**, Caxambu – MG, p.88.

**SILVA, W.O.B.**, MACEDO, A.J., TERMIGNONI, C. (2001) Partial purification of keratinase from *Bacillus subtilis*. **Livro de resumos da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq**, Caxambu – MG, p.122.

MACEDO, A.J., **SILVA, W.O.B.**, DRIEMEIER, D., TERMIGNONI, C. (2002) *Bacillus subtilis* keratinase with depilating activity and its characterization. **Livro de resumos da XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq**, Caxambu – MG, p.94.

**SILVA, W.O.B.**, MACEDO, A.J., TERMIGNONI, C. (2002) Purification and characterization of keratinase from *Bacillus subtilis*. **Livro de resumos da XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq**, Caxambu – MG, p.129.

MACEDO, A.J., **SILVA, W.O.B.**, DRIEMEIER, D., TERMIGNONI, C. (2002) *Bacillus subtilis* keratinase with depilating activity: purification and

- characterization. **Livro de resumos 5º ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Brasília – DF, p.88.
- MITIDIERI, S., **SILVA, W.O.B.**, SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2002) Produção de celulase para formulação de detergentes biodegradáveis. **Livro de resumos 5º ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Brasília – DF, p.92.
- SILVA, W.O.B.**, STAATS, C.C., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2002) Subclonagem e expressão da quitinase CHIT42 (*chit 1*) de *Metarhizium anisopliae* em *Pichia pastoris*. **Livro de Resumos da XXIII Reunião de Genética de Microrganismos**, Pirenópolis – GO, p.81.
- CAMASSOLA, S., MITIDIERI, S., **SILVA, W.O.B.**, SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2002) Produção de protease para formulação de detergentes bioativos. **Livro de Resumos do VII SHEB - Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, Maringá – PR, p.141.
- SILVA, W.O.B.**, MITIDIERI, S., CAMASSOLA, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2002) Produção de lipase para formulação de detergentes bioativos. **Livro de Resumos do VII SHEB - Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, Maringá – PR, p.142.
- SILVA, W.O.B.**, MITIDIERI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2004) Produção e solubilização de lipase de *Metarhizium anisopliae*. **Livro de Resumos da XXIV Reunião de Genética de Microrganismos**, Gramado – RS, p.74.
- SILVA, W.O.B.**, MITIDIERI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2004) Produção e extração de uma lipase extracelular de *Metarhizium anisopliae*. **Livro de resumos do 6º ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Rio de Janeiro – RJ, p.178.
- MITIDIERI, S., **SILVA, W.O.B.**, DEDAVID E SILVA, L.A., VAINSTEIN, M.H. (2004) Produção de enzimas microbianas para formulação de detergentes: da bancada até a obtenção do produto. **Livro de resumos do 6º ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Rio de Janeiro – RJ, p.203.

## **2.5) Premiações e destaques por desempenho científico-acadêmico:**

- O trabalho: Purificação parcial de uma queratinase de *Bacillus subtilis*, apresentado no XIII Salão de Iniciação Científica, em 2002, recebeu DESTAQUE.

- O trabalho: *Bacillus subtilis* keratinase with depilating activity: purification and characterization, apresentado no ENZITEC 2002 – 5<sup>o</sup> Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, em 2002, recebeu DESTAQUE pela Comissão organizadora do evento.

- 3<sup>o</sup> lugar na IV Maratona de Empreendedorismo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o Plano de Negócios “BIOPLUS”, em janeiro de 2004.

## **2.6) Bolsa de Iniciação Científica:**

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia,  
Laboratório de Peptidases

Período: agosto/2000 a novembro/2000

Orientador: Prof. Dra. Fabiana Horn

Agência financiadora: Propesq-BIC

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia,  
Laboratório de Peptidases

Período: novembro/2000 a julho/2001

Orientador: Prof. Dr. Carlos Termignoni

Agência financiadora: CNPq

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia,  
Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica

Período: agosto/2001 a junho/2003

Orientador: prof. Dra. Marilene H. Vainstein

Agência financiadora: CNPq

- Tecfarm Tecnologia Química Farmacêutica LTDA.

Período: julho/2003 a janeiro/2004

Orientador: prof. Dra. Marilene H. Vainstein

Empresa financiadora: Tecfarm

### **3) Atividades relacionadas ao ensino**

#### **a) Docência em curso de extensão:**

Curso: Biotecnologia, clonagem e transgênicos, ministrado para alunos da 3ª série do ensino médio do Colégio Anchieta (11h).

### **4) Atividades profissionais**

#### **a) Estágios extra-curriculares:**

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia, Laboratório de Peptidases

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia, Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica

- Tecfarm Tecnologia Química Farmacêutica LTDA

#### **b) Participação em cursos de extensão e atualização:**

- Curso de extensão: Biologia Molecular aplicada à Clínica, promovido pela Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, no período de 07 a 09 de agosto de 2000, Porto Alegre – RS.

- Curso: Expressão de Proteínas Recombinantes em *Escherichia coli*, promovido pela Red de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Parasitarias del Cono Sur de América Latina (RTPD Network), no período de 15 a 20 de outubro de 2001, Porto Alegre – RS.

- Seminário de Atualidades Genéticas, promovido pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no período de 10 a 12 de abril de 2002, Porto Alegre – RS.

- Curso teórico-prático: Seqüenciamento e análise de genomas II, promovido pelo Grupo de Genômica Estrutural e Funcional, no período de 08 a 12 de novembro de 2004, Porto Alegre – RS.

**c) Representante discente**

Representante discente no Conselho Científico do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia – UFRGS (agosto/2004 a agosto/2005).

**d) Participação em eventos e representação em entidades de classe:**

- XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu – 19 a 22 de maio de 2001.

- XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, Pirenópolis – 3 a 5 de março de 2002.

- XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu – 18 a 21 de maio de 2002.

- XI Reunião Estadual de Biotecnologia Vegetal, Bento Gonçalves – 6 e 7 de novembro de 2002.

- VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá – 2 a 6 de dezembro de 2002.

- XXIV Reunião de Genética de Microrganismos, Gramado – 07 a 10 de março de 2004.

- VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC), Rio de Janeiro – 05 a 07 de abril de 2004.