

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**Abordagens enzimáticas e proteômicas da resposta
de fungos artropodopatogênicos submetidos a
estresses e na infecção contra *Rhipicephalus*
*microplus***

Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues

2019



UFRRJ

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Abordagens enzimáticas e proteômicas da resposta de fungos
artropodopatogênicos submetidos a estresses e na infecção contra
*Rhipicephalus microplus***

CAIO JUNIOR BALDUINO COUTINHO RODRIGUES

Sob a Orientação da PhD

Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt

E Co-orientação dos PhD

Walter Orlando Beys da Silva

Lucélia Santi

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de **Doutor** em
Ciências no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R696a

RODRIGUES, CAIO JUNIOR BALDUINO COUTINHO, 1988-
ABORDAGENS ENZIMÁTICAS E PROTEÔMICAS DA RESPOSTA DE
FUNGOS ARTROPODOPATOGÊNICOS SUBMETIDOS A ESTRESSES E
NA INFECÇÃO CONTRA *Rhipicephalus microplus* / CAIO
JUNIOR BALDUINO COUTINHO RODRIGUES. - 2019.
94 f.

Orientadora: VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT.
Coorientador: WALTER ORLANDO BEYS DA SILVA.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, 2019.

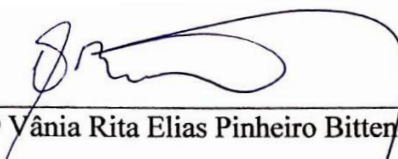
1. *Metarhizium* spp. 2. *Beauveria bassiana*. 3.
subcultivo. 4. menadiona. 5. MudPIT. I. BITTENCOURT,
VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO, 1959-, orient. II. DA
SILVA, WALTER ORLANDO BEYS, 1980-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS


CAIO JUNIOR BALDUINO COUTINHO RODRIGUES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

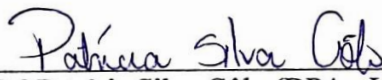
TESE APROVADA EM 22/02/2019.



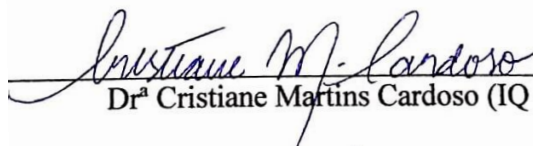
PhD Vânia Rita Elias Pinheiro Bittercourt (DPA - UFRRJ)




Drª Simone Quinelato Bezerra (IOC - FIOCRUZ)



Drª Patrícia Silva Gôlo (DPA - UFRRJ)



Drª Cristiane Martins Cardoso (IQ - UFRRJ)



Dr Éverton Kort Kamp Fernandes (IPTSP – UFG)

“The expert at anything was once a beginner”

Helen Hayes

*“Sometimes the hardest thing
and the right thing are the same...”*

All at Once – The Fray

*“How long before I get in?
Before it starts, before I begin?
How long before you decide?
Before I know what it feels like?”*

*Where to, where do I go?
If you never try, then you'll never know
How long do I have to climb
Up on the side of this mountain of mine?*

*Look up, I look up at night
Planets are moving at the speed of light
Climb up, up in the trees
Every chance that you get is a chance you seize [...]*

Speed of Sound – Coldplay

Dedico esse trabalho a todos que acreditaram nessa jornada e entenderam minhas ausências na busca por conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Durante 4 anos, por diversas vezes me vi buscando as melhores palavras (*Face your fears*) para expressar a satisfação de concluir este trabalho. Pois bem, analiso hoje e vejo que construí a melhor “colcha de retalhos” que podia.

Primeiro agradeço a *Deus* e à *Nossa Senhora* pela proteção divina e por nunca me deixarem esmorecer diante das dificuldades. Aos meus pais, *Altamir* e *Lucineia Rodrigues*, pelo amor, dedicação, ensinamento de vida e pela esperança no meu amanhã. Amo vocês! Às madrinhas *Neuza* e *Marlene*, tia *Olinda*, tia *Jandira*, tio *Márcio*, padrinho *Germano* e demais familiares pelo carinho, orações e por entender as inúmeras ausências em busca do meu sonho. Em especial, agradeço à *Ágatha Oliveira* pelo seu amor, companheirismo, dedicação e confiança de que no final tudo iria dar certo!

À minha orientadora *Prof.^a PhD. Vânia Bittencourt* pelos longos anos de trabalho, o estímulo, amizade e por sempre proporcionar o melhor que fosse possível para o meu crescimento. Grande gratidão e admiração pelo seu trabalho! Aos meus amigos e co-orientadores *Prof^o Dr. Walter Orlando Beys da Silva* e *Prof^a Dra. Lucélia Santi*, por todas as fases durante estes anos, pelo profissionalismo, e principalmente, por serem uma eterna inspiração para mim.

À *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* por todo o ensinamento pessoal durante os anos em Seropédica e profissional nos diferentes ramos da Medicina Veterinária. Ao *Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico-Veterinária*, o conhecido por nós como LCM, pela curiosidade, por me possibilitar produzir algumas respostas, porém gerar novas dez perguntas. Aos companheiros científicos de LCM: *Prof^a Dra. Isabele Angelo*, *Prof^a Dra. Patrícia Gôlo*, *Dra. Mariana Camargo*, *PhD. Cristiana Monteiro (University of Santiago de Compostela)*, *Allan, Michel, Jéssica, Maria, Andreia, Emily, Amanda, Thaís, Taiana, Laura, Julie, Keity, Samara, Ricardo, Fernanda, Victória* e ao técnico *Adonis*, agradeço pelos trabalhos em equipe, os churrascos, as coletas, os cafezinhos na cozinha da Estação. Sempre terei esses momentos por onde for! Muito obrigado por tudo.

À *Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)* por abrir as portas e auxiliar em diversas etapas dessa tese. À toda a equipe de Porto Alegre dos *Prof^o Dr. Walter Orlando Beys da Silva* e *Prof^a Dra. Lucélia Santi*, além do *Dr. Markus Berger* do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por me receberem tão bem. Ao *M.Sc. Rafael Rosa* pelas incansáveis e noturnas ajudas com as análises proteômicas. Aos amigos de Lajeado – RS: *Eduardo e família, Felipe e família, Brunieli, Emílio, Julia, Rodrigo, Édina, Giseli, Thaina, Roberta* e *Amanda* por todos momentos, os cafés nos intervalos, experimentos, churrascos, estatísticas, *happy hours* no Tombado. Muito grato pela receptividade do povo gaúcho, vocês são maravilhosos.

À *Dra. Deborah Henderson* do *Institute of Sustainable Horticulture (Kwantlen Polytechnic University - Surrey - British Columbia – CA)* por me possibilitar a vivência e treinamento em sua unidade de trabalho no Canadá. Muito grato também a equipe composta pela *Lisa, Yan, Ylless, Kiara, Ben*, além da *Athena, Waji, Amy e família*, por todos os momentos especiais na minha primeira visita ao Canadá. Agradeço também ao *Allan Marciano* por estar presente e facilitar todos os passos nesse grande desafio para mim.

Ao *Prof. PhD Michael J Bidochka* por me receber em seu laboratório na *Brock University* (St Catharines – Ontario - CA), por todos os ensinamentos e pela receptividade na minha segunda estadia no Canadá. Agradeço também aos companheiros do *Bidochka's team*: *Shasha Hu, Soumya Moonjely e família, Steven Angelone, Larissa Barelli, Sarah Lahey, Olivia Deb e Zac Mason* por todos os momentos vividos. Em especial a *Soumya*, por toda sua atenção, profissionalismo, dedicação. Obrigado por mudarem a minha vida!

À *Ms. Mary Bidochka*, por todo o carinho, ajudas no inglês, pelas longas conversas, conselhos. Obrigado pelas comidas ucranianas maravilhosas (borscht, holubtsi, kovbasa, peroggyes, kapusta), pelas histórias, por ter aprendido “Boa Noite” e me ensinar “Dobranich/доброї ночі”. Você provou que para ser amigo, não existe país, cultura ou mesmo idade que nos limite. Eternamente grato por tornar esse momento muito mais do que especial para mim. “Do pobachennya/До побачення” my dear friend and drink more water!

Aos amigos feitos no Canadá *Isabela, Tamires e Zac Reimer, Lorena e Murilo*. Obrigado por todos os momentos, as brasilidades, as compras, os perengues, os jantares, o Natal brasileiro, o Ano Novo. Agradeço por terem tornado essa jornada mais leve. Honrado também do reencontro com dois grandes amigos *George e Güünever* aqui no Canadá. Muito feliz em revê-los e saber que continuamos os mesmos, não importa os lugares que passemos. Vocês todos foram e serão sempre especiais!

Aos meus amigos de vida *Túlio Reis, Gleiciane Soledade, Jessica Ferreira, Gleice Amaro e Juliana Macedo*. Obrigado por estarem por perto todas as vezes que precisei e principalmente por fazerem da nossa amizade algo especial que perdura por todos estes anos que se passam. Em especial e com muita emoção, agradeço à *Juliana* e à *Gleice* por dividir comigo a casa, comida, uma coelha, angústia, melhores alegrias, tristezas. Gratidão à UFRRJ e à vida por nos unir de forma tão genuína meus amigos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, em especial a turma que se iniciou em 2013 e que agora conclui mais uma etapa. Obrigado pelos momentos vividos, pelos sempre animados encontros de corredor e pelas dificuldades e dúvidas compartilhadas. Orgulho da nossa trajetória!

Aos professores do PPGCV por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários da Estação Experimental Wilhelm Otto Daniel Martin Neitz e do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ que contribuíram para a minha formação.

Ao CNPq por ter todos estes anos ter fornecido a mim as bolsas de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado, permitindo realizar assim estes e muitos outros experimentos. O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, no qual agradeço por todo o apoio e fomento aos projetos que esta tese esteve envolvida.

E, por fim, a todos que de certa forma ajudaram direta ou indiretamente na elaboração deste manuscrito ou ao meu crescimento profissional.

Muito obrigado por tudo!

BIOGRAFIA

Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues, filho de Altamir José Rodrigues e Lucineia Balduino Coutinho Rodrigues, nasceu em 11 de outubro de 1988, no município de Volta Redonda - RJ. Entre os anos de 2004 a 2006, estudou no Colégio Agrícola Nilo Peçanha – UFF (atual Instituto Federal do Rio de Janeiro – Campus Nilo Peçanha), localizado no município de Pinheiral - RJ, tendo concluído concomitantemente o Ensino Médio.

Na trajetória acadêmica, em setembro de 2007 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído o mesmo em janeiro de 2013. No ano de 2010, iniciou como estagiário no Laboratório de Controle Microbiano da mesma Universidade, sob orientação da Prof. Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, tornando-se bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq) por três anos. Meados de Março de 2013 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sendo o mesmo concluído em fevereiro de 2015 sob orientação da Prof. Dra. Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt e co-orientação do Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto. Dando sequência à sua formação, em março de 2015, iniciou o Doutorado no mesmo curso em questão sendo orientado pela Prof. Dra. Vânia R. E. P. Bittencourt e co-orientado pelo Prof. Dr. Walter Orlando Beys da Silva e pela Prof. Dra. Lucélia Santi. Durante os cursos de pós-graduação participou de congressos e simpósios, publicando artigos científicos em periódicos nacionais e internacionais.

RESUMO

COUTINHO-RODRIGUES, Caio Junior Balduino. **Abordagens enzimáticas e proteômicas da resposta de fungos artropodopatogênicos submetidos a estresses e na infecção contra *Rhizoglyphus microplus***. 2019. 94 p. Tese (Doutorado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Na última década, estudos envolvendo a aplicação de *Metarhizium* spp. e *Beauveria bassiana* no controle de *Rhizoglyphus microplus* têm crescido de forma exponencial. O presente estudo avaliou a influência de repiques sucessivos em meio de cultivo sintético (batata-dextrose-ágar - BDA) na atividade enzimática e efeitos sobre virulência para *R. microplus* em três isolados de *Metarhizium*. Para isso, amostras foram obtidas do cultivo inicial (Início) e após o décimo (10º ciclo) e vigésimo (20º ciclo) repiques. Apresentando consequências individualizadas entre os isolados, alterações na macromorfologia, diminuição do crescimento radial e produção conidial, além de redução de virulência e atividades de Pr1, Pr2 e lipase foram majoritariamente detectadas após o 20º ciclo. Em outra vertente, foi-se também estudado o efeito de um agente oxidante (menadiona - MEN), potente indutor de espécies reativas de oxigênio, no desenvolvimento, virulência para *R. microplus*, atividade enzimática e secreção proteica de *M. anisopliae* sensu stricto (s.s.). Por ser pouco tolerante, para todos os experimentos, uma subdosagem (50% da CL50) de MEN foi inicialmente adicionada aos cultivos. Em meio sólido suplementado com MEN, mudanças relevantes no desenvolvimento das colônias, além de atividades enzimáticas conidiais foram detectadas. Em contrapartida, de forma surpreendente, melhorias significativas no percentual de mortalidade de larvas também ocorreram. Nas análises de meio basal líquido acrescido de cutícula de *R. microplus*, num total de 654 proteínas identificadas, 31 foram *up*- e *down*-reguladas, estando principalmente relacionadas à atividade antioxidante (catalase), patogenicidade (como Pr1B, Pr1D e Pr1K), reparo celular e morfogênese. Por fim, a atividade e secreção de proteínas (secretoma) de *Beauveria bassiana* s.l. durante a infecção em *R. microplus* e sua comparação com condições normais de crescimento foram reportadas. A partir de meio basal líquido acrescido de cutícula de *R. microplus*, e aplicando uma tecnologia multidimensional de identificação de proteínas, de um total de 236 proteínas, 32 proteínas foram identificadas em ambas as condições de estudo e 50 exclusivamente na condição de infecção, sendo estas atribuídas a diferentes aspectos como adesão ao hospedeiro, penetração cuticular, defesa fúngica e estresse. Nesse contexto, um maior número de proteínas detectadas com atividade hidrolítica, classe enzimática de todas as enzimas degradadoras de cutícula, como lipases e proteases, foram identificadas e validadas através de ensaios enzimáticos. Em suma, destaca-se que o repiques sucessivos e o estresse oxidativo, assim como o desconhecimento dos principais metabólitos produzidos durante a infecção por *B. bassiana*, ainda limitam prospecções futuras para o biocontrole, em especial à aplicação e ao monitoramento de produtos à base de fungos artropodopatogênicos no uso para carrapatos.

Palavras-chave: *Metarhizium* spp.; *Beauveria bassiana*; subcultivo; menadiona; MudPIT.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq

ABSTRACT

COUTINHO-RODRIGUES, Caio Junior Balduino. **Enzymatic and proteomic approaches to the response of arthropod-pathogenic fungi under stress conditions and the infection against *Rhipicephalus microplus***. 2019. 94 p. Thesis (Doctor in Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Studies using *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* to control *Rhipicephalus microplus* have exponentially increased over the last decade. Here, it was reported the subculturing of three *Metarhizium* isolates in synthetic culture medium (potato-dextrose-agar - PDA) and its effect on enzymatic activity and virulence to *R. microplus*. For this, samples were collected from the first culture (Initial) and after the tenth (10th cycle) and twentieth (20th cycle) growth. Changes in macromorphology, decrease in radial growth and conidia production, as well as reduction of virulence and Pr1, Pr2 and lipase activities, were detected after the 20th cycle. Next in order, the effects of a potent oxidizing agent (menadione - MEN) were explored in the development, virulence to *R. microplus*, enzymatic activity and protein secretion of *M. anisopliae* sensu stricto (s.s.). With low tolerance to MEN, a sub dose (half of LC50) was initially added to the cultures for all experiments. In solid medium supplemented with MEN, significant changes in the macromorphology of colonies and conidial enzymatic activities were detected. In contrast, surprisingly, significant improvements in the percentage of larval mortality also occurred. In basal medium (BM) plus *R. microplus* cuticle, in 654 identified proteins, 31 were *up*- and *down*-regulated, mainly related to antioxidant activity (catalase), pathogenicity (Pr1B, Pr1D and Pr1K), cell repair and morphogenesis. Finally, the activity and secretion of proteins (secretoma) of *Beauveria bassiana* s.l. during *Rhipicephalus microplus* infection versus normal growth conditions were described. Applying a multidimensional protein identification technology with samples from BM plus *R. microplus* cuticle, up to 236 proteins were characterized, being 32 identified in both conditions and 50 exclusively in the infection condition. All proteins were related to different aspects such as host adhesion, cuticular penetration, fungal defense and stress. In this context, a higher number of proteins detected with hydrolysis activity, enzymatic class of all cuticle-degrading enzymes, such as lipases and proteases, were identified and validated through enzymatic assays. In summary, subculturing and oxidative stress, as well as the lack of knowledge about the main metabolites produced during *B. bassiana* infection, still limit the perspectives of biocontrol, especially the application and the environmental track of products based on arthropodopathogenic fungi used in tick control.

Keywords: *Metarhizium* spp.; *Beauveria bassiana*; subculturing; menadione; MudPIT.

Financial support: CAPES, CNPq

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Isolados de *Metarhizium* spp., hospedeiro original de isolamento, origem geográfica do isolamento, espécie identificada e ano de isolamento. 22

Tabela 2 – Atividades proteolítica e lipolítica (U) de proteínas extraídas da superfície conidial (SC) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. após sucessivos ciclos de repique contínuo com intervalos de 15 dias. 27

Tabela 3 - Atividades proteolítica e lipolítica (U) de proteínas da secreção micelial (SM) de isolados de *Metarhizium* spp. após sucessivos ciclos de repique contínuo com intervalos de 15 dias. 28

Tabela 4 - Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P.I.F.), Peso Total da Massa de Ovos (P.T.M.O.), Percentual de Eclosão (%), Índice de Produção de Ovos (I.P.O.), Índice Nutricional (I.N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensões (10^8 conídios/mL) de *Metarhizium* spp. 30

Tabela 5 - Concentrações letais (CL 50) dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. cinco dias após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* com suspensões aquosas ao início (Inicial) e após sucessivos ciclos de repique contínuo (20º ciclo) em meio BDA. Todo o experimento foi mantido sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$. 32

Tabela 6 - Concentrações letais (CL 50) dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. dez dias após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* com suspensões aquosas ao início (Inicial) e após sucessivos ciclos de repique contínuo (20º ciclo) em meio BDA. Todo o experimento foi mantido sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$. 32

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Percentual médio \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 5, 10, 15 e 20 dias após a exposição a suspensões aquosas em diferentes concentrações fúngicas de *Metarhizium anisopliae* s.s., crescido por 15 dias em meio de cultura batata-dextrose-ágar suplementado (BDA + MEN) ou não (BDA CTR) com menadiona. 49

Tabela 2 - Concentração letal 50% (CL 50) de *Metarhizium anisopliae* s.s. crescidos em BDA + MEN e BDA CTR, obtida a partir de ensaios biológicos com larvas de *Rhipicephalus microplus* 5, 10, 15 e 20 dias após o tratamento. 49

Tabela 3 - Atividades enzimáticas das proteínas de superfície conidial (PSC) e intracitoplasmáticas (PIC) de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s. crescidos em BDA CTR e BDA + MEN. 50

Tabela 4 – Proteínas diferencialmente expressas, presente em ambas as condições, identificadas no secretoma de *Metarhizium anisopliae* s.s. após 72 horas de crescimento em meio basal com cutícula de *R. microplus* suplementado com menadiona (MBRm + MEN) em comparadas à condição controle (MBRm). **51**

Tabela 5 - Perfil de proteínas identificadas exclusivamente no secretoma de *Metarhizium anisopliae* s.s. após 72 horas de crescimento em meio basal com cutícula de *R. microplus* suplementado com menadiona (MBRm + MEN). **54**

Tabela 6 – Ensaio enzimático das proteínas da secretado micelial (PSM) e porção intracitoplasmática micelial (PIM) de *Metarhizium anisopliae* s.s. após 72hs de crescimento em meio basal com cutícula de *R. microplus* (MBRm) e suplementado com menadiona (MBRm + MEN). **55**

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Proteínas do secretoma de *Beauveria bassiana* identificadas exclusivamente em meio de cultivo contendo cutícula de *Rhipicephalus microplus* (MM – Rm). **72**

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente expressas identificadas no secretoma de *Beauveria bassiana* s.l. quando cultivado por 48 h em condição artificial de infecção do carrapato *Rhipicephalus microplus* quando comparado ao controle (glicose). **74**

Tabela 3 - Previsão de localização de proteínas identificadas como diferencialmente expressas em secretoma de *B. bassiana* comparando cultura em cutícula de *Rhipicephalus microplus* versus condição controle (glicose). **76**

Tabela 4 - Proteínas do secretoma de *Beauveria bassiana* cultivado em meio contendo cutícula de *Rhipicephalus microplus* e seus correspondentes ortólogos **78**

Tabela 5 – Atividade enzimática do sobrenadante de cultura de *Beauveria bassiana* crescido por 48 horas em meio basal mínimo acrescido de glicose (MM – Gli) ou cutícula de *Rhipicephalus microplus* (MM – Rm). **81**

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Variações fenotípicas e diâmetro médio (mm) de *Metarhizium* spp. crescidos em meio batata-dextrose-ágar (BDA) após sucessivos repiques com intervalos de 15 dias. **26**

Figura 2 - Produção conidial (conídios/cm²) de *Metarhizium* spp. crescidos em meio BDA após sucessivos ciclos de repique contínuo com intervalos de 15 dias. Letras iguais para o mesmo isolado não diferem estatisticamente entre si **27**

Figura 3 - Percentual médio e desvio padrão da mortalidade 5, 10 e 15 dias após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* com diferentes concentrações de suspensão aquosa dos isolados de *Metarhizium* spp. (10⁵, 10⁶, 10⁷ e 10⁸ conídios/mL) ao início (Inicial) e após sucessivos ciclos de repique contínuo (20º ciclo) em meio BDA. Todo o experimento (n = 10 tubos) foi mantido sob temperatura de 27 ± 1°C e umidade relativa ≥ 80%. **31**

CAPÍTULO II

Figura 1 - Média ± desvio padrão da germinação (%) de *Metarhizium anisopliae* s.s. em BDA suplementado com diferentes concentrações (mM) de menadiona (**A**). BDA + 0,01 mM visualizado a 1000x - conídios com citoplasma intensamente corados e tubo germinativo desenvolvido na grande maioria dos esporos quantificados – **seta vermelha (B)**; BDA + 0,13 mM visualizado a 1000x - total inibição da germinação e discretas retrações citoplasmáticas - **seta preta (C)**. Os valores médios, as barras de desvio e CL50 representam a variação encontrada entre as nove repetições realizadas (p<0,05) **47**

Figura 2 – Produção conidial (conídios/cm²) (**A**) e variações fenotípicas de *Metarhizium anisopliae* s.s. em BDA CTR (**B**) ou acrescido de metade da CL50 (0,019 mM) de MEN (**C**). **48**

Figura 3 – Diagrama de Venn da distribuição e sobreposição de proteínas de *Metarhizium anisopliae* s.s. a partir de secretado micelial obtido após 72 horas de crescimento em meio basal acrescido de cutícula de *Rhipicephalus microplus* (1%) e suplementado (MBRm + MEN) ou não (MBRm) com menadiona. Dados produzidos com o módulo AAPV do PatternLab com probabilidade de 0,01. **51**

Figura 4 - Categorização de proteínas diferencialmente expressas identificadas no secretoma de *Metarhizium anisopliae* em meio basal líquido com cutícula de *R. microplus* (MBRm) e contendo menadiona (MBRm + MEN). Classificação em (**A**) processo biológico e (**B**) função molecular. **53**

CAPÍTULO III

Figura 1 - Distribuição e sobreposição de proteínas secretadas por *Beauveria bassiana* após 48h de crescimento em meio de cultivo acrescido (MM – Rm) ou não (MM – Gli) de cutícula de *Rhipicephalus microplus*. Os dados do Diagrama de Venn foram gerados no módulo AAPV do programa PatternLab ($p < 0,01$). **72**

Figura 2 - Categorização de proteínas diferencialmente expressas identificadas no secretoma de *Beauveria bassiana*, comparando cultura em meio de cutícula de carrapato versus controle. Classificação em **(A)** processo biológico, nível 3 e **(B)** função molecular, nível 3. **75**

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| CAPÍTULO I | |
| SUBCULTIVOS SUCESSIVOS DE <i>Metarhizium</i> spp. E SEU IMPACTO NA ATIVIDADE CARRAPATICIDA CONTRA <i>Rhipicephalus microplus</i> | 18 |
| RESUMO | 19 |
| ABSTRACT | 20 |
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 2.1. Local dos experimentos | 21 |
| 2.2. Obtenção e manutenção dos isolados | 22 |
| 2.2. Delineamento experimental | 22 |
| 2.3. Desenvolvimento das colônias e produção conidial | 22 |
| 2.4. Extração das proteínas da superfície conidial | 23 |
| 2.5. Crescimento micelial e extração das proteínas da secreção micelial | 23 |
| 2.6. Atividades enzimáticas | 23 |
| 2.7. Testes de virulência para <i>Rhipicephalus microplus</i> | 24 |
| 2.7.1. Ensaios biológicos com fêmeas ingurgitadas | 24 |
| 2.7.2. Ensaios biológicos com larvas | 24 |
| 3 RESULTADOS | 25 |
| 3.1. Variações fenotípicas, crescimento e produção conidial | 25 |
| 3.2. Atividades enzimáticas da superfície conidial (SC) | 27 |
| 3.3. Atividades enzimáticas da secreção micelial (SM) | 28 |
| 3.4. Virulência de <i>Metarhizium</i> spp. para fêmeas ingurgitadas | 29 |
| 3.5. Virulência de <i>Metarhizium</i> spp. para larvas | 29 |
| 4 DISCUSSÃO | 33 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |
| CAPÍTULO II | |
| USO DE MENADIONA COMO INDUTOR DE RESPOSTAS OXIDATIVAS EM <i>Metarhizium anisopliae</i> E SEU EFEITO NA ATIVIDADE CARRAPATICIDA CONTRA <i>Rhipicephalus microplus</i> | 40 |
| RESUMO | 41 |
| ABSTRACT | 42 |
| 1 INTRODUÇÃO | 43 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 44 |
| 2.1. Local dos experimentos | 44 |
| 2.2. Obtenção, identificação e manutenção fúngica | 44 |
| 2.3. Curva de sobrevivência à menadiona | 44 |
| 2.4. Produção conidial e extração de proteínas após crescimento em meio sólido | 44 |
| 2.5. Virulência para larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> | 45 |
| 2.6. Preparação, crescimento em meio basal e extração de proteínas | 45 |

| | |
|--|-----------|
| 2.7. Dosagem de proteínas totais | 46 |
| 2.8. Preparação das amostras para espectrometria de massas | 46 |
| 2.9. Espectrometria de massas, identificação de proteínas e análise de dados | 46 |
| 2.10. Ensaios enzimáticos e validação dos dados proteômicos | 47 |
| 3 RESULTADOS | 47 |
| 3.1. Tolerância à menadiona | 47 |
| 3.2. Crescimento em meio sólido e produção conidial | 48 |
| 3.3. Ensaio biológico com larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> | 49 |
| 3.4. Atividade enzimática conidial | 51 |
| 3.5. Análise proteômica | 51 |
| 3.6. Validação dos dados proteômicos | 56 |
| 4 DISCUSSÃO | 56 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

CAPÍTULO III

| | |
|---|-----------|
| SECRETOMA DE <i>Beauveria bassiana</i> s.l. RELACIONADO À INFECÇÃO EM <i>Rhipicephalus microplus</i> | 66 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 67 |
| ABSTRACT | 68 |
| 1 INTRODUÇÃO | 69 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 70 |
| 2.1. Manutenção do isolado fúngico e crescimento em meio mínimo líquido | 70 |
| 2.2. Eletroforese em gel | 71 |
| 2.3. Preparação dos extratos proteicos | 71 |
| 2.4. Preparação de amostras para espectrometria de massas | 71 |
| 2.7. Validação dos dados proteômicos | 72 |
| 2.8. Análise estatística | 72 |
| 3 RESULTADOS | 73 |
| 3.1. Visão geral do secretoma de <i>B. bassiana</i> | 73 |
| 3.2. Análise funcional das proteínas | 75 |
| 3.3. Validação dos dados proteômicos | 82 |
| 4 DISCUSSÃO | 83 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 86 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| CONCLUSÕES GERAIS | 93 |
|--------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 94 |
|-----------------------------|-----------|

ANEXOS

| | |
|--|--|
| 1 – Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (UFRRJ) | |
|--|--|

INTRODUÇÃO GERAL

O controle de pragas de importância médico-veterinária é um grande desafio aos países produtores de alimentos no mundo. Com grande participação na produção de leite e carne mundiais, o Brasil registra diversos prejuízos com a ocorrência de ecto e endoparasitoses em animais de produção. Como medida de controle, a aplicação em larga escala de produtos químicos figura como a escolha de eleição para a maioria dos produtores agropecuários. No entanto, consequências como poluição ambiental, intoxicação alimentar e surgimento de populações de artrópodes resistentes têm sido recorrentes nos estados brasileiros.

Por um outro lado, o uso de micro-organismos artropodopatogênicos (*Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp.) para controle de carrapatos têm recebido memorável destaque como método alternativo de controle. A colonização destes fungos em artrópodes como *Rhipicephalus microplus*, carrapato típico dos bovinos, pode ocorrer de forma espontânea na natureza, desde que realizada em condições apropriadas. Em linhas gerais, os processos de adesão, germinação e penetração durante a infecção são mediados a partir do contato com o hospedeiro e estimulam variados tipos de respostas endógenas no patógeno. Assim, um arsenal de enzimas proteolíticas, lipolíticas e quinolíticas, além de proteínas relacionadas à adesão como as hidrofobinas, são secretadas em especial nas fases iniciais da colonização, garantindo tanto a fixação quanto o desenvolvimento e a degradação da cutícula. Dentro da hemocele, a resposta imunológica produzida pelo hospedeiro atua controlando o desenvolvimento hifal na cavidade celomática, contudo é confrontada com a produção de moléculas e metabólitos bioativos pelo patógeno. Após a colonização, a exteriorização fúngica ocorre a partir da exposição das hifas e da produção de conídios na superfície do tegumento, sendo a manutenção da espécie assegurada a partir da dispersão dos propágulos pelo ar no ambiente.

De ecologia ampla, muitos isolados de *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. permanecem viáveis no solo por longos períodos de tempo, coabitando e positivamente influenciando o sistema radicular de plantas. Porém, com frequência sofrem com a ação de fatores bióticos e abióticos. Além da expressão endógena de genes relacionados à patogenicidade (fatores de virulência), o estresse fúngico, seja no ambiente ou durante a infecção, atua como um dos principais modulares da eficácia fúngica. Como resposta aos diferentes tipos de estresse, mecanismos intra e extracitoplasmáticos, particularmente a secreção de proteínas, são desencadeadas na tentativa de reduzir tais efeitos. Nesta fase, alta atividade oxidativa é demarcada, e a produção de enzimas antioxidantes como catalases, peroxidases e superóxido dismutases atuam reduzindo danos celulares e protegendo o material genético.

A partir de uma visão multifatorial, estudos que investigam os efeitos da privação nutricional, longevidade das colônias, sensibilidade à radiação ultravioleta (UV), termotolerância, pressão osmótica, umidade relativa (UR) e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio na biologia fúngica têm sido amplamente relacionados às principais vias metabólicas vitais destes micro-organismos. Na tentativa de entender tais influências, investigações associativas de taxonomia, enzimologia, proteômica e expressão gênica têm sido cada vez mais reportadas na literatura no intuito de aprimorar a aplicação do controle biológico, especialmente nos casos em os fatores ambientais sejam limitantes para assegurar sua eficiência.

REVISÃO DE LITERATURA

Rhipicephalus microplus

A ocorrência de carrapatos em animais é descrita desde a antiguidade. Tido como um dos principais ectoparasitas na produção nacional de bovinos (GRISI et al., 2014), sua dispersão esteve sempre associada às grandes navegações que distribuía animais de produção pelos diferentes continentes do mundo. O gênero *Rhipicephalus* tem sua origem relatada na Ásia, com descrições na Ilha de Java e Índia. Para *Rhipicephalus microplus*, conhecido como o popular “carrapato dos bovinos”, acredita-se que os registros iniciais tenham ocorrido na África e nas Américas, a partir de animais advindos do continente asiático (LABRUNA et al., 2009; BARRÉ; UILENBERG, 2010). Denominado inicialmente de *Boophilus microplus* Canestrini, 1888, a espécie passou por importantes revisões taxonômicas ao longo das últimas décadas (MURRELL; BARKER, 2003). Para os táxons atuais, é enquadrada no Reino Animalia, Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida, Superfamília Ixodoidea, Família Ixodidae, Subfamília Rhipicephalinae, Gênero *Rhipicephalus*, Subgênero *Boophilus*, Espécie *Rhipicephalus microplus* (ITIS, 2018).

Comumente relatado em bovinos, *R. microplus* pode parasitar também diversas espécies de animais, incluindo em casos de infestação acidental o homem (BARROS-BATTESTI et al., 2006). De ciclo caracterizado como monoxeno, apresenta 4 diferentes estágios de desenvolvimento (ovos, larvas, ninfas e adultos). A partir do hematofagismo dos adultos, as fêmeas completamente ingurgitadas se desprendem do hospedeiro e vão ao solo para realizar a oviposição. Após a queda, ocorre o amadurecimento do sistema reprodutivo dentro de 3 dias (período de pré-postura), para assim iniciar a postura dos ovos (aproximadamente 3000 ovos). Em 30 dias, os ovos passam por período de incubação até a completa eclosão das larvas (BARRÉ; UILENBERG, 2010). Estas, após contato com o oxigênio, iniciam o processo de esclerotização da cutícula até se tornarem aptas ao parasitismo. Devido ao geotropismo negativo, nas horas mais frescas do dia, migram para o ápice de forrageiras, sendo que a detecção do hospedeiro ocorre através de um órgão sensorial especializado quimiorreceptor e termorreceptor (órgão de Haller) que detecta principalmente o gás dióxido de carbono exalado pelo animal durante a respiração. A fase parasitária se inicia no contato com o corpo do hospedeiro, no qual as larvas se alojam em áreas de menor acesso como virilha, pescoço, face interna dos membros, cauda e pavilhão auricular. As mudanças estagiais de ninfa e adultos ocorrem na superfície do hospedeiro entre 18 a 26 dias, cujo sangue se torna a principal fonte de nutrição. A cópula também é realizada na superfície corporal do animal, sendo um macho apto de fecundar mais de uma fêmea; as fêmeas fertilizadas aumentam sua ingestão de sangue e se desprendem após o completo ingurgitamento para dar origem a uma nova geração no solo (SONENSHINE; ROE, 2014).

O hematofagismo realizado por *R. microplus* acarreta severos danos à saúde animal. No território nacional, estima-se que os prejuízos anuais sejam de aproximadamente 3,24 bilhões de dólares (GRISI et al., 2014) devido à redução na produção de carne e leite, transmissão de patógenos e perdas em carcaça e couro (HORN; ARTECHE, 1985). O controle de maneira intensiva geralmente é efetuado com a utilização de bases químicas, contudo o uso errôneo e a aplicação indiscriminada têm favorecido o desenvolvimento de populações resistentes em todo o Brasil (HIGA et al., 2016; KLAFLE et al., 2017).

Controle biológico e status atual no Brasil

Historicamente, a ocorrência do controle biológico na natureza encontra-se relacionada com as primeiras descrições de doenças em artrópodes. Atualmente, fungos patogênicos para artrópodes como *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. (ZIMMERMANN, 2007 a; b) são os micro-organismos mais estudados no controle biológico. Como principais vantagens englobam: a capacidade de selecionar micro-organismos que tenham maior especificidade e seletividade pelo hospedeiro; multiplicação e dispersão direta no meio ambiente; efeitos secundários em gerações subsequentes de artrópodes e possibilidade de associação com outros métodos rotineiros de controle, como os acaricidas químicos (ALVES; LOPES, 2008). Porém, ainda apresentam dificuldade de competição com os inseticidas tradicionais devido à ação lenta, dependência de condições ambientais para garantia de eficácia, produção e distribuição ilegal de produtos não registrados, dificuldade de armazenamento (refrigeração) e necessidade de recomendação técnica-científica para melhorar as estratégias de utilização (MASCARIN et al., 2018).

O uso do biocontrole para pragas é uma realidade amplamente difundida no meio agrícola, no qual diversas companhias globais têm expandindo a divulgação de micopesticidas no Brasil. Dos 82 pesticidas microbianos legalmente registrados no território nacional, 46% são considerados micoinseticidas, sendo 24 produtos à base de *M. anisopliae* e 13 produtos de *B. bassiana*, difundidamente utilizados no controle de cigarrinhas da cana de açúcar e mosca branca (MASCARIN et al., 2018). Embora ainda com dificuldades legais para registro de produtos, a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio) tem projeções exponenciais para os próximos anos e espera um crescimento para o seguimento entre 15 e 20% (FARIA, 2017).

Patogenia de fungos artropodopatogênicos

Fungos artropodopatogênicos produzem diferentes estruturas fúngicas durante seu desenvolvimento em função das fontes nutricionais disponíveis e das condições ambientais predisponentes (KAMP; BIDOCHKA, 2002; LANZA et al., 2009). A colonização é marcada por distintas etapas, sendo o conídio a principal forma infectiva de propágulo para diversos artrópodes (FANG et al., 2007). Em contato com o hospedeiro, a expressão de genes relacionados à infecção é desencadeada e proteínas como *Metarhizium adhesion protein 1* (Mad 1) permitem que o conídio se fixe à superfície cuticular (WANG; ST LEGER, 2007).

Na sequência, inicia-se o processo de diferenciação celular com formação do tubo germinativo. Essa fase é marcada por intensa atividade intracitoplasmática, permitindo o acúmulo de metabólitos como glicose, lipídeos e enzimas hidrolíticas para consumo nas etapas seguintes (ST LEGER et al., 1991). Sabe-se que fatores como a relação de carbono e nitrogênio no substrato, temperatura, umidade relativa do ar, radiação UV e pH do meio diretamente influenciam na eficiência deste processo (LOVETT; ST LEGER, 2015). É importante também ressaltar que, nesta fase em específico, o fungo utiliza exclusivamente de suas reservas metabólicas para o desenvolvimento sobre o hospedeiro alvo (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). A formação do apressório é marcada pela intensa pressão de turgor que movimenta grande volume de soluto (fração líquida intracelular e enzimas hidrolíticas) até a extremidade do tubo germinativo (NAHAR et al., 2008). A penetração ocorre com a digestão da cutícula a partir de pressões mecânicas associadas à ação de enzimas como lipases, quitinases e proteases (KRIEGER et al., 2003; BEYS-DA-SILVA et al., 2010).

Após internalizar através da cutícula, a primeira linha de defesa a ser superada é a resposta imune inata do hospedeiro. Nessa fase, devido às condições adversas para desenvolvimento, os fungos podem se diferenciar em formas crípticas de crescimento (blastosporos) ou produzir substâncias que imunomodulam o sistema, como as toxinas. De ação conhecida para insetos, a produção de destruxina por *M. anisopliae* e beauvericina por *B.*

bassiana podem exercer papel fundamental durante a infecção, especialmente auxiliando na redução do tempo letal. Sinais como inquietação, perda da sensibilidade, incoordenação dos movimentos e paralisia, devido aos metabólitos secundários produzidos, podem ser observados (ROBERTS; ST. LEGER, 2004; WANG; XU, 2012). A colonização ocorre com desenvolvimento de hifas na hemocele do artrópode, levando à morte através da ação conjunta de enzimas líticas e pressão interna sob os órgãos. No hospedeiro, o micélio externaliza e a conidiogênese é realizada na superfície do cadáver do artrópode, sendo os conídios dispersados no ambiente através de vetoração de insetos ou através do vento (SMALL; BIDOCHKA, 2005).

***Metarhizium* spp.**

Considerado um dos fungos mais patogênicos para insetos por causar a doença muscardine verde (LOVETT; ST LEGER, 2015), o gênero *Metarhizium* foi descrito em 1883 por Nikolay Vasilevich Sorokin, embora os primeiros relatos datem de 1879 com as observações feitas por Ilya Ilyich Metschnikoff. Por ser um fungo filamentosos, apresenta micélios septados e de coloração hialina que apresentam conidióforos alongados e conídios cilíndricos de coloração esverdeada, medindo entre 3 e 18 µm de comprimento e dispostos a partir de fiáldes cilíndricas. Durante o crescimento vegetativo, as colônias apresentam coloração branca, que evolui para amarela nas fases iniciais de desenvolvimento e esverdeado ou amarronzado durante a produção conidial (BISCHOFF et al., 2009).

Pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Clavicipitaceae (NCBI, 2018), o gênero *Metarhizium* passou por importantes revisões taxonômicas nas últimas décadas. De maneira inovadora, Bischoff et al. (2009), por meio de análises associadas de morfologia e filogenia molecular, propuseram que o gene *nuclear ribosomal internal transcribed spacer region* (ITS), anteriormente utilizado para identificação de *Metarhizium* era ineficaz e sugeriram que uma abordagem multigênica com os genes *translation elongation factor 1-alpha* (TEF-1α), *RNA polymerase II largest subunit* (RPB1), *RNA polymerase second largest subunit* (RPB2) e *β-tubulin* (Bt) fosse mais apropriada. Após as análises, os autores concluíram que *M. anisopliae* é formado por um complexo de nove espécies: *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. brunneum*, *M. majus*, *M. lepidiotae*, *M. acridum*, *M. globosum* e *M. guizhouense*. Além disto, foi sugerido que os isolados ainda não caracterizados segundo essa metodologia deviam ser nomeados de *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.). Atualmente, após as investigações de Kepler et al. (2014) que indicaram a unificação das formas sexuadas (*Metacordyceps*) e assexuadas ao complexo e Lopes et al. (2018), que descreveram a nova espécie *M. alvesii* em homenagem aos estudos de Sérgio Batista Alves, um dos fundadores do estudo da patologia de insetos no Brasil, o complexo conta com 11 espécies oficialmente reconhecidas.

Metarhizium anisopliae s.l. é difundidamente encontrado em diferentes nichos ecológicos, no qual registram espécies que infectam desde agentes específicos, como *M. acridum* colonizando alguns insetos ortópteros, até mesmo generalistas, como *M. anisopliae*, *M. brunneum* e *M. robertsii*, que colonizam tanto artrópodes quanto plantas (HU et al., 2014). Sobre a atividade endofítica, estudos recentes relacionam a capacidade de *M. robertsii* em atuar de forma simbiote com plantas, no qual a capacidade em transferir nitrogênio a partir do micélio fúngico para o sistema radicular de plantas (BEHIE et al., 2012) é contrabalanceada com a translocação de carbono a partir da raiz (BEHIE et al., 2017).

De uso consolidado para pragas agrícolas, diversos estudos têm sido realizados testando sua eficácia para carrapatos: *R. sanguineus*, *Dermacentor nittens*, *Amblyomma sculptum* (= *A. cajennense* s.l.) (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008), *Ixodes scapularis* (HORNBOSTEL et al., 2004), *R. appendiculatus*, *A. variegatum* (KAAYA et al., 1996), *A. maculatum* e *A. americanum* (KIRKLAND et al., 2004). Para *R. microplus*, todos os estágios de vida têm

demonstrado sensibilidade à infecção fúngica por *M. anisopliae* s.l. (ALONSO-DÍAZ et al., 2007; LEEMON; JOHNSON, 2008), incluindo a possibilidade de associações com produtos químicos (BAHIENSE et al., 2008) e testes *in vivo* com produtos comerciais e isolados potencialmente mais virulentos (WEBSTER et al., 2015; CAMARGO et al., 2016).

***Beauveria* spp.**

Assim como *Metarhizium*, este gênero fúngico é difundidamente utilizado no controle de pragas agrícolas e patogênico para diversos artrópodes. De maneira geral, pode ser isolado de solo, rizosfera de plantas e cadáveres de artrópodes (ZIMMERMANN, 2007 b). Os primeiros relatos de ocorrência datam de 1835 por Agostino Bassi; entretanto, a descrição oficial foi realizada no mesmo ano por Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli, o qual renomeou a espécie de *Botrytis bassiana* como uma homenagem aos estudos de Bassi sobre o agente. Em 1912, Vuillemin realizou a inclusão do gênero *Botrytis* ao gênero *Beauveria*, passando a espécie a ser reconhecida como *Beauveria bassiana* (REHNER, 2005). Durante o crescimento vegetativo, as colônias apresentam coloração inicial esbranquiçada, podendo variar até branco-amarelada na fase reprodutiva. Na microscopia de luz convencional, apresenta hifas septadas, hialinas e de parede lisa, com conídios aglomerados de formato ovoide e conidióforo de formato piriforme e tamanho entre 1 e 3 μm (FERNANDES et al., 2006; REHNER et al., 2011).

Por se tratar de um grupo de espécies polifiléticas, importantes reavaliações morfológicas e moleculares têm sido propostas para *Beauveria bassiana* s.l. . Pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Clavicipitaceae (NCBI, 2018), o marco da reorganização do gênero foi conduzido por um estudo que realizou a reclassificação de diversos isolados anteriormente caracterizados como *B. bassiana* ou *B. brongniartii*. Devido à complexidade de descrição e à presença de diversas espécies-tipo, além de marcante correlação filogenética com a forma teleomórfica (sexuada) *Cordyceps*, análises multilocus dos genes RPB 1, RPB 2, TEF-1 α e Bloc (região intergênica nuclear), possibilitaram a descrição de seis novas espécies: *B. varroae*, *B. kipukae*, *B. pseudobassiana*, *B. asiatica*, *B. australis* e *B. sungii*, mantendo ainda as espécies *B. bassiana* e *B. brongniartii* com referências do gênero. Embora não proposto pelos autores, após esta publicação, diversos estudos têm adotado a nomenclatura de *Beauveria bassiana* s.l. para isolados que ainda não tenham sido caracterizados morfológica e geneticamente segundo as descrições de Rehner et al. (2011).

Beauveria bassiana s.l. apresenta capacidade endofítica em plantas, por vezes atuando como antagonista direto de fungos telúricos fitopatogênicos (OWNLEY et al., 2008). Com ação para diversas pragas da agricultura (ZIMMERMANN, 2007 b), sua atividade acaricida para diferentes espécies de carrapatos como *R. appendiculatus* (KAAYA et al., 1996), *A. sculptum* (= *A. cajennense* s.l.) (REIS et al., 2001; LOPES et al., 2007), *D. nitens* (MONTEIRO et al., 2003), *R. sanguineus*, *D. variabilis* e *I. scapularis* (KIRKLAND et al., 2004) já foram endossados na literatura. Para *R. microplus*, os estudos têm sido mais amplos (BARCI et al., 2009; FERNANDES et al., 2011; SUN et al., 2013; COUTINHO-RODRIGUES et al., 2016; FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2018), incluindo testes com produtos comerciais (PERINOTTO et al., 2012) e aplicações a campo (CAMPOS et al., 2010).

Atuais perspectivas no uso de fungos artropodopatogênicos para carrapatos

Na agricultura, o uso em larga escala de micro-organismos patogênicos para artrópodes é difundido em diversos países do mundo, dispondo de uma variedade de isolados fúngicos que são encontrados em diversas formulações (FARIA; WRAIGHT, 2007). No entanto, as

condições ambientais podem modular a eficácia fúngica. Para carrapatos, sabe-se que altas concentrações fúngicas são necessárias para garantir o sucesso do controle biológico quando comparados a outros artrópodes, em especial pragas agrícolas (FERNANDES, BITTENCOURT; 2008). Como opção, a formulação é vista como uma tecnologia promissora na melhoria da atuação, especialmente em condições ambientais (FERNANDES et al., 2012). De forma pioneira, Souza et al. (2009) desenvolveram uma associação de matriz de gel polimerizado a conídios de *B. bassiana* para o controle de *D. nitens* a campo. No entanto, para *R. microplus*, os avanços tendem a ser mais desafiadores. Conhecido pela ação fotoprotetora e anti-evaporante (SILVA, A. et al., 2005), a adição de óleo à suspensão de conídios de *M. anisopliae* em laboratório tem demonstrado ser satisfatória (KAAYA et al., 2011; CAMARGO et al., 2012) no controle de carrapatos, em especial quando testados em estábulo (CAMARGO et al., 2014) e a campo (CAMARGO et al., 2016). Por apresentar cerca de 95% de sua população total no ambiente e não sob o animal, o tratamento das pastagens pode se tornar uma medida eficaz. Por caracterizar-se como um ambiente de alta umidade, moderada temperatura e sombreado (proteção contra a radiação solar), uma patente de formulação multiparticular atualmente está depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial que consiste em espalhar grânulos fúngicos – microescleródios de *M. anisopliae* – na base das pastagens a fim de infectar as fêmeas ingurgitadas que se desprendem do animal e realizam postura no solo (MASCARIN et al., 2018).

Embora de forma gradual na agropecuária, o controle biológico tem figurado como uma alternativa viável, principalmente por ser um produto seguro, com riscos muito baixos a vertebrados, humanos e ao meio ambiente (ZIMMERMANN, 2007 a). Em novos prospectos, estudos que envolvam a associação de análises bioquímicas e moleculares com testes de eficácia podem elucidar lacunas pertinentes à redução da virulência e relacionar as mesmas com respostas proteicas e enzimáticas apresentadas durante a infecção (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; ST LEGER et al., 2011; BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

Fatores moduladores do biocontrole de pragas

Tanto para testes *in vitro* quanto para aplicações *in vivo*, fatores bióticos e abióticos têm induzido ao estresse celular e são frequentemente apontados como moduladores da patogenicidade fúngica. Contudo, diretrizes atuais afirmam que o estresse fúngico, em especial para *Metarhizium* spp., é uma condição essencial para sua manutenção no ambiente. Assim, o interesse na investigação dos efeitos da temperatura, privação nutricional, estresse oxidativo, tempo de vida da colônia, osmolaridade e radiação UV sobre o desenvolvimento fúngico têm crescido exponencialmente em estudos recentes (LOVETT; ST LEGER, 2015; ZHANG; FENG, 2018), e de forma complementar, estudos da proteômica fúngica sob diferentes condições, têm auxiliado no entendimento de vias metabólicas relacionadas ao estresse (BEYS-DA-SILVA et al., 2014; JIRAKKAKUL et al., 2018).

Muito utilizados no crescimento rápido de micro-organismos, o uso de meios de cultura sintéticos é amplamente difundido, sendo de fácil elaboração e viável para diversas espécies fúngicas. No entanto, meios como batata-dextrose-ágar (BDA) e Sabouraud-dextrose-ágar (SDA), apesar de ricos em fontes carbonadas - o que contribuem positivamente para o metabolismo energético e desenvolvimento - induzem ao aumento da produção conidial devido à privação de nitrogênio (KAMP; BIDOCHKA, 2002). Com efeitos na eficácia, St Leger et al. (1989) demonstram que, em condições experimentais, a produção de apressório durante a infecção para o isolado ARSEF 2575 de *M. robertsii* é modulada por baixos índices de nitrogênio, possibilitando o fungo obter tais nutrientes a partir de ação enzimática sobre o hospedeiro. Também, sabe-se que a constante manipulação de isolados para manutenção em laboratório influencia a eficácia fúngica. Repiques sucessivos de uma colônia foram capazes de

reduzir a adesão, hidrofobicidade, atividade proteolítica específica (Pr1) e virulência de isolados de *M. anisopliae* a partir do primeiro ciclo de crescimento em meio SDA (SHAH et al., 2007). De forma difundida para *B. bassiana* (JIRAKKAKUL et al., 2018), o real efeito do subcultivo na secreção proteica de *Metarhizium* spp. ainda é pouco explorado.

Radicais oxidantes produzidos pelos fungos também possuem importante papel nos possíveis ganhos/danos à estrutura celular. O estresse oxidativo se caracteriza pela ação de enzimas hidrolíticas que atuam detoxificando as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante o metabolismo celular (LOVETT; ST LEGER, 2015). Estudos prévios já detectaram enzimas antioxidantes na superfície conidial de *M. anisopliae* e *B. bassiana* e relacionaram sua presença com a tolerância tanto à UV quanto temperatura (SANTI et al., 2010 a; ALI et al., 2012; WANG et al., 2013). Assim, é visto que a expressão de genes envolvidos com a oxidação intracelular realizada pelas EROs além de modular positivamente a resistência, também tem contribuído substancialmente à virulência (HERNANDEZ et al., 2010; LI et al., 2017, ZHANG; FENG, 2018).

Estudos enzimáticos com fungos artropodopatogênicos

A atuação de enzimas fúngicas, seja de origem conidial ou secretadas durante a infecção, exerce importante papel na proteção e na manutenção da patogenicidade de fungos artropodopatogênicos. No ambiente, os conídios são responsáveis pela dispersão e pela tolerância aos fatores abióticos, além de aderirem e germinarem na superfície cuticular (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Diversas enzimas oxidativas como catalase, superóxido desmutase (SOD) e peroxidase, além de enzimas hidrolíticas como proteases, lipases, esterases, trealase e quitinases, já foram identificadas na superfície conidial de *M. anisopliae* (SANTI et al., 2010 a). Estudos demonstram que a superexpressão de *cat1* em conídios de *M. anisopliae*, gene que codifica uma catalase, aumentou a tolerância do isolado ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exógeno, reduziu o tempo de germinação e melhorou a virulência para *Plutella xylostella*, conhecida como traça-das-crucíferas (HERNANDEZ et al., 2010). Em *M. acridum*, quando a expressão de uma enzima bifuncional (catalase-peroxidase) foi silenciada, uma redução da atividade antioxidante de ambas as enzimas *in vitro* foi observada, bem como um aumento da sensibilidade à radiação UV-B e a agentes oxidantes como menadiona e H₂O₂ (LI et al., 2017).

Ainda em conídios, a presença de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e ectofosfatases já foram descritas influenciando a adesão, seja participando da liberação de energia ou na regulação de repostas intra e extracelulares (BROETTO et al., 2010; COSENTINO-GOMES et al., 2013). Com ação importantes nas fases de penetração cuticular, proteases como Pr1 e Pr2 são amplamente estudadas e fortemente relacionadas como marcadores de virulência para insetos (SHAH et al., 2007; SONG; FENG, 2011). Para carrapatos, outro grupo de importância são as lipases, no qual exercem uma função essencial durante as primeiras fases da colonização. Beys-da-Silva et al. (2010) caracterizaram lipases da superfície conidial de *M. anisopliae*, e após utilizarem um inibidor de atividade lipásica - Ebelactona B - os conídios perderam a capacidade de penetrar ativamente através da cutícula, inibindo por completo a virulência contra *R. microplus*. Atuando no auxílio da hidrólise de quitinas cuticulares, um estudo demonstrou também a presença e atividade de uma endo/exoquitinase (CHIT 30) e relacionou sua ocorrência como um importante marcador da patogenicidade para o carrapato dos bovinos (SILVA, M. et al., 2005).

Micélios são formas propagativas oriundas do crescimento vegetativo que desempenham funções como prover nutrientes para o desenvolvimento fúngico, tanto no ambiente quanto na hemocele do hospedeiro, e contribuem para formação de novos conídios (WANG et al., 2018). De maneira geral, durante a penetração cuticular, enzimas hidrolíticas

(Pr1, Pr2 e lipases) são consideradas imprescindíveis para a internalização do fungo na hemocele. Tida como possível fator de virulência, Perinotto et al. (2013), ao analisarem a atividade de Pr1 em isolados de *M. anisopliae* crescidos em diferentes tempos de cultivo, observaram que os isolados que possuíam maior atividade enzimática eram os mesmos que foram mais virulentos para *R. microplus*. No entanto em insetos, esse comportamento não segue como regra para todos os isolados de fungos artropodopatogênicos, em especial para *B. bassiana* (ROSAS-GARCÍA et al., 2014). Coutinho-Rodrigues et al. (2016) ao avaliarem dez isolados brasileiros de *B. bassiana* no controle de carrapatos, não observaram relação em atividade de Pr1 e virulência para *R. microplus*. Além das proteases, outras enzimas como lipases e quitinases, obtidas a partir da secreção micelial, também estão associadas à virulência para carrapatos. Perinotto et al. (2014) ao avaliarem lipases e quitinases a partir da secreção micelial em meio de cultivo líquido suplementado com cutícula de *R. microplus*, demonstraram que os isolados mais virulentos foram aqueles que apresentaram resultados mais expressivos em até 72 h pós-inoculação.

Estudos proteômicos com fungos artropodopatogênicos

A nomenclatura do termo “proteoma” ou “proteômica” foi descrita pela primeira vez em 1995 na tentativa de relacionar as bases moleculares detectadas em amostras de organismos vivos com a identificação de proteínas. É definido pela caracterização em larga escala de todas as proteínas expressadas em uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento (WILKINS et al. 1995). Dependendo da técnica empregada, além de identificar, as proteínas detectadas podem ser quantificadas e modificações pós-transducionais podem ser determinadas (HEIN et al., 2013). Na taxonomia de isolados fúngicos, análises moleculares são essenciais para detectar genes e classificar os organismos dentro de um clado de espécies. Porém, a execução pode ser considerada dispendiosa, além de necessitar que mais de um gene seja caracterizado para garantir sua eficácia (BISCHOFF et al., 2009; REHNER et al., 2011). Como alternativa, o uso da proteômica pode funcionar como ferramenta útil no diagnóstico. Um estudo demonstrou utilizar de forma satisfatória a técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS) para a identificação de 6 espécies de *Metarhizium* pertencentes ao complexo *M. anisopliae* s.l. em comparação à detecção através do gene TEF-1 α . Deste modo, o conhecimento do perfil de proteínas de diferentes isolados pode auxiliar à identificação molecular tradicional, sendo inclusive sugerido a utilização na caracterização taxonômica de isolados mantidos em coleções (LOPES et al., 2014). No mesmo contexto, MALDI-TOF apresentou alta relação de eficiência na identificação de isolados de *B. bassiana* e *B. pseudobassiana*, quando confrontado com a caracterização realizada através do gene ITS (HRICÁKOVÁ et al., 2018).

No gênero *Metarhizium*, diferentes espécies passaram por caracterizações proteômicas. Usando gel bidimensional (2DE) seguido por MALDI-TOF/MS, Barros et al. (2010) detectaram um número similar de proteínas em conídios e micélios de *M. acridum*, entretanto, somente 35% das proteínas foram encontradas em ambos os propágulos. Em conídios, proteínas exclusivas relacionadas à proteção contra o estresse, como as *heat shock proteins* (HSP), e 6-fosfogluconato desidrogenase foram as mais abundantes; já em micélio, proteínas que participam da manutenção dos processos biológicos, como tubulina e citrato sintase, além de HSP 70 e 90, foram majoritariamente detectadas. Para *M. anisopliae*, Su et al. (2013), utilizando das mesmas técnicas, além de identificarem um número inferior de proteínas conidiais em relação às proteínas miceliais, observaram similaridade de apenas 28% entre os *spots* encontrados. Envolvidos na propagação, proteção e na infecção em hospedeiros, proteínas como HSP 90 e serinoproteínas vacuolares, foram exclusivamente identificadas em conídios; já em micélio, proteínas que demarcam alta atividade metabólica celular como NADPH-

glutamato desidrogenase, catalase, homoserina e piruvato desidrogenases foram exclusivamente caracterizadas. Recentemente, com resultados mais robustos em relação à identificação de proteínas, Wang et al. (2018), utilizando a tecnologia de marcações isobáricas para quantificações relativas e absolutas (iTRAQ) em conídios e micélios de *M. robertsii*, detectaram cerca de 2.052 proteínas, sendo 90 diferencialmente expressas em cada um dos propágulos. Novamente, vias de proteção e respostas ao estresse foram detectadas em conídios, enquanto em micélios, atividades energéticas e proliferativas teciduais foram as mais abundantes.

Por outra ótica, estudos de proteínas secretadas auxiliam no entendimento da interação fungo-hospedeiro. Em *M. anisopliae*, estudos avaliando o secretoma têm sido amplamente discutidos, no qual contribuem muito para a identificação de proteínas que controlam e participam da infecção (MANALIL et al., 2010; BEYS-DA-SILVA et al., 2014; RUSTIGUEL et al., 2016). Para *R. microplus*, Santi et al. (2010 b) observaram que a presença de cutícula de artrópodes em potencial induzia a secreção de enzimas relacionadas com o processo de infecção, como proteases (tripsinas, subtilisinas Pr1A, Pr1I e PR1J) e quitinases. Quando comparados meios contendo cutícula do inseto manchador do algodão, *Dysdercus peruvianus*, e glicose em meio líquido de crescimento, Beys-da Silva (2014) identificaram, em ambas as condições, diversas proteínas como enzimas lipolíticas, proteases Pr1 (A, B, C, I e J), enzimas oxidativas e oxirredutases, amplamente envolvidas com a infecção no hospedeiro.

Com isso, tornam-se relevantes estudos como o da presente tese que elucidem o efeito do estresse fúngico a partir do subcultivo sucessivo de isolados em laboratório ou mesmo através do uso de agentes oxidantes no desenvolvimento, eficácia, atividade enzimática e secreção proteica de *Metarhizium* spp. . Embora de grande importância, ainda são escassas as investigações que avaliam o secretoma em infecções de *B. bassiana* para carrapatos, e crescimento *in vitro* em meio de cultivo acrescido de cutícula de *R. microplus* pode esclarecer dúvidas relacionadas particularmente às fases iniciais da infecção, contribuindo para a seleção de novos alvos de estudo e imprimindo melhorias para biocontrole deste tipo de hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S.; XIA, J.; REN, S.; HUANG, Z. Catalase production influences germination, stress tolerance and virulence of *Beauveria bassiana* conidia. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 44, p. 537-544, 2012.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; GARCÍA, L.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ANGEL-SAHAGÚN, C. A.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 336-340, 2007.

ALVES, S. B.; LOPES, R.B. **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios**. São Paulo: Editora FAELQ, 2008. 414p.

BAHIENSE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Performance of *Metarhizium anisopliae* and its combination with Deltamethrin against a pyrethroid-resistant strain of *Boophilus microplus* in a stall test. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, p. 242–245, 2008.

BARCI, L. A. G.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. C. ZAPPELINI, L. O.; PRADO, A. P. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes:

Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 7-13, 2009.

BARROS, B. H.; SILVA, S. H.; MARQUES, E. R.; ROSA, J. C.; YATUSDA, A. P.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **Fungal Biology**, v. 114, p.572-579, 2010.

BARROS-BATESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, H. G. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação das espécies. 1 ed., São Paulo, SP: Butantã, 2006, 223p.

BARRÉ, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 29, p. 149-160, 2010.

BEHIE, S. W.; MOREIRA, C. C.; SEMENTCHOUKOVA, I.; BARELLI, L.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. **Nature Communication**, v.8, p.14245, 2017.

BEHIE, S. W.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, v. 336, p. 1576-1557, 2012.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **Fungal Biology**, v. 114, p.10-15, 2010.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; CALZOLARI, D.; PASSOS, D. O.; GUIMARÃES, J. A.; MORESCO, J. J.; YATES, J. R. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. **Journal of Proteome Research (Print)**, v. 13, p. 2282-2296, 2014.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, p. 512-530, 2009.

BROETTO, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; BAILÃO, A. M; DE ALMEIDA, S. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: cell-surface localization and role in host adhesion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 312, p. 101–109, 2010.

CAMARGO, M. G.; NOGUEIRA, M. R.S.; MARCIANO, A. F.; PERINOTTO, W. M.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; SCOTT, F. B.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C.A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**. v. 223, p. 38-42, 2016.

CAMARGO, M.G.; MARCIANO, A.F.; SÁ, F.A.; PERINOTTO, W.M.S.; QUINELATO, S.; GÔLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 271–276, 2014.

CAMARGO, M. G.; GÔLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic

fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140-147, 2012.

CAMPOS, R. A.; BOLDO, J. T.; PIMENTEL, I. C.; DALFOVO, V.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; VAINSTEIN, M. H.; BARROS, N. M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* spp. to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1421–1430, 2010.

COSENTINO-GOMES, D.; ROCCO-MACHADO, N.; SANTI, L.; BROETTO, L.; VAINSTEIN, M.H.; MEYER-FERNANDES, J.R.; SCHRANK, A.; BEYS-DA-SILVA, W.O. Inhibition of ecto-phosphatase activity in conidia reduces adhesion and virulence of *Metarhizium anisopliae* on the host insect *Dysdercus peruvianus*. **Current Microbiology**, v. 66, p. 1-8, 2013.

COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; PERINOTTO, W. M. S.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F. A.; NOGUEIRA, M. R. S.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence, proteolytic and lipolytic activities of Brazilian *Beauveria bassiana* s.l. isolates (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Rhipicephalus microplus* ticks (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, p. 239–249, 2016.

FANG, W.; PEI, Y.; BIDOCHKA, M. J. A regulator of a G protein signaling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. **Microbiology**, v. 153, p.1017-1025, 2007.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.

FARIA, P. **Biocontrol in Brazil: opportunities and challenges (2017) - AgroPages: Biopesticide Supplement**. Disponível em: <<http://www.agropages.com/magazine/detail-8-179.html>>. Acesso em: 09 jun. 2018.

FERNANDES, E. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 300-305, 2012.

FERNANDES, É. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E. N.; BAHIENSE, T. C.; MORAES, A. M. L.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. E. P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307-318, 2011.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 46, p.71-93, 2008.

FERNANDES, É. K. K.; COSTA, G. L.; MORAES, A. M. L.; ZAHNER, V.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. **Parasitology Research**, v.98, p.324-332, 2006.

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; ALONSO-DÍAZ, M. Á.; MORALES, R. A. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; CERVANTES-CHÁVEZ, J. A. Phylogenetic relationships and acaricidal effects of *Beauveria bassiana* obtained from cattle farm soils against *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Parasitology**, v. 104, p. 275-282, 2018.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potencial economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150-156, 2014.

HEIN, M. Y.; SHARMA, K.; COX, J.; MANN, M. Chapter 1 - Proteomic Analysis of Cellular Systems. In: WALHOUT, M.; M. VIDAL, M.; DEKKER, J. **Handbook of Systems Biology**. San Diego: Academic Press, 2013. p.3-25.

HERNANDEZ, C. E. M.; GUERRERO, I. E. P.; HERNANDEZ, G. A. G.; SOLIS, E. S.; GUZMAN, J. C. T. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1033–1044, 2010.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, p. 163–171, 2016.

HORN, S. C.; ARTECHE, C. C. P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 4, p. 12-32, 1985.

HORNBOSTEL, V. L.; OSTFELD, R. S.; ZHIOUA, E.; BENJAMIN, M. A. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) on engorged larval, nymphal, and adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 922-929, 2004.

HRICÁKOVÁ, N.; MEDO, J.; HLEBA, L.; BARTA, M.; MAKOVÁ, J. Use of MALDI-TOF mass spectrometry in rapid identification of *Beauveria bassiana* and *Beauveria pseudobassiana*. **Journal of Central European Agriculture**, v. 19, p.394-407, 2018.

HU, X.; XIAO, G.; ZHENG, P.; SHANG, Y.; SU, Y.; ZHANG, X.; LIU, X.; ZHAN, S.; ST LEGER, R. J.; WANG, C. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host 530 adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 111, p. 16796-16801, 2014.

ITIS. *Rhipicephalus microplus*. Disponível em: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=82767#null>. Acesso em: 21 jun. 2018.

JIRAKKAKUL, J.; ROYTRAKUL, S.; SRISUKSAM, C.; SWANGMANEECHARERN, R.; KITTISENACHAI, S.; JARESITTHIKUNCHAI, J.; PUNYA, J.; PROMMEENATE, P.; SENACHAK, J.; SO, L.; TACHALEAT, A.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S.; WATTANACHAISAEEREEKUL, S.; AMNUAYKANJANASIN, A. Culture degeneration in conidia of *Beauveria bassiana* and virulence determinants by proteomics. **Fungal Biology**, v. 122, p. 156-171, 2018.

KAAYA, G. P.; SAMISH, M.; HEDIMBI, M.; GINDIN, G.; GLAZER, I. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle under field conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 55, p. 273-281, 2011.

KAAYA, G. P.; MWANGI, E. N.; OUNA, E. A. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi

Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, p. 15-20, 1996.

KAMP, A. M.; BIDOCHKA, M. J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 74–77, 2002.

KEPLER, R. M.; HUMBER, R. A.; BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, p. 811–829, 2014.

KRIEGER, M. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, v. 46, p. 205-210, 2003.

KIRKLAND, B. H.; CHO, E.; KEYHANI, N. O. Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, p. 414- 421, 2004.

KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; AGNOL, B. D.; PRADEL, E.; SILVA, J.; DE LA CANAL, L. H.; BECKER, M.; OSÓRIO, M. F.; MANSSON, M.; BARRETO, R.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; DOS SANTOS, J.; RECK, J.; MARTINS, J. R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 73–80, 2016.

LABRUNA, M. B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A.A.; JONGEJAN, F.; DE LA FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, p. 46, 2009.

LANZA, L. M.; MONTEIRO, A. C.; MALHEIROS, E. B. Sensibilidade de *Metarhizium anisopliae* à temperatura e umidade em três tipos de solos. **Ciência Rural**, v. 39, p. 6-12, 2009.

LEEMON, D. M.; JONSSON, N. N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 40-49, 2008.

LI, G; FAN, A.; PENG, G.O.N.K. XIN, J; CAO, Y.; XIA, Y. A bifunctional catalase-peroxidase, MakatG1, contributes to virulence of *Metarhizium acridum* by overcoming oxidative stress on the host insect cuticle. **Environmental Microbiology**, v. 19, p. 4365–4378, 2017.

LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; P'REZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, p. 27-31, 2007.

LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; ROCHA, L. F. N., MONTALVA, C.; LUZ, C.; HUMBER, R. A.; FARIA, M. *Metarhizium alvesii* sp. nov.: A new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 151, p. 165-168, 2018.

LOPES, R. B.; FARIA, M.; SOUZA, D. A.; BLOCH, C.; SILVA, L. P.; HUMBER, R. A. MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. **Mycologia**, v.106, p. 865-878, 2014.

LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. **Current Genetics**, v. 261, p. 253–261, 2014.

MANALIL, N. S.; JUNIOR TÉO, V. S.; BRAITHWAITE, K.; BRUMBLEY, S.; SAMSON, P.; HELENA NEVALAINEN, K. M. Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles. **Fungal Biology**, v.114, p. 637-645, 2010.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA I, J. R.; FERNANDES, É. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, PII S0022-2011: 30365–30368, 2018.

MONTEIRO, S. G.; BAHIENSE, T. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nittens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v. 33, p. 559-563, 2003.

MORALES-HERNANDEZ, C. E.; GUERRERO, I. E. P.; HERNANDEZ, G. A. G.; SOLIS, E. S.; GUZMAN, J. C. T. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1033–1044, 2010.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Crutice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169-172, 2003.

NAHAR, P. B.; KULKARNI, S. A.; KULYE, M. S.; CHAVAN, S. B.; KULKARNI, G.; RAJENDRAN, A.; YADAV, P. D.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Effect of repeated *in vitro* subculturing on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, p. 337-355, 2008.

NCBI. **Beauveria bassiana taxonomy.**
Disponível:<http://eol.org/pages/160292/hierarchy_entries/57335071/overview>. Acesso em: 09. jun. 2018.

NCBI. **Metarhizium anisopliae taxonomy.**
Disponível:<http://eol.org/pages/992622/hierarchy_entries/51004049/overview>. Acesso em: 08. jun. 2018.

OWNLEY, B. H.; GRIFFIN, M. R.; KLINGEMAN, W. E.; GWINN, K. D.; MOULTON, J. K.; PEREIRA, R. M. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 267-270, 2008.

PERINOTTO, W. M. S.; GÔLO, P. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; SÁ, F. A.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A.; SALLES, C. M. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 189-196, 2014.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; SALLES, C. M. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: molecular marker of fungal

virulence in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, p. 123-132, 2013.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GÓLO, P. S.; CAMARGO, M. G.; SÁ, F. A.; MONTEIRO, C. M. O.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; QUINELATO, S.; MARCIANO, A. F.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Eficiência de uma formulação comercial de *Beauveria bassiana* no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições laboratoriais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, p. 95-101, 2012.

REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBER, R. A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, p. 1055-1073, 2011.

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, p. 84-98, 2005.

REIS, R. C. S.; MELO, D. R.; SOUZA, E. J. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 544-547, 2001.

ROBERTS, D. W.; ST. LEGER, R. J. *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. **Advances in Applied Microbiology**, v. 54, p. 1-70, 2004.

ROSAS-GARCÍA, N. M.; ÁVALOS-DE-LEÓN, O.; VILLEGAS-MENDOZA, J. M.; MIRELES-MARTÍNEZ, M.; BARBOZA-CORONA, J. E.; CASTAÑEDA-RAMÍREZ, J. C. Correlation between pr1 and pr2 gene content and virulence in *Metarhizium anisopliae* strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1495-1502, 2014.

RUSTIGUEL, C. B.; ROSA, J. C.; JORGE, J. A.; DE OLIVEIRA, A. H.; GUIMARÃES, L. H. Secretome analysis of *Metarhizium anisopliae* under submerged conditions using *Bombyx mori* chrysalis to induce expression of virulence-related proteins. **Current Microbiology**, v. 72, p. 220-227, 2016.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 389-413, 2004.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J. A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae* s.l.: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874-880, 2010 a.

SANTI, L.; SILVA, W. O. B.; PINTO, A. F.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the interaction process of arthropods. **Fungal Biology**, v. 114, p. 312-319, 2010 b.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* s.l. enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, p. 1267-1274, 2010.

SHAH, F. A.; ALLEN, N.; WRIGHT, C. L.; BUTT, T. M. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, p.60-66, 2007.

SILVA, A. P. A. P.; ALVES, R. T.; LIMA, E. A. L. A.; LIMA, V. L. M. Bioformulations in Pest Control – A Review. **Annual Research & Review in Biology**, v. 5, p. 535-543, 2015.

SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 382-392, 2005.

SMALL, C. L.; BIDOCHKA, M. J. Up-regulation of Prl, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. **Mycology Research**, v. 109, p. 307-313, 2005.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of Ticks**. 2° ed. New York: Oxford University Press, 2014.

SONG, T. T.; FENG, M. G. *In vivo* passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, p. 211–216, 2011.

SOUZA, E. J.; COSTA, G. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; FAGUNDES, A. S. Action of the fungus *Beauveria bassiana* associated with cellulose polymerized gel in the control of the tick *Anocentor nitens* in a field test. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 61, 163–169, 2009.

ST LEGER, R. J.; WANG, A. C.; FANG, W. New perspectives on insect pathogens. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, p. 84-88, 2011.

ST LEGER, R. J.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 120, p.119–124, 1992.

ST LEGER, R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 168-179, 1991.

ST. LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v. 13, p. 274–288, 1989.

STAFFORD, K. C.; ALLAN, S. A. Field applications of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal Medical Entomology**, v.47, p. 1107-1115, 2010.

SUN, M.; REN, Q.; GUAN, G.; LI, Y.; HAN, X.; MA, C.; YIN, H.; LUO, J. Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. **Parasitology International**, v. 62, p. 412–415, 2013.

WANG C.; ST. LEGER, R. J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic Cell**, v. 6, p. 808–816, 2007.

WANG, Z.; ZHOU, Q.; LI, Y.; QIAO, L.; PANG, Q.; HUANG, B. ITRAQ-based quantitative proteomic analysis of conidia and mycelium in the filamentous fungus *Metarhizium robertsii*. **Fungal Biology**, v.122, p.651-658, 2018.

WANG, Z. L., ZHANG, L. B., YING, S. H., FENG, M. G. Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 409–418, 2013.

WANG, Q.; XU, L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. **Molecules**, v. 17, p. 2367-2377, 2012.

WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U. A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE, G. M.; BEYSDA-SILVA, W. O.; MARTINS, J. R.; SCHRANK, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 207, p.302–308, 2015.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and now to do it. **Biotechnology - Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.19-50, 1995.

ZHANG, L. B.; FENG, M. G. Antioxidant enzymes and their contributions to biological control potential of fungal insect pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 4995–5004, 2018.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 879-920, 2007 a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 553-596, 2007 b.

CAPÍTULO I

SUBCULTIVOS SUCESSIVOS DE *Metarhizium* spp. E SEU IMPACTO NA ATIVIDADE CARRAPATICIDA CONTRA *Rhipicephalus microplus*

RESUMO

O subcultivo contínuo de colônias de fungos artropodopatogênicos tem acarretado diversos danos ao longo dos anos ao biocontrole. O presente estudo reporta esses efeitos no controle *in vitro* de *Rhipicephalus microplus*, relacionando crescimento, produção conidial, atividade enzimática e virulência. Com ciclos de 15 dias de crescimento, isolados de *Metarhizium* spp. (ARSEF 552, ARSEF 1095 e ARSEF 2521) foram sucessivamente repicados em meio batata-dextrose-ágar e amostras foram obtidas do cultivo inicial (início) e após o décimo (10º ciclo) e vigésimo (20º ciclo) repiques. Alterações fenotípicas nas colônias, bem como redução do diâmetro médio de crescimento e diminuição da produção conidial foram evidenciadas somente ao 20º ciclo de repique para todos os isolados. No entanto, analisando enzimas conhecidamente relacionadas à virulência para *R. microplus* provenientes da superfície conidial e da secreção micelial, um decréscimo expressivo das atividades de Pr1, Pr2 e lipase foi marcado junto à redução da eficácia para fêmeas ingurgitadas, em especial ao isolado mais patogênico deste estudo (ARSEF 552). Para larvas, um atraso no percentual de mortalidade também pode ser observado após o 20º ciclo, bem como aumento da CL50. Assim, conclui-se que as consequências de repiques sucessivos são bastante individualizadas entre isolados fúngicos e que deve ser um fator de constante atenção nos estudos que visam a manutenção e a produção de fungos a serem aplicados no controle de carrapatos.

Palavras-chave: repiques contínuos; Pr1; lipase; carrapatos dos bovinos; virulência.

ABSTRACT

Successive subculturing of arthropodopathogenic fungi has resulted in several damages over the years. Here, for the first time, its effects to the *in vitro* *Rhipicephalus microplus* control was evaluated, based on fungi growth, conidiation, enzymatic activity and virulence. Three *Metarhizium* spp. isolates (ARSEF 552, ARSEF 1095 and ARSEF 2521) were consecutively plated in potato-dextrose-agar medium, and samples collected from the beginning (Initial) and after harvesting the tenth (10th cycle) and twentieth (20th cycle) growth. Phenotypic changes and reduction of diameters and conidia production were evidenced only on the 20th for all isolates. However, well-known enzymes activities (Pr1, Pr2 and lipase) related to *R. microplus* virulence on the conidial surface and mycelia secretion decreased significantly, as well as the efficacy upon engorged females, especially to the most effective isolate (ARSEF 552). In addition, a delay in larvae mortality percentage in 20th cycle was observed, which increased CL50. Therefore, the consequences of successive passages in artificial media are particular among isolates and should always be taken into account for researchers that apply *Metarhizium* spp. to tick control.

Key words: successive passages; Pr1; lipase; cattle tick; virulence.

1 INTRODUÇÃO

A economia do Brasil nas últimas décadas tem sido drasticamente afetada em função do hematofagismo realizado por *Rhipicephalus microplus* (GRISI et al., 2014). Nesse cenário, *Metarhizium*, um notório gênero fúngico patogênico para artrópodes, têm se destacado como promissor agente de controle de carrapatos. Os estudos atuais envolvendo o controle de *R. microplus* com fungos artropodopatogênicos têm enfatizado tanto testes *in vitro* e *in vivo*, uso de formulações a base de óleo mineral, testes de produtos registrados e já comercializados no mercado agrícola, bem como o desenvolvimento de patentes que visam reduzir os estágios não parasitários no ambiente (MASCARIN et al., 2018).

Entretanto, diversos são os fatores que ainda limitam sua aplicação de forma eficaz, especialmente a campo (FERNANDES et al., 2012). Com capacidade de desenvolvimento em diferentes tipos de meio de cultivo sintético, meios como batata-dextrose-ágar (BDA) e Sabouraud-dextrose-ágar (SDA) são comumente usados para cultivo de *Metarhizium* (KAMP; BIDOCHKA, 2002). Embora de fácil execução, não possuem grande seletividade de crescimento e problemas como o envelhecimento de colônias, setorização, reduções na adesão, hidrofobicidade e esporulação, além de queda da eficácia são reportados ao longo dos anos em função do subcultivo contínuo (WANG et al., 2005; SHAH et al., 2007; NAHAR et al., 2008; ANSARI; BUTT, 2011; SAFAVI, 2011; 2012; MOHAMMADBEIGI, 2013; SANTORO et al., 2014; THAOCHAN; CHANDRAPATYA, 2016).

O modo de infecção em ixodídeos é alvo de diversas pesquisas, em sua maioria visando a caracterização de fatores de virulência e de tolerância ao estresse ambiental que beneficiem a colonização. Em geral, o mecanismo de penetração ocorre de forma direta, a partir de uma associação de interações físicas e químicas sobre a cutícula. Além disto, a produção de enzimas permite a hidrólise dos diferentes componentes cuticulares presentes, garantindo assim a internalização fúngica (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Proteínas com ação quitinolítica, proteolítica e lipolítica, detectadas em conídios (SANTI et al., 2010 a) e micélio (BEYS-DA-SILVA et al., 2014), possuem importante contribuição para o processo de infecção de *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana*, sendo inclusive investigadas como possíveis contribuintes para a virulência em carrapatos (BEYS-DA-SILVA et al., 2010 a; SANTI et al., 2010 b; PERINOTTO et al., 2014; GÓLO et al., 2015; COUTINHO-RODRIGUES et al., 2016). Relatos demonstraram também que o subcultivo sucessivo de colônias foi capaz de modular a atividade de proteases como Pr1, um importante marcador de virulência para insetos (SHAH et al., 2005; SHAH et al., 2007; HUSSAIN et al., 2010).

O presente capítulo aborda o efeito do subcultivo sucessivo de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. e sua influência no desenvolvimento de colônias e produção conidial após ciclos sequenciais de repique em meio BDA. Além disso, atividades enzimáticas de proteases e lipase, tanto da superfície conidial quanto da secreção micelial, após crescimento em meio líquido foram caracterizadas e relacionadas com a virulência para os diferentes estádios de *R. microplus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados nas instalações do *Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico-Veterinária* (LCM) localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Neitz (EPPWON) do Departamento de Parasitologia

Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ e *Laboratório Multidisciplinar de Bioquímica e Biologia Molecular* da Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES), localizado em Lajeado – RS.

2.2. Obtenção e manutenção dos isolados

Os isolados de *Metarhizium* spp. utilizados no presente capítulo foram gentilmente doados pelo *Agriculture Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures – USA* (ARSEF) ao LCM da UFRRJ (**Tabela 1**).

Tabela 1- Isolados de *Metarhizium* spp., hospedeiro original de isolamento, origem geográfica do isolamento, espécie identificada e ano de isolamento.

| Isolado | Hospedeiro de Isolamento | Origem | Espécie | Ano de isolamento |
|------------|------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------------|
| ARSEF 552 | Lepidoptera | MG – Brasil | <i>Metarhizium pingshaense</i> | 1980 |
| ARSEF 1095 | [Lepidoptera: Olethreutidae] | Áustria | <i>Metarhizium brunneum</i> | 1984 |
| ARSEF 2521 | [Homoptera: Cercopidae] | PR – Brasil | <i>Metarhizium anisopliae</i> s.s.* | 1983 |

* Isolado com caracterização molecular concluída e em fase de divulgação científica (Bischoff et al., 2009)

Para a manutenção nas dependências do LCM, os isolados obtidos de coleções estavam mantidos liofilizados. Seguindo as recomendações de reativação, os líofilos foram ressuspensos e inicialmente repicados em meio batata-dextrose-ágar (BDA). Dentro da normalização das condições de experimentação, após 15 dias de crescimento, suspensões na concentração de 1×10^6 conídios/mL foram elaboradas para cada respectivo isolado e 5 μ L inoculadas em espécimes de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* com auxílio de agulha de insulina através de forame localizado entre o capítulo e parte anterior do escudo (ANGELO et al., 2014). Após crescimento e externalização das estruturas fúngicas, amostras de conídios foram coletadas da superfície do hospedeiro e repicadas em meio batata-dextrose-ágar (BDA), sendo as placas mantidas sob $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ por 15 dias (placas primárias).

2.2. Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos a partir das placas primárias descritas no tópico 2.1. A cada 15 dias, uma suspensão na concentração de 1×10^6 conídios/mL era elaborada em água acrescida de Tween 80[®] 0,1% e 10 μ L inoculados no centro de novas placas de meio BDA (n = 10) caracterizando assim um repique (um ciclo de crescimento). No total, foram realizados 20 ciclos ininterruptos e os conídios foram coletados no princípio (**Inicial**), após o décimo (**10º ciclo**) e vigésimo (**20º ciclo**) repiques.

2.3. Desenvolvimento das colônias e produção conidial

O desenvolvimento das colônias (variações fenotípicas) foi avaliado para os diferentes isolados e parâmetros como coloração, aparência, tipo de crescimento e aspecto foram avaliados nas diferentes colônias (Inicial, 10º e 20º ciclos). Além disso, o diâmetro de cada foi mensurado no 15º dia de crescimento com auxílio de calíper digital (StarFer[®]) de resolução de 0,01 mm.

Para a produção conidial, 3 *spots* de 7 mm de diâmetro (1,54 cm²) foram obtidos do centro, da região mediana e da borda de cada colônia, ao qual foram homogeneizados

vigorosamente em 10 mL de Tween 80[®] 0,1% por um minuto. Os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer (Kasvi[®]) ao microscópio de luz convencional e as concentrações finais ajustadas por área (conídios/cm²) (adaptado de FREGONESI et al., 2016).

Em ambas as análises (diâmetro de colônia e produção conidial), os experimentos foram repetidos três vezes e executados sempre em triplicata, sendo o teste *T* de Student aplicado para as diferenças entre os grupos ($p < 0,05$) com auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software[®]).

2.4. Extração das proteínas da superfície conidial

A coleta dos conídios foi realizada com auxílio de peneirador metálico (Bertel[®] Indústria Metalúrgica Ltda), sendo as placas vertidas para baixo, agitadas por um minuto, e os conídios coletados e posteriormente pesados. Parte foi preservada refrigerada para realização dos bioensaios e parte foi conduzida à fase de extração proteica. Para cada grama (1g) obtido, foram acrescidos 2,5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + Triton X-100 0,25%. A mistura foi homogeneizada vigorosamente por cinco minutos em vórtex (Kasvi[®]) e a fração líquida (proteínas da superfície conidial – **SC**) separada com o auxílio de centrifuga refrigerada (Hettich[®]) a $2716 \times g$ por três minutos e filtragem em coluna 0,22 μm (Sigma-Aldrich Millipore[®]) (SANTI et al., 2010 a).

2.5. Crescimento micelial e extração das proteínas da secreção micelial

Fêmeas obtidas a partir da infestação artificial de bezerros estabulados (Comitê de Ética/UFRRJ – nº 307/2014) foram previamente dissecadas com auxílio de tesoura castroviejo e pinça oftálmica (Brasmed[®]). As cutículas obtidas foram superficialmente esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio 0,05% por 15 minutos e triplamente rinsadas em água destilada estéril. Ao final do processo, as mesmas foram secas a 65°C por 50 minutos e armazenadas em freezer a -20°C até utilização.

Na avaliação da atividade enzimática a partir do secretado micelial, os isolados foram crescidos em 20 mL de meio mínimo líquido (NaNO₃ 0,6%; KH₂PO₄ 0,05% e MgSO₄ 0,05%) acrescido de 1% de cutícula de fêmeas de *R. microplus* e 1% de estereato de colesteril (Sigma-Aldrich Millipore[®]) (BEYS-DA-SILVA et al., 2010 a). Um mL de cada suspensão fúngica dos diferentes isolados fúngicos de *Metarhizium* foram inoculadas no meio e os frascos (triplicata) incubados em agitador orbital a 25°C e 150 rpm por 72 horas. A extração das proteínas secretadas (secreção micelial - **SM**) foi realizada segundo Silva et al. (2005) através de passagem por papel Whatman nº 1 (Sigma-Aldrich Millipore[®]) com auxílio de bomba de vácuo e filtragem em coluna de 0,22 μm .

2.6. Atividades enzimáticas

Substratos cromogênicos (Sigma-Aldrich Millipore[®]) na concentração de 1 mM foram utilizados para a determinação da atividade proteolítica geral (benzoyl-DL-arginina-pNA - BAPNA) e de serinoproteases dos tipos subtilisina (Suc-ala-ala-pro-phe-pNA - Pr1) e tripsina (Bz-phe-val-arg-pNA - Pr2) de SC e SM. Cinco microlitros de cada amostra foram adicionados junto ao substrato em 90 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 a 37°C durante 30 minutos e as cinéticas enzimáticas avaliadas em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices[®]) equipado com termostato e sistemas de agitação a 405 nm (SANTI et al., 2010 a). Uma unidade específica de protease (U/mg) foi definida como a quantidade de enzima que produz um μmol de p-nitroanilina por hora por mg de proteína nas condições de ensaio descritas.

A atividade lipolítica foi mensurada através da hidrólise do substrato cromogênico *p*-nitrofenol palmitato (*p*NPP) (Sigma-Aldrich®) segundo ensaio descrito por Beys-da-Silva et al. (2010 b). Para os experimentos, foram adicionados 10 µL de amostra e 90 µL de emulsão (*p*NPP em isopropanol, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, goma arábica e Triton X-100) em microplacas de 96 poços (TPP®). A leitura foi realizada em Spectramax a 410 nm e a cinética enzimática monitorada em um intervalo de 30 minutos a 37°C. A definição de uma unidade específica de lipase (U/mg) foi determinada como a quantidade necessária de enzima para liberar um µmol de *p*-nitrofenol por hora por mg de proteína nas condições supracitadas.

A quantidade de proteínas totais de cada amostra foi determinada utilizando o método do ácido bicinonínico (BCA – ThermoFisher Cientific®) a partir da albumina sérica bovina como padrão (SMITH et al., 1985).

Os ensaios enzimáticos (SC e SM) foram repetidos três vezes e executados sempre em triplicata, sendo a análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey aplicada para determinar as diferenças entre os grupos ($p < 0,05$) com auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software®).

2.7. Testes de virulência para *Rhipicephalus microplus*

2.7.1. Ensaios biológicos com fêmeas ingurgitadas

Fêmeas ingurgitadas foram lavadas em água corrente e higienizadas com solução de hipoclorito de sódio 0,05% por três minutos para a assepsia externa da cutícula. Na sequência, foram pesadas e distribuídas de forma homogênea em grupos de peso homogêneo contendo dez fêmeas cada. Cada fêmea foi individualmente identificada, pesada e numerada para a realização do tratamento (Inicial, 10° e 20° ciclos). O tratamento foi realizado a partir da imersão individual das fêmeas em um mL da suspensão fúngica (1×10^8 conídios/mL) ou água destilada estéril e Tween 80 0,01% (controle) por três minutos. Após o tempo de tratamento, foi retirado o excesso de suspensão, sendo cada fêmea fixada em decúbito dorsal nas placas de Petri contendo fita adesiva e mantidas em câmara climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$ para a observação dos parâmetros biológicos e determinação do percentual de controle (DRUMMOND et al., 1971; BENNETT, 1974). Diariamente, a postura de cada fêmea foi pesada e armazenada em frascos de vidro, mantidos sob as mesmas condições descritas acima, para a observação posterior da eclosão das larvas. Ao final do experimento, o peso residual de cada fêmea do grupo também foi determinado com auxílio de balança de precisão (COUTINHO-RODRIGUES et al., 2016).

Todo o experimento foi realizado três vezes, a partir de três placas individualizadas de cada subcultivo (Inicial, 10° ciclo e 20° ciclo), sendo que aos dados paramétricos foi aplicada a análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey e, para dados não-paramétricos, os testes de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) ($p < 0,05$) com auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software®).

2.7.2. Ensaios biológicos com larvas

A elaboração de suspensões com conídios do momento inicial e após o vigésimo ciclo de crescimento nas concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL, assim como os tratamentos seguiram prévias da literatura (QUINELATO et al., 2012). Cada grupo contendo 10 tubos com aproximadamente 1000 larvas (50 mg de ovos) recebeu a inoculação de 1 mL da respectiva suspensão; o mesmo foi realizado para o grupo controle, entretanto utilizando água destilada estéril e Tween 80 0,01%. As larvas foram submersas por três minutos, o excesso de suspensão retirado e o percentual de mortalidade estimado 5, 10 e 15 dias após tratamento.

O experimento foi repetido três vezes a partir de três placas individualizadas, sendo aplicados os testes de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) ($p < 0,05$) com auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software®). A concentração letal 50% (CL50) foi obtida através da análise de próbites ao final do experimento com o auxílio do programa POLO PC (Leora Software®).

3 RESULTADOS

3.1. Variações fenotípicas, crescimento e produção conidial

Discretas modificações fenotípicas foram observadas durante os ciclos de crescimento (Figura 1). As colônias do isolado ARSEF 552 (*M. pingshaense*), no início do experimento, possuíam coloração verde clara com pequena borda esbranquiçada, crescimento zonado, aspecto pulverulento e reverso amarelo claro. Após o 10º ciclo, mudanças na tonalidade para verde oliva foram evidenciadas; no entanto, ao 20º ciclo, reduções no tamanho, crescimento zonado pouco evidente e borda com micélio esbranquiçado de até 25 mm de espessura foram predominantes. ARSEF 1095 (*M. brunneum*), até o 10º ciclo, apresentou coloração amarelo amarronzado, crescimento zonado, aparência lisa e reverso marrom claro. Ao final dos ciclos, coloração amarronzada com micélio na borda de até 12 mm e zonas de crescimento pouco evidenciadas puderam ser observadas. Para ARSEF 2521 (*M. anisopliae*), colônias que iniciaram com coloração verde clara e bastante pulverulentas foram perdendo tais características e, ao 20º ciclo, cursaram com coloração verde amarelada, tamanho reduzido e borda com micélios de até 18 mm. Além disso, reduções significativas no diâmetro médio das colônias foram identificadas somente ao 20º ciclo, no qual isolados como ARSEF 552 e ARSEF 2521 foram aqueles que demonstraram os resultados mais expressivos ($p < 0,01$) em relação à condição inicial.

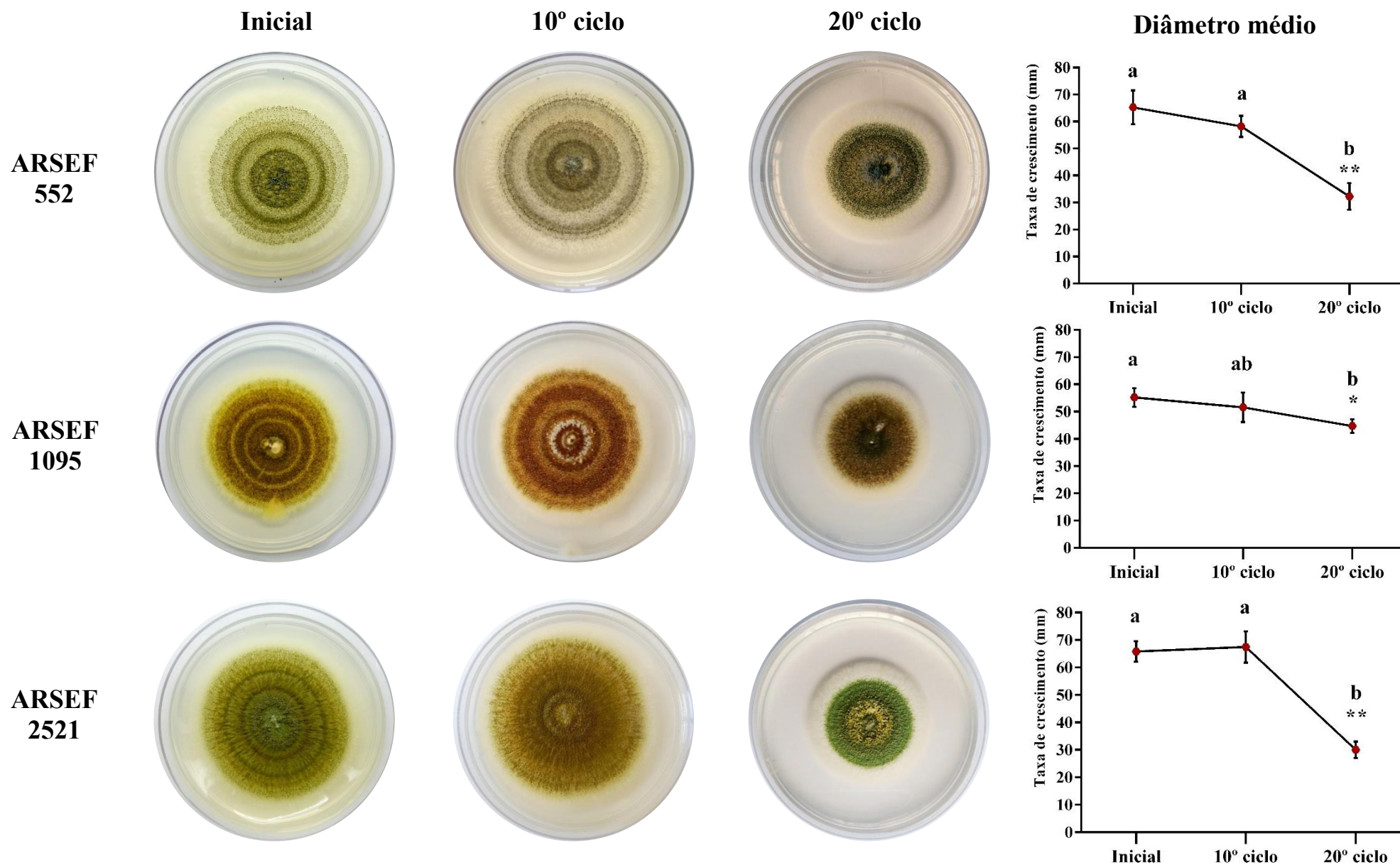


Figura 1 – Variações fenotípicas e diâmetro médio (mm) de *Metarhizium* spp. crescidos em meio batata-dextrose-ágar (BDA) após sucessivos 26 ciclos de repique contínuo com intervalos de 15 dias. Teste ANOVA seguido do teste de Tukey - * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

Já quanto à produção conidial, todos os isolados apresentaram perfil semelhante, produzindo entre 7×10^7 e 8×10^6 conídios/cm² durante todo o experimento; porém, reduções no número de propágulos produzidos foram somente observadas após o vigésimo ciclo de repique (Figura 2).

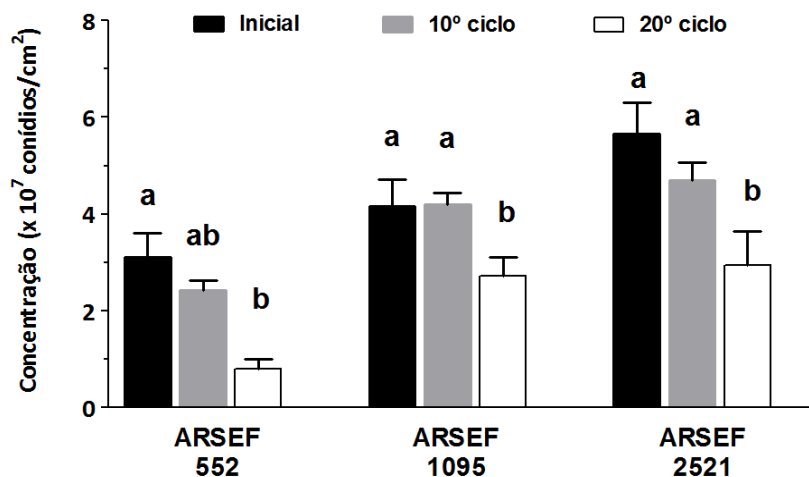


Figura 2 - Produção conidial (conídios/cm²) de *Metarhizium* spp. crescidos em meio BDA após sucessivos ciclos de repique contínuo com intervalos de 15 dias. Letras iguais para o mesmo isolado não diferem estatisticamente entre si (Kruskal Wallis seguido de SNK – $p \geq 0,05$).

3.2. Atividades enzimáticas da superfície conidial (SC)

Para atividade de Pr1 e Pr2 (Tabela 2), o isolado ARSEF 1095, não apresentou modificações até o fim do experimento; já para ARSEF 552, decréscimos nas unidades enzimáticas de Pr1 foram observados ao 10° ciclo, e com reduções de até duas vezes, tanto para Pr1 quanto para Pr2, ao 20° ciclo. Quanto ao isolado ARSEF 2521, reduções de Pr1 foram detectadas somente ao 20° ciclo e Pr2 ao 10° ciclo, em comparação à condição inicial.

Na atividade lipolítica (Tabela 2), com exceção de ARSEF 552, os isolados apresentaram decréscimo progressivo da atividade ao substrato ρ NP-palmitato até o 20° ciclo.

Tabela 2 – Atividades proteolítica e lipolítica (U) de proteínas extraídas da superfície conidial (SC) de diferentes isolados de *Metarhizium* spp. após sucessivos ciclos de repique contínuo com intervalos de 15 dias.

| | | Inicial | 10° ciclo | 20° ciclo |
|------------------|------------|------------------|-----------------|-----------------|
| <i>Proteases</i> | | | | |
| BAPNA | ARSEF 552 | 0,078 ± 0,002 a | 0,066 ± 0,003b | 0,064 ± 0,006 b |
| | ARSEF 1095 | 0,065 ± 0,002 ab | 0,064 ± 0,001 a | 0,068 ± 0,002 b |
| | ARSEF 2521 | 0,066 ± 0,001 a | 0,026 ± 0,008 b | 0,022 ± 0,003 b |
| Pr1 | ARSEF 552 | 20,37 ± 1,71a | 16,30 ± 0,84 b | 9,91 ± 0,57 c |
| | ARSEF 1095 | 16,04 ± 1,34 a | 15,14 ± 1,57 a | 15,08 ± 1,80 a |
| | ARSEF 2521 | 17,77 ± 0,68 a | 15,27 ± 0,93 a | 8,29 ± 0,83 b |
| Pr2 | ARSEF 552 | 5,98 ± 0,08 a | 5,33 ± 0,13 a | 2,84 ± 0,80 b |

| | | | |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| ARSEF 1095 | 5,10 ± 0,04 a | 5,82 ± 0,02 a | 5,26 ± 0,09 a |
| ARSEF 2521 | 3,92 ± 0,08 a | 2,52 ± 0,20 b | 2,8 ± 0,06 c |

Lipase

| | | | | |
|---------------|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| ρNP-palmitato | ARSEF 552 | 0,375 ± 0,003 a | 0,569 ± 0,004 b | 0,361 ± 0,007 c |
| | ARSEF 1095 | 0,029 ± 0,004 a | 0,082 ± 0,002 b | 0,074 ± 0,003 c |
| | ARSEF 2521 | 0,408 ± 0,007 a | 0,023 ± 0,003 b | 0,014 ± 0,009 c |

Médias seguidas das mesmas letras, na mesma linha, não diferem significativamente entre si através do teste ANOVA seguido do teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

3.3. Atividades enzimáticas da secreção micelial (SM)

Na análise da SM (Tabela 3), dois dos isolados reduziram as atividades de Pr1 ao 10º ciclo, em especial o isolado ARSEF 552. Em Pr2, embora com número de unidades inferiores em relação à Pr1, ARSEF 1095 manteve as atividades constantes e discretas variações foram observadas entre os isolados ao 20º ciclo.

De maneira geral, a atividade lipásica de todos os isolados diminuiu em função dos ciclos de passagem, registrando os menores valores em particular ao final do experimento.

Tabela 3 - Atividades proteolítica e lipolítica (U) de proteínas da secreção micelial (SM) de isolados de *Metarhizium* spp. após sucessivos ciclos de repique contínuo com intervalos de 15 dias.

| | | Inicial | 10º ciclo | 20º ciclo |
|------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Proteases</i> | | | | |
| BAPNA | ARSEF 552 | 0,026 ± 0,002 ab | 0,028 ± 0,009 a | 0,023 ± 0,001 b |
| | ARSEF 1095 | 0,023 ± 0,004 a | 0,027 ± 0,004 a | 0,023 ± 0,008 a |
| | ARSEF 2521 | 0,023 ± 0,001 a | 0,025 ± 0,007 a | 0,024 ± 0,005 a |
| Pr1 | ARSEF 552 | 6,40 ± 0,53 a | 2,26 ± 0,09 b | 2,13 ± 0,27 b |
| | ARSEF 1095 | 1,04 ± 0,06 a | 1,14 ± 0,03 a | 1,02 ± 0,03 a |
| | ARSEF 2521 | 2,17 ± 0,07 a | 1,54 ± 0,10 b | 1,32 ± 0,07 c |
| Pr2 | ARSEF 552 | 1,14 ± 0,06 a | 1,17 ± 0,07 a | 1,51 ± 0,05 b |
| | ARSEF 1095 | 1,51 ± 0,15 a | 1,49 ± 0,11 b | 1,64 ± 0,02 c |
| | ARSEF 2521 | 0,91 ± 0,06 a | 1,10 ± 0,09 b | 1,05 ± 0,12 b |
| <i>Lipase</i> | | | | |
| ρNP-palmitato | ARSEF 552 | 0,752 ± 0,004 a | 0,656 ± 0,007 b | 0,430 ± 0,007 c |
| | ARSEF 1095 | 0,890 ± 0,007 a | 0,476 ± 0,003 b | 0,110 ± 0,002 c |
| | ARSEF 2521 | 0,673 ± 0,002 a | 0,361 ± 0,008 b | 0,287 ± 0,008 c |

Médias seguidas das mesmas letras, na mesma linha, não diferem significativamente entre si através do teste ANOVA seguido do teste de Tukey ($p \geq 0,05$)

3.4. Virulência de *Metarhizium* spp. para fêmeas ingurgitadas

Os parâmetros avaliados das fêmeas de *R. microplus* encontram-se disponíveis na Tabela 4. ARSEF 552 foi o isolado que apresentou maior percentual de controle ao início do experimento. Contudo, em acordância com as atividades enzimáticas de SC e SM, reduções progressivas de até 3 vezes na eficácia foram observadas ao final do 20º ciclo. De maneira diferenciada, ARSEF 1095 não apresentou variações na virulência durante os repiques realizados. Já para ARSEF 2521, reduções expressivas foram observadas ao 10º ciclo e se mantiveram até o final das análises.

3.5. Virulência de *Metarhizium* spp. para larvas

O percentual de mortalidade das larvas no momento inicial e após o 20º ciclo encontram-se expostos na Figura 3. Para ARSEF 1095, variações entre os ciclos não foram observadas em nenhuma das análises. De outra forma, para ARSEF 552, resultados superiores foram observados após 5 dias de tratamento na condição inicial em comparação ao 20º ciclo, especialmente na concentração de 10^8 conídios/mL; no entanto, após dez dias de tratamento, resultados semelhantes entre as condições puderam ser observados. ARSEF 2521, que ao início apresentou resultados semelhantes, após dez de tratamento, registrou mortalidade superior no grupo Inicial frente ao 20º ciclo; contudo, diferenças expressivas não foram mantidas após 15 dias de tratamento.

Tabela 4 - Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial da Fêmea (P.I.F.), Peso Total da Massa de Ovos (P.T.M.O.), Percentual de Eclosão (%), Índice de Produção de Ovos (I.P.O.), Índice Nutricional (I.N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensões (10^8 conídios/mL) de *Metarhizium* spp.

| Grupos | | P. I. F. (g) | P. T. M. O. (g) | P. E. (%) | I. P. O. | I. N. | % Controle |
|-----------------------|------------------|-------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| ARSEF 552 | CTR | 0,2414 ± 0,0305 a | 0,1499 ± 0,0187 a | 97,57 ± 1,81 a | 62,16 ± 1,82 a | 80,56 ± 2,08 a | - |
| | Inicial | 0,2401 ± 0,0220 a | 0,0651 ± 0,0381 b | 74,50 ± 3,13 c | 24,02 ± 4,06 c | 30,14 ± 8,10 b | 64,9 |
| | 10º ciclo | 0,2411 ± 0,0258 a | 0,0980 ± 0,0469 bc | 82,13 ± 2,62 b | 40,27 ± 9,38 bc | 50,77 ± 2,73 c | 46,5 |
| | 20º ciclo | 0,2400 ± 0,0273 a | 0,1272 ± 0,0205 ac | 93,71 ± 4,32 a | 53,16 ± 6,79 a | 62,95 ± 6,04 c | 19,3 |
| ARSEF 1095 | CTR | 0,2414 ± 0,0305 a | 0,1499 ± 0,0187 a | 97,57 ± 1,81 a | 62,16 ± 1,82 a | 80,56 ± 2,08 a | - |
| | Inicial | 0,2412 ± 0,0251 a | 0,1104 ± 0,0284 b | 76,63 ± 8,60 b | 46,05 ± 5,92 b | 59,51 ± 5,12 c | 37,9 |
| | 10º ciclo | 0,2401 ± 0,0254 a | 0,1180 ± 0,0157 b | 72,50 ± 6,31 b | 41,79 ± 9,23 b | 51,04 ± 7,69 c | 33,6 |
| | 20º ciclo | 0,2405 ± 0,0260 a | 0,1233 ± 0,0280 a | 86,25 ± 6,96 ab | 51,88 ± 5,58 b | 65,71 ± 9,33 c | 22,7 |
| ARSEF 2521 | CTR | 0,2414 ± 0,0305 a | 0,1499 ± 0,0187 a | 97,57 ± 1,81 a | 62,16 ± 1,82 a | 80,56 ± 2,08 a | - |
| | Inicial | 0,2409 ± 0,0172 a | 0,0852 ± 0,0429 bc | 78,38 ± 3,10 bc | 42,60 ± 7,91 b | 57,53 ± 3,74 c | 40,6 |
| | 10º ciclo | 0,2405 ± 0,0229 a | 0,1122 ± 0,0308 a | 85,43 ± 9,53 a | 45,48 ± 4,42 ab | 60,36 ± 4,14 b | 26,2 |
| | 20º ciclo | 0,2408 ± 0,0237 a | 0,1235 ± 0,0201 ac | 84,32 ± 6,98 ac | 52,86 ± 6,76 a | 66,94 ± 9,09 ab | 24,7 |

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, para cada isolado, não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$).

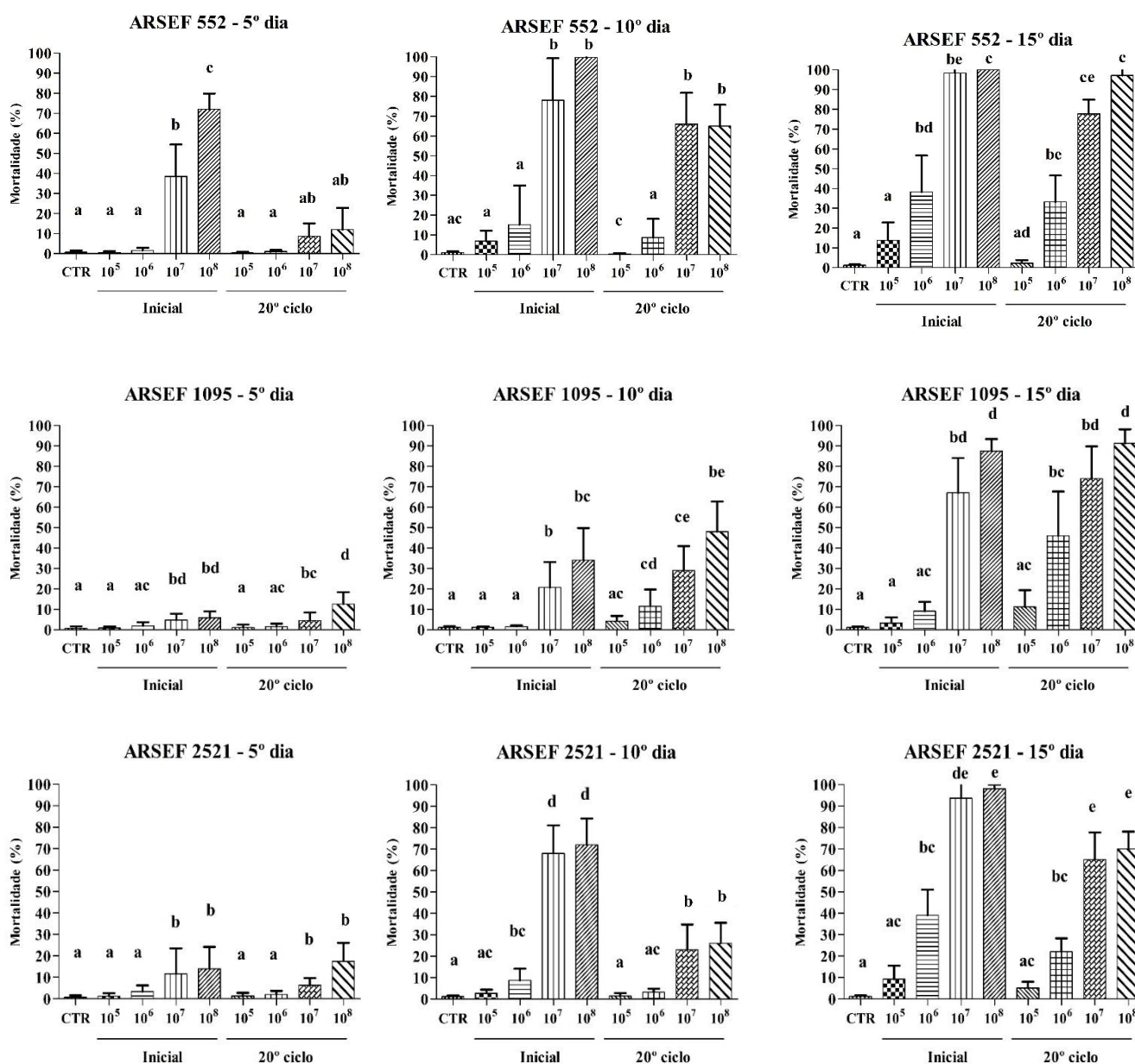


Figura 3 - Percentual médio e desvio padrão da mortalidade 5, 10 e 15 dias após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* com diferentes concentrações de suspensão aquosa dos isolados de *Metarhizium* spp. (10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/mL) ao início (Inicial) e após sucessivos ciclos de repique contínuo (20º ciclo) em meio BDA. Todo o experimento ($n = 10$ tubos) foi mantido sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$.

Tabela 5 - Concentrações letais (CL 50) dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. cinco dias após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* com suspensões aquosas ao início (Inicial) e após sucessivos ciclos de repique contínuo (20º ciclo) em meio BDA. Todo o experimento foi mantido sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$.

| Isolado | | CL 50 | Intervalo de confiança | P valor |
|------------|-----------|-------------------------|--|---------------|
| ARSEF 552 | Inicial | $2,6629 \times 10^8$ | $1,2829 \times 10^8 - 5,5275 \times 10^8$ | $p = 0,01250$ |
| | 20º ciclo | $1,3401 \times 10^{11}$ | $7,8836 \times 10^9 - 2,2782 \times 10^{14}$ | |
| ARSEF 1095 | Inicial | $1,9357 \times 10^{13}$ | $1,7729 \times 10^4 - 2,1135 \times 10^{22}$ | $p = 0,05328$ |
| | 20º ciclo | $2,7332 \times 10^{14}$ | $6,5148 \times 10^7 - 2,1801 \times 10^{14}$ | |
| ARSEF 2521 | Inicial | $2,2563 \times 10^{10}$ | $5,8558 \times 10^9 - 8,6942 \times 10^{14}$ | $p = 0,07391$ |
| | 20º ciclo | $5,3208 \times 10^{11}$ | $1,6861 \times 10^8 - 1,6790 \times 10^{13}$ | |

Tabela 6 - Concentrações letais (CL 50) dos diferentes isolados de *Metarhizium* spp. dez dias após o tratamento das larvas de *Rhipicephalus microplus* com suspensões aquosas ao início (Inicial) e após sucessivos ciclos de repique contínuo (20º ciclo) em meio BDA. Todo o experimento foi mantido sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR $\geq 80\%$.

| Isolado | | CL 50 | Intervalo de confiança | P valor |
|------------|-----------|-------------------------|---|---------------|
| ARSEF 552 | Inicial | $3,1472 \times 10^7$ | $1,6870 \times 10^7 - 5,8710 \times 10^7$ | $p = 0,06010$ |
| | 20º ciclo | $1,5843 \times 10^8$ | $6,5995 \times 10^7 - 3,8035 \times 10^8$ | |
| ARSEF 1095 | Inicial | $1,1786 \times 10^8$ | $5,2049 \times 10^7 - 2,6689 \times 10^8$ | $p = 0,07713$ |
| | 20º ciclo | $6,8684 \times 10^9$ | $3,2663 \times 10^8 - 1,4443 \times 10^{11}$ | |
| ARSEF 2521 | Inicial | $2,5085 \times 10^9$ | $3,7856 \times 10^8 - 1,4623 \times 10^{10}$ | $p = 0,03249$ |
| | 20º ciclo | $1,1446 \times 10^{11}$ | $1,7324 \times 10^{10} - 7,5864 \times 10^{14}$ | |

4 DISCUSSÃO

Por longos anos, o estresse tem favorecido a capacidade adaptativa de *Metarhizium* spp. no meio ambiente (LOVETT; ST LEGER, 2015). Em laboratório, contudo, alguns destes efeitos podem ser bastante deletérios às colônias fúngicas como a inanição e/ou baixo aporte nutricional (SHAH et al., 2005). As implicações em realizar sucessivos ciclos de repique contínuo para fungos artropodopatogênicos têm sido amplamente investigadas para as ordens Lepidoptera (NAHAR et al., 2008; HUSSAIN et al., 2010), Orthoptera (MOHAMMADBEIGI, 2013), Coleoptera (SHAH et al., 2007; SAFAVI, 2011) e Diptera (ZAYED et al., 2013), no entanto para carrapatos (Ordem Ixodida), seus efeitos nunca foram anteriormente discutidos. Nos experimentos deste estudo, todos os isolados de *Metarhizium* apresentaram variação fenotípica nas colônias, como redução do diâmetro médio de crescimento, produção conidial e virulência para *R. microplus* ao 20º repique. Como um fator limitante, a proporção de carbono/nitrogênio (CN) dos meios de cultivo influencia diretamente no desenvolvimento *M. anisopliae*. O meio BDA é uma excelente opção para o desenvolvimento de *M. anisopliae* na rotina laboratorial (ALVES, 1998) devido à alta concentração de fontes carbonadas, porém possui baixo aporte nitrogenado (CN 10:1) (WYSS; CHARUDATTAN; DE VALERIO, 2001). Um estudo que comparou o efeito da CN sobre a virulência e atividade enzimática de Pr1, determinou que proporções reduzidas de CN como 5.2:1 são bons marcadores de virulência e indicadores de qualidade para o desenvolvimento de *M. anisopliae*, influenciando diretamente na produção de proteases e conseqüentemente na virulência (SHAH et al., 2005). Com contribuições na formação de constituintes proteicos celulares (LEE et al., 2013), sugere-se que a presença de nitrogênio no meio de cultivo auxilie tanto na formação de proteínas estruturais quanto na produção de metabólitos secundários que favoreçam a infecção no hospedeiro. Assim, algumas das alterações observadas aqui possivelmente ocorreram em função da fonte nutricional fornecida para crescimento, sendo desejável inserir fontes nitrogenadas como peptona, por exemplo, aos meios de cultivo para obter melhores performances.

Neste contexto, a manutenção laboratorial, responsável por garantir inóculos viáveis, deve visar como premissa a conservação de características morfológicas, fisiológicas e genéticas dos isolados (SOLA et al., 2012). A particularidade como cada isolado fúngico se comporta no meio de cultura é um fato muito importante na rotina de manutenção, visto que a partir de um mesmo repique, colônias fúngicas podem apresentar variação na produção conidial e maior ou menor crescimento micelial (ANGELONE et al., 2018). Para produções em laboratório de *M. anisopliae*, a determinação da profundidade/volume de meio de cultivo nas placas influencia a conidiogênese, sendo deteriorações pleomórficas observadas em maior frequência em substratos que dispunham de menor volume de meio de cultura (KAMP; BIDOCHKA, 2002). A ocorrência de setorizações coloniais também se encontra relacionada ao subcultivo, especialmente envolvendo o metabolismo energético conidial e redução da atividade celular. Após transferências sucessivas em meio SDA, colônias de *M. anisopliae* demonstraram áreas de intenso crescimento vegetativo, diminuição da produção de destruxinas – metabólito citotóxico produzido por *Metarhizium* spp. – e baixa atividade proliferativa devido à redução de adenosina monofostato cíclica (cAMP). Além disto, alterações intracitoplasmáticas como alta atividade oxidativa intracelular e danos ao material genético mitocondrial também já foram detectados em áreas setORIZADAS em função de repiques sucessivos (WANG et al., 2005). A partir de estudos proteômicos em conídios de *B. bassiana*, o subcultivo sucessivo a partir de um única colônia foi capaz de aumentar a produção de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, autofagia, metabolismo de aminoácidos e apoptose, e diminuir proteínas que atuavam no reparo do DNA, segregação cromossomal, metabolismo energético e virulência (JIRAKKAKUL et al., 2018).

A avaliação da estabilidade das colônias também orienta a seleção de fungos com potencial comercial, no qual cepas estáveis tentem a manter suas características físicas e propriedades biológicas frente a repiques sucessivos quando comparadas a instáveis (ANSARI; BUTT, 2011). Devido aos repiques sucessivos, particularidades entre os isolados do presente capítulo foram observadas. Dentre os efeitos observados, redução da eficácia para fêmeas, bem como atraso na obtenção de percentuais satisfatórios de mortalidade para larvas de *R. microplus*, além do aumento da CL50, podem ter relação com a germinação fúngica. A velocidade com que o conídio se desenvolve, seja em meio de cultivo ou na superfície do hospedeiro, é um importante parâmetro para a caracterização da potência de um isolado (FARIA et al., 2014). Embora não observadas alterações relevantes no percentual de germinação aqui, já foi reportado que repique sucessivos em BDA de *M. anisopliae* foram capazes de restringir a formação do apressório em conídios, influenciando diretamente na virulência e na atividade de proteínas relacionadas à patogenia (NAHAR et al., 2008). Desse modo, é indicado que a periodicidade de transferência para novo meio de cultura não seja superior a três ou quatro meses no repique direto, evitando o total consumo dos nutrientes e reduzindo o acúmulo de metabólitos tóxicos produzidos durante o crescimento (PASSADOR et al., 2010).

Durante a infecção, a internalização fúngica é exercida devido à associação de fatores mecânicos e ação de enzimas hidrolíticas sobre o tegumento do hospedeiro. Em análises do secretoma de *M. anisopliae* em meio que induz a infecção com cutícula de *R. microplus*, enzimas como Pr1 e subtipos exercem importante função durante a penetração (SANTI et al., 2010 b). Além disto, atividades de lipases em conídios (BEYS-DA-SILVA et al., 2010 a) e micélio (PERINOTTO et al., 2014), e Pr1 em secretado micelial (PERINOTTO et al., 2013) de *M. anisopliae* já foram caracterizadas e demonstram contribuir positivamente para a virulência em *R. microplus*. Contudo, reduções de eficácia e atividades de Pr1 são reportadas na literatura em fungos artropodopatogênicos após repiques sucessivos (SHAH et al., 2007; ANSARI; BUTT, 2011; SANTORO et al., 2014). Os subcultivos sucessivos aqui foram capazes de afetar todas estas atividades, em especial para ARSEF 552 e ARSEF 2521, que demonstraram diminuir as atividades enzimáticas tanto na SC quanto na SM após o 10^o e 20^o repiques, respectivamente. Neste experimento, fica claro a resposta individualizada de cada isolado, bem como a necessidade de diversos repiques consecutivos para a observação de alterações no desenvolvimento, virulência e atividades enzimáticas. Assim como reportado anteriormente na literatura (THAOCHAN; CHANDRAPATYA, 2016), tais efeitos, que por vezes podem ocorrer de forma silenciosa, não devem ser negligenciados durante a rotina de utilização fúngica em experimentos.

Com prospecções para a utilização em larga escala no campo no Brasil, o controle de estágios parasitários e não parasitários de *R. microplus* à base de *M. anisopliae* s.l. figura-se em ascensão (MASCARIN et al., 2018). Dentre as limitações vigentes, a necessidade de altas concentrações de propágulos fúngicos e velocidade lenta de atuação no ambiente ainda limitam projeções futuras no controle de carrapatos utilizando fungos artropodopatogênicos (FERNANDES; BITTENCOURT, 2008). De fato, como uma alternativa de melhoria, passagens sucessivas dos fungos em ciclos de infecção sobre os hospedeiros artrópodes podem restituir características perdidas ou reduzidas com o subcultivo (SHAH et al., 2007). Neste contexto, aumento no número de apressórios formados (NAHAR et al., 2008) e na atividade de Pr1 já foram reportadas para insetos (SHAH et al., 2007; SONG; FENG, 2011; SAFAVI, 2011; THAOCHAN; CHANDRAPATYA, 2016). Já em carrapatos, os efeitos ainda continuam pouco elucidados. O reisolamento na superfície do hospedeiro (o que se entende como um ciclo de desenvolvimento) após inoculação de *M. anisopliae* em *R. microplus*, embora tenham elevado tanto a expressão do gene *pr1* quanto a atividade enzimática de Pr1 (U/mg de proteína), não foram capazes de aumentar a virulência para larvas (GÔLO et al., 2015). No entanto, ao se

avaliar o efeito da inoculação em *R. microplus*, reisolamento em meio SDA e sucessiva inoculação em novos indivíduos, demonstrou-se que ciclos de até sete passagens (carrapato-SDA-carrapato) foram capazes de reduzir substancialmente a CL 50, bem como elevar o percentual de mortalidade e inibir a produção de ovos em fêmeas (ADAMES et al., 2011).

Deste modo, o presente capítulo explorou o efeito de repiques sucessivos em isolados de *Metarhizium* spp. e caracterizou reduções expressivas na atividade enzimática e virulência para *R. microplus* após sucessivos ciclos de crescimento. Assim, como alternativa aos possíveis efeitos, a redução em laboratório de subcultivos sucessivos a partir de uma mesma colônia, bem como a alternância de ciclos entre meio de cultivo artificial e cadáveres de carrapatos podem ser medidas promissoras a serem adotadas nos laboratórios de pesquisa, possivelmente assegurando melhores resultados especialmente aos ensaios biológicos realizados *in vitro*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMES, M.; FERNÁNDEZ-RUVALCABA, M.; PEÑA-CHORA, G.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. M. Effects of passages through a suitable host of the fungus, *Metarhizium anisopliae*, on the virulence of acaricide susceptible and resistant strains of the tick, *Rhipicephalus microplus*. **Journal of Insect Science**, v. 11, p.1-13, 2011.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.

ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; CAMARGO, M.G.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; CAMPANHON, I.B.; BRAZ, G.R.C.; SOARES, M.R.; FOLLY, E.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Detection of serpins involved in cellular immune response of *Rhipicephalus microplus* challenged with fungi. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, p. 351-360, 2014.

ANGELONE, S.; PIÑA-TORRES, I. H.; PADILLA-GUERRERO, I. E.; BIDOCHKA, M. J. “Sleepers” and “creepers”: a theoretical study of colony polymorphisms in the fungus *Metarhizium* related to insect pathogenicity and plant rhizosphere colonization. **Insects**, v. 104, p. 1-7, 2018.

ANSARI, M. A.; BUTT, T. M. Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p.1460–1469, 2011.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; CALZOLARI, D.; PASSOS, D. O.; GUIMARÃES, J. A.; MORESCO, J. J.; YATES, J. R. Secretome of the Biocontrol Agent *Metarhizium anisopliae* Induced by the Cuticle of the Cotton Pest *Dysdercus peruvianus* Reveals New Insights into Infection. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 2282–2296, 2014.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; CORRÊA, A. P. F.; SILVA, L. A.; BRESCIANI, F. R.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* s.l. can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. **Fungal Biology**, v. 114, p.911-916, 2010 b.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **Fungal Biology**, v. 114, p.10-15, 2010 a.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, p. 512-530, 2009.

COUTINHO-RODRIGUES, C J. B.; PERINOTTO, W. M. S.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F A.; NOGUEIRA, M. R. S.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence, proteolytic and lipolytic activities of Brazilian *Beauveria bassiana* s.l. isolates (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Rhipicephalus microplus* ticks (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, p. 239–249, 2016.

FARIA, M.; LOPES, R. B.; SOUZA, D. A.; WRAIGHT, S.P. Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.125, p. 68-72, 2014.

FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E. N.; BAHIENSE, T. C.; MORAES, A. M. L.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. E. P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307-318, 2011.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D.W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 300-305, 2012.

FREGONESI, A. F.; MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* a inseticidas, herbicidas e maturadores em condições de laboratório, **Arquivos do Instituto Biológico (online)**, v. 83, p. 1-8, 2016.

GÔLO, P. S.; SANTOS, H. A.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; ANGELO, I. C.; CAMARGO, M. G.; SÁ, F. A.; MASSARD, C. L.; FERNANDES, É. K. K.; ROBERTS, D. R.; , V. R. E. P. The influence of conidial Pr1 protease on pathogenicity potential of *Metarhizium anisopliae* senso lato to ticks. **Parasitology Research**, v. 114, p. 2309-2315, 2015.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150-156, 2014.

HUSSAIN, A.; TIAN, M. Y.; HE, Y. R.; RUAN, L.; AHMED, S. *In vitro* and *in vivo* culturing impacts on the virulence characteristics of serially passed Entomopathogenic fungi. **Journal of Food, Agriculture & Environment** v.8, p.481-487, 2010.

JIRAKKAKUL, J.; ROYTRAKUL, S.; SRISUKSAM, C.; SWANGMANEECHARERN, R.; KITTISENACHAI, S.; JARESTITTHIKUNCHAI, J.; PUNYA, J.; PROMMEENATE, P.; SENACHAK, J.; SO, L.; TACHALEAT, A.; TANTICHAROEN, M.; CHEEVADHANARAK, S.; WATTANACHAISAREEKUL, S.; AMNUAYKANJANASIN,

A. Culture degeneration in conidia of *Beauveria bassiana* and virulence determinants by proteomics. **Fungal Biology**, v. 122, 156-171, 2018.

KAMP, A. M.; BIDOCHKA, M. J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 74–77, 2002.

LOVETT, B.; ST LEGER, R. J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. **Current Genetics**, v. 61, p. 253–261, 2015.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA I, J. R.; FERNANDES, E. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, PII S0022-2011: 30365–30368, 2018.

MOHAMMADBEIGI, A. Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) passaged through artificial media and an insect host *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae). **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 6, p. 1147-1152, 2013.

NAHAR, P. B.; KULKARNI, S. A.; KULYE, M. S.; CHAVAN, S. B.; KULKARNI, G.; RAJENDRAN, A.; YADAV, P. D.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Effect of repeated *in vitro* subculturing on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, p. 337-355, 2008.

PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, v.72, p.51-55, 2010.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; SALLES, C. M. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: molecular marker of fungal virulence in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, p. 123-132, 2013.

PERINOTTO, W. M. S.; GÔLO, P. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; SÁ, F. A.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A.; SALLES, C. M. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 189-196, 2014.

QUINELATO, S.; GÔLO, P. S. ; PERINOTTO, W. M.S.; SÁ, F. A.; CAMARGO, M. G.; ANGELO, I. C.; MORAES, A. M.L.; BITTENCOURT, V. R.E.P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556-565, 2012.

SAFAVI, S. A. Successive subculturing alters spore-bound Pr1 activity, germination and virulence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, p. 883-891, 2011.

SAFAVI, S. A. Attenuation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* following serial in vitro transfers. **Biologia**, v. 67, p. 1062-1068, 2012.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae* s.l.: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874-880, 2010 a.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; PINTO, A. F. M.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. **Fungal Biology**, v. 114, p. 312-319, 2010 b.

SANTORO, P. H.; ZORZETTI, J.; CONSTANSKI, K.; NEVES, P. M. O. J. Conidial production, virulence, and stress tolerance of *Beauveria bassiana* conidia after successive in vitro subculturing. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 40, p. 85-90, 2014.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* s.l. enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, p. 1267-1274, 2010.

SHAH, F. A.; ALLEN, N.; WRIGHT, C. L.; BUTT, T. M. Repetead in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, p.60-66, 2007.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 259–266, 2005.

SILVA, M. V.; SANTI, L.; STAATS, C. C.; COSTA, A. M.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 382-392, 2005.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A P.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Manutenção de micro-organismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, p. 1398-1418, 2012.

THAOCHAN, N.; CHANDRAPATYA, A. The phenotypic and metabolic properties of *Metarhizium guizhouense* on *Corcyra cephalonica*. **Mycosphere**, v. 7, p. 214–225, 2016.

WANG, C.; BUTT, T. M.; ST LEGER, R. J. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. **Microbiology**, v. 151, p. 3223–3236, 2005.

WYSS, G. S.; CHARUDATTAN, R.; DE VALERIO, J.T. Evaluation of agar and grain media for mass production of conidia of *Dactylaria higginsii*. **Plant Disease**, v. 85, 1165–1170, 2001.

ZAYED, A.; SOLIMAN, M. M.; EL-SHAZLY, M. M. Infectivity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, p. 796-803, 2013.

CAPÍTULO II

USO DE MENADIONA COMO INDUTOR DE RESPOSTAS OXIDATIVAS EM *Metarhizium anisopliae* E SEU EFEITO NA ATIVIDADE CARRAPATICIDA CONTRA *Rhipicephalus microplus*

RESUMO

Relacionado à evolução de espécies, o estresse oxidativo em células fúngicas tem modulado tanto a eficiência quanto a tolerância de *Metarhizium* a fatores ambientais. O presente capítulo visou avaliar as atividades enzimáticas em conídios e o perfil proteico do secretado micelial de *Metarhizium anisopliae* s.s. após exposição à menadiona (MEN), um potente agente indutor de espécies reativas de oxigênio, além de relacionar seus efeitos à eficácia para o controle de *Rhipicephalus microplus*. Para todos os experimentos, uma sub-dosagem (50% da CL50) de MEN foi inicialmente adicionada aos meios de cultivo. Em meio sólido suplementado com MEN (BDA +MEN), mudanças fenotípicas nas colônias, redução da produção conidial e modificações em atividades enzimáticas da superfície e fração intracitoplasmática conidiais foram detectadas. No entanto, melhorias significativas no percentual de mortalidade de larvas e redução de CL50 foram observadas com suspensões conidiais produzidas a partir de fungo crescido em meio BDA + MEN. Nas análises de meio basal líquido acrescido de cutícula de *R. microplus* (MBRm), com e sem MEN (MBRm + MEN e MBRm, respectivamente), num total de 654 proteínas identificadas por espectrometria de massas, 31 foram consideradas *up-* e *down-* reguladas, estando principalmente relacionadas à atividade antioxidante (catalase), patogenicidade (como Pr1B, Pr1D e Pr1K), reparo celular e morfogênese. No perfil proteico exclusivo de MBRm + MEN, 48 proteínas, em sua maioria com funções de sinalização celular e perfil antioxidante, também foram detectadas. Para validação das análises, ensaios enzimáticos foram realizados e diferenças nas atividades proteolítica e antioxidante foram também confirmadas. Deste modo, os resultados encontrados indicam que a exposição à subdosagem de MEN beneficia a virulência devido ao possível aumento da secreção de proteínas relacionadas à penetração da cutícula, bem como aumento de fatores de sinalização celular. Além disto, por meio dos perfis proteicos explorados aqui, novas vertentes de estudo podem ser direcionadas, em especial à busca de proteínas que contribuam substancialmente à eficácia no controle de *R. microplus*.

Palavras-chave: estresse oxidativo; proteômica; MudPIT; infecção em carrapatos.

ABSTRACT

Oxidative stress in fungal cells modulates both efficiency and resistance in *Metarhizium* and still protects against environmental factors. This study evaluated the enzymatic activities in conidia and the protein profile of *Metarhizium anisopliae* mycelia secretion after exposure to menadione (MEN) as well as its effect on *Rhipicephalus microplus* control. For all experiments, a sub lethal dose (half of LC50) of menadione was previously added to the culture media. In solid medium supplemented with MEN (PDA + MEN), phenotypic changes in colonies, reduction in conidial production and enzymatic activities on both surface and conidial intracytoplasmic fraction were affected. In addition, significant improvements in the percentage of larval mortality and reduction of LC50 were observed when conidia were produced on BDA + MEN. For analyzes of the basal medium plus *R. microplus* cuticle (BMRm and BMRm + MEN), in 654 identified proteins, 31 were *up*- and *down*-regulated, mainly related to antioxidant activity (catalase), pathogenicity (Pr1B, Pr1D and Pr1K), cell repair and morphogenesis. In the exclusive profile (BMRm + MEN), 48 proteins, mostly related to cellular signaling and antioxidant functions, were also detected. For proteomic validation, enzymatic assays were performed and differences in proteolytic and antioxidant activities characterized. Thus, the results support that exposure to MEN may benefit virulence due to the increase of proteins involved in cuticle penetration, as well as those in cell signaling factors. Also, through the protein profiles discussed here, new studies can be guided in search of other proteins that contribute to *R. microplus* control efficacy.

Keywords: oxidative stress; proteomic; MudPIT; tick infection.

1 INTRODUÇÃO

O declínio das produções de leite e carne bovina no Brasil ainda sofre grande influência das ecto e endoparasitoses. Nesse cenário, *Rhipicephalus microplus*, popularmente conhecido como carrapato dos bovinos, é considerado um dos principais ectoparasitos e registra prejuízos anuais superiores a US \$ 3 bilhões em todo o território nacional (GRISI et al., 2014). Em áreas de clima tropical, seu controle é majoritariamente baseado em tratamento periódico com produtos químicos; no entanto, usos indiscriminados têm levado à seleção de cepas resistentes (HIGA et al., 2015) e métodos complementares como o uso de fungos artropodopatogênicos são cada vez mais necessários para garantir essa eficácia. Consolidado como um excelente agente para pragas agrícolas, o complexo de espécies fúngicas *Metarhizium anisopliae* s.l. tem apresentado resultados animadores como biocontrolador de *R. microplus* e pode ser uma opção proeminente no mercado atual de controle de carrapatos (MASCARIN et al., 2018). Como muitos micro-organismos onipresentes, *Metarhizium* spp. são frequentemente encontradas em amostras de solo, rizosfera de plantas ou em artrópodes naturalmente colonizados (ZIMMERMANN, 2007). Atuando tanto em plantas quanto em artrópodes, recentemente relatou-se a simbiose *Metarhizium*-planta, no qual os mesmos podem fornecer nitrogênio para raízes a partir de cadáveres mortos por fungos, e em contrapartida, absorver carbono através de compostos fotossintéticos para o seu desenvolvimento (BEHIE et al., 2017). Na cutícula do carrapato, os conídios aderem primeiramente à superfície e penetram através do tegumento, atingindo a hemocele a partir das hifas, e multiplicam-se rapidamente após vencer diversas das respostas imunológicas produzidas pelo hospedeiro (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010,).

Diversos fatores modulam as interações e adaptações ao estresse e parecem ser a chave evolutiva para a persistência de fungos, bem como a ampla diversidade de estilos de vida no ambiente (LOVETT; ST LEGER, 2015). Durante a infecção, respostas moleculares e bioquímicas são desencadeadas no hospedeiro, sendo que a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) obtidas a partir do estresse oxidativo intracelular, por vezes atua como primeira linha de defesa, influenciando tanto o desenvolvimento quanto a produção de metabólitos secundários pelos fungos (SREE; PADMAJA, 2008; VORONTSOVA et al., 2018). Famílias enzimáticas com potencial antioxidante, como por exemplo, catalases (CAT), superóxido dismutases (SOD), peroxidases (PER) e outras têm sido funcionalmente investigadas em *Beauveria bassiana*, no entanto, para espécies de *Metarhizium*, esse entendimento tenha sido expandido apenas na última década (ZHANG; FENG, 2018). Análises prévias de conídios e secretado micelial de *Metarhizium* (SANTI et al., 2010 a; BEYS-DASILVA et al., 2014) têm demonstrado que a superexpressão de genes relacionados a estas enzimas induzem melhorias significativas na termotolerância e tolerância à radiação ultravioleta (UV) (ZHANG; FENG, 2018), incluindo uma contribuição excepcional para a virulência (HERNANDEZ et al., 2010; XIE et al., 2010; XIE et al., 2012).

Menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona; MEN), também conhecida como vitamina K3, é uma cetona aromática policíclica sintética que se transforma em semiquinona por redução de elétrons. Promissor no tratamento de doenças cancerígenas em humanos, MEN eleva nas células os níveis de EROs, induzindo a produções de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que podem cursar com disfunção mitocondrial ou morte celular (AGUIRRE et al., 2006; LI et al., 2008; MONTEIRO et al., 2013). Dependendo das propriedades oxidativas e concentração do agente utilizado, as células fúngicas são capazes de inibir ou reduzir seus danos intracelulares na adaptação ao estresse; usado em condições de laboratório, para algumas espécies de *Metarhizium*, a influência de MEN na germinação de conídios já foi avaliada (AZEVEDO et al., 2014), bem como seus efeitos na tolerância ao calor (RANGEL et al., 2008).

Por outro lado, estudos proteômicos têm sido amplamente relatados em espécies de *Metarhizium* (BARROS et al., 2010; SU et al., 2013; BEYS-DA-SILVA et al., 2014; WANG et al., 2018), inclusive quando infectam carrapatos (SANTI et al., 2010 b). Porém, a análise do secretoma de *M. anisopliae* ao se desenvolver sob estresse oxidativo induzido por MEN ainda é desconhecida. Assim, o presente capítulo visa esclarecer as respostas antioxidantes em conídios e secreção micelial de *M. anisopliae* usando MEN como um agente indutor de EROs em células fúngicas. Mudanças relevantes no desenvolvimento de colônias, virulência para larvas de *R. microplus*, secreção proteica e atividades enzimáticas foram identificadas, sendo esta a primeira abordagem que relaciona todos esses tópicos ao controle de carrapatos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados nas instalações do LCM (DPA/IV/UFRRJ) localizado em Seropédica – RJ; *Laboratório Multidisciplinar de Bioquímica e Biologia Molecular* da Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES), localizado em Lajeado – RS e *The Scripps Research Institute*, localizado em La Jolla – California – EUA.

2.2. Obtenção, identificação e manutenção fúngica

O isolado ARSEF 2521 de *Metarhizium* spp. (Homoptera: Cercopidae (*Deois* sp. – Paraná - Brasil) foi gentilmente cedido pela *Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures* (United States of America) ao Laboratório de Controle Microbiano da UFRRJ para realização do presente estudo. Previamente aos experimentos, o isolado ARSEF 2521 foi identificado genotipicamente pela equipe da Prof. Patrícia Gôlo, seguindo a metodologia descrita por Bischoff et al. (2009), como *Metarhizium anisopliae* s.s. (data ainda não publicados). O crescimento fúngico foi realizado num período de 15 dias em placas de Petri (90 x 15 mm - Prolab[®]) contendo 23 mL de meio batata-dextrose-ágar (BDA) (Kasvi[®]) sob condições controladas de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($\geq 80\%$).

2.3. Curva de sobrevivência à menadiona

A influência do estresse oxidativo foi avaliada através da determinação do percentual da germinação fúngica realizada em meio BDA + Benomil 0,002%, suplementado com diferentes concentrações (0,01; 0,03; 0,06; 0,09; 0,11 e 0,13 mM) de menadiona (Sigma-Aldrich[®]). Para a quantificação, 20 μL de uma suspensão (10^5 conídios/mL) contendo Tween 80 0,1% foram inoculados no centro de cada placa (5 mL de volume total), sendo mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e U. R. $\geq 80\%$ por 24 horas. A curva de sobrevivência foi determinada após 24h após germinação com auxílio de algodão azul (lactofenol) (NewProv[®]), tendo 300 conídios contados por campo em três réplicas. Todo o experimento foi repetido três vezes, sendo a concentração letal 50% (CL50) e o intervalo de confiança (α) determinados com suporte do programa Polo PC (Leora Software[®]) (adaptado de AZEVEDO et al., 2014).

2.4. Produção conidial e extração de proteínas após crescimento em meio sólido

Ao avaliar o efeito da menadiona sobre o crescimento radial da colônia e a conidiogênese, o isolado ARSEF 2521 foi crescido em meio BDA suplementado (BDA + MEN) ou não (BDA CTR) com uma subdosagem (metade da CL50 – 0,019 mM) sob condições

controladas ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} \geq 80\%$) por 14 dias a partir da inoculação de $10\ \mu\text{L}$ de uma suspensão contendo 10^5 conídios/mL no centro de cada placa (triplicata). Após o cultivo, foram avaliadas características como o diâmetro total - mensurado com auxílio de calíper digital (StarFer[®] - resolução de 0,01 mm) - além de variações fenotípicas na aparência, aspecto, coloração da massa conidial, presença de exsudato, além de aspecto e coloração do reverso da colônia.

Para a contagem dos conídios de cada placa (BDA + MEN e BDA CTR) foram realizados 3 cortes de $1,54\ \text{cm}^2$ com auxílio de *punch* cirúrgico previamente esterilizado (Rhosse[®]) advindos do centro, da região mediana e da periferia da colônia. Após coleta, os *spots* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina (NaCl 0,9% p:v) acrescidos de Tween 80 a 0,1% (v:v) e agitados vigorosamente por 1 minuto em vórtex (Kasvi[®]). A contagem foi realizada ao microscópio óptico em câmara de Neubauer, sendo a concentração final determinada por cm^2 de área de colônia (FREGONESI et al., 2016). Nove réplicas provenientes de três repetições foram analisadas e o teste T aplicado para obtenção das diferenças estatísticas (GraphPad Prism[®]).

Os conídios foram removidos do meio de cultivo com auxílio de shaker vibratório e passagem por peneira de $50\ \mu\text{m}$ (A Bronzinox[®]). Na sequência, as proteínas da superfície de conídios (PSC) e da porção intracitoplasmática conidial (PIC) foram extraídas para quantificação das atividades enzimáticas. Em PSC, os conídios de cada grupo foram pesados e suspensos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + Triton X-100 0,25% (v/v) (1: 2,5; p/v). Após agitação em vórtex por 5 min, o sobrenadante foi filtrado em filtro de $0,2\ \mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich Millipore[®]), congelado e armazenado a -80°C (SANTI et al., 2010 a). PIC foi obtida após o precipitado ser rapidamente congelado em nitrogênio líquido e mecanicamente macerado com auxílio de grau e pistilo, liberando as proteínas intracelulares; extração, filtração e estocagem foram realizadas conforme descrito para PSC.

2.5. Virulência para larvas de *Rhipicephalus microplus*

Todos os espécimes de *R. microplus* foram obtidos a partir de infestações artificiais em bezerros previamente aprovada pelo Comitê de Ética Animal da UFRRJ (CEUA/UFRRJ - nº 307/2014). Os ensaios biológicos foram realizados três vezes e compostos por um grupo controle (expostos apenas a Tween 80 0,1%) e dois grupos (BDA + MEN e BDA CTR) com quatro diferentes suspensões de conídios (10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios mL^{-1}) cada. Cada grupo tratado contendo 10 tubos com aproximadamente 1000 larvas (50 mg de ovos) recebeu a inoculação de 1 mL da respectiva suspensão; o mesmo foi realizado para o grupo controle, entretanto utilizando água destilada estéril e Tween 80 0,01%. As larvas foram submersas por três minutos, o excesso de suspensão retirado e o percentual de mortalidade estimado 5, 10, 15 e 20 dias após tratamento (QUINELATO et al., 2012).

O experimento foi repetido três vezes a partir de três placas individualizadas, sendo aplicado os testes de Kruskal-Wallis seguido de Student-Newman-Keuls (SNK) ($p < 0,05$) com auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software[®]) (FERNANDES et al., 2011). A concentração letal 50% (CL50) foi obtida através da análise de próbites ao final do experimento com o auxílio do programa POLO PC (Leora Software[®]).

2.6. Preparação, crescimento em meio basal e extração de proteínas

Setenta mililitros de meio basal líquido (MB - NaNO_3 0,6%, glicose 0,2%, peptona 0,2% e extrato de levedura 0,05%) (BEYS-DA-SILVA et al., 2014) acrescido de 1% de cutícula de *R. microplus* foram preparados em triplicata para o crescimento. Inicialmente, as fêmeas ingurgitadas foram lavadas em água destilada e os órgãos internos retirados por pressão mecânica após corte na região anterior. As cutículas foram previamente enxaguadas em solução

de hipoclorito a 0,05%, autoclavadas, secas a 50°C por 5 min e adicionadas ao MB (MBRm). Para os experimentos, dois grupos foram formados, sendo o primeiro suplementado com metade da CL50 de menadiona (MBRm + MEN) e o segundo somente MBRm utilizado como condição controle. Em cada grupo foi inoculada uma suspensão na concentração de 10⁵ conídios/mL (1 mL) e o crescimento ocorreu em agitador orbital a 28°C e 150 rpm por 72 hs.

Neste estudo, as análises proteômicas foram focadas apenas no secretado micelial de *M. anisopliae* (SEM); entretanto, para melhor entendimento, as atividades enzimáticas de algumas proteínas intracelulares miceliais também foram analisadas aqui (PIM). A extração de proteínas foi realizada após adição de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + Triton X-100 0,25% (v/v) e homogeneização vigorosa manual durante 5 min. As culturas foram filtradas através de um filtro de papel Whatman nº1 e o micélio separado da fração líquida (SANTI et al., 2010 a). Para SEM, cinco mililitros de cada réplica foram novamente filtrados em um filtro de 0,2 µm (Millipore®), congelados e armazenados a -80°C para ensaios enzimáticos. Sessenta e cinco mililitros de cada amostra de cultura foram imediatamente fervidos por 15 minutos para inativar atividades proteolíticas, congelados a -80°C e liofilizados para análise proteômica (BEYS-DASILVA et al., 2014). Para o PIM, os micélios foram pesados, ultra-congelados e macerados em nitrogênio líquido, sendo a extração das proteínas e armazenamento segundo reportado acima.

2.7. Dosagem de proteínas totais

Previamente às análises enzimáticas e proteômicas, a quantidade de proteínas totais de PSC, PIC, SEM e PIM foram determinadas utilizando o método do ácido bicinconínico (BCA – ThermoFisher Cientific®) a partir da albumina sérica bovina como padrão.

2.8. Preparação das amostras para espectrometria de massas

Os sobrenadantes liofilizados (MBRm e MBRm + MEN) foram ressuspensos em pequenos volumes de água ultra purificada (JTBaker®) e precipitados utilizando metanol/clorofórmio. Após precipitação, as amostras foram secas a 37°C e ressuspensas novamente em água. Aproximadamente 100 µg de proteína de cada grupo foram dissolvidos em tampão de digestão (ureia 8 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,5) segundo descrições de Beys-da-Silva et al. (2014). Na sequência, as proteínas foram reduzidas com Tris-2-carboxietil-fosfina (TCEP) 5 mM por 20 min, alquiladas com iodoacetamida (IAA) 10 mM por 15 min a temperatura ambiente e digeridas com 2 µg de tripsina (Promega®) por incubação a 37°C por 16 h. A proteólise foi paralisada pela adição de ácido fórmico a uma concentração final de 5% (v/v) e as amostras centrifugadas a 14.000 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C. No total, três repetições biológicas e três réplicas técnicas foram analisadas para ambas as condições analisadas.

2.9. Espectrometria de massas, identificação de proteínas e análise de dados

Os peptídeos trípticos foram carregados em colunas previamente empacotadas com 2,5 cm de resina de troca iônica e 2 cm de resina para fase reversa para a espectrometria de massas utilizando a técnica de *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT) (WASHBURN et al., 2001). Na sequência, os mesmos foram separados em coluna de 11 cm (fase reversa) e analisados em espectrômetro de massas do tipo LTQ-XL (Thermo Finnigan, Palo Alto, CA) com 12 passos de separação com diferentes concentrações de sal (BEYS-DASILVA et al., 2014). Os tampões utilizados foram os seguintes: tampão A (acetonitrila 5% e ácido fórmico 0,1%), tampão B (acetonitrila 80% e ácido fórmico 0,1%) e tampão C (acetato de amônio 500 mM, acetonitrila 5% e ácido fórmico 0,1%).

A identificação de proteínas e análises de quantificação foram feitas utilizando o software Integrated Proteomics Pipeline (IP2 - www.integratedproteomics.com). As proteínas identificadas foram comparadas ao banco de dados contendo o genoma de *M. anisopliae* disponível no NCBI. O software PatternLab foi utilizado para identificar proteínas diferencialmente expressas (módulo TFold) ou exclusivas (módulo AAPV) das condições analisadas. As proteínas que não foram detectadas em, pelo menos, quatro das seis corridas por condição, foram desconsideradas. Para as diferencialmente expressas foram utilizados os seguintes parâmetros: $p \leq 0,001$ e *fold change* maior ou igual a 2 (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). O software Blast2GO (<http://www.blast2go.org>) foi usado para categorizar as proteínas de acordo com o Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>), nos níveis: atividade biológica e função molecular. Outras ferramentas de bioinformática também foram utilizadas para investigar características das proteínas identificadas por MudPIT: TargetP 1.0 e TMHMM 2.0, para predição da localização subcelular, e OrthoMCL (<http://orthomcl.org/orthomcl>) para buscar proteínas ortólogas em outras espécies fúngicas.

2.10. Ensaios enzimáticos e validação dos dados proteômicos

Nas amostras de CSP e ICP, todos os ensaios proteolíticos e antioxidantes foram realizados como descrito para Santi et al. (2010 a). Para ensaios de protease, substratos cromogênicos sintéticos na concentração de 0,1 mM foram utilizados, tais como DL-BAPNA (benzoyl-DL-arginina- ρ NA), Pr1 (serinoprotease do tipo subtilisina - Suc-ala-ala-pro-phe- ρ NA), Pr2 (serinoprotease do tipo tripsina - Suc-ala-ala-pro-phe- ρ NA). A cinética enzimática foi monitorada a 37°C por 30 min em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices®) equipado com termostato e sistemas de agitação. A atividade específica de protease foi definida como a quantidade de enzima que produz um μ mol de ρ -nitroanilina por hora por mg de proteína. A atividade de CAT foi determinada a 240 nm ($E = 39,4 \text{ mm cm}^{-1}$) utilizando peróxido de hidrogênio como substrato, cuja atividade específica de catalase foi definida como a quantidade de enzima que decompõe um μ mol de H_2O_2 por hora por mg de proteína. Para SOD, o ensaio foi conduzido em 560 nm com nitrobluetetrazolium (NBT) como substrato, sendo uma unidade SOD definida por redução de NBT por mL h^{-1} . A atividade da peroxidase foi determinada pela produção de tetraguaiacol a 470 nm e uma unidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar 0,001 em absorvância por h^{-1} .

Para SEM e PIM, ensaios de BAPNA, Pr1, Pr2 e carboxipeptidase (N-Bz-L-tyr- ρ NA) foram utilizados. Os ensaios foram realizados em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 a 37°C durante 30 minutos e as cinéticas enzimáticas avaliadas a 405 nm em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices®) equipado com termostato e sistemas de agitação (SANTI et al., 2010). Para CAT e SOD, as condições foram semelhantes às aquelas acima descritas para CSP e ICP.

Os dados proteômicos foram validados através da correlação dos resultados encontrados com os ensaios enzimáticos de SEM e PIM para proteases, catalase e SOD. Todos os resultados enzimáticos representam a média de três experimentos independentes com três repetições cada. Os dados foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) com o software GraphPad Prism 6.0. (GraphPad Software®).

3 RESULTADOS

3.1. Tolerância à menadiona

O isolado ARSEF 2521 apresentou baixa tolerância à menadiona (Figura 1), reduzindo o percentual de germinação em função do aumento da concentração do agente, no qual foi

possível registrar uma CL50 inferior a 0,04 mM ($p = 0,0347$; $n = 9$) (Figura 1A). Além disto, foi observado na menor concentração proposta (0,01 mM - Figura 1B), conídios com citoplasma intensamente corados e tubo germinativo desenvolvido na grande maioria dos esporos quantificados (seta vermelha). Em contrapartida, para aqueles expostos à maior concentração de menadiona (0,13 mM – Figura 1C), além de total inibição da germinação, discretas retrações citoplasmáticas foram observadas (seta preta).

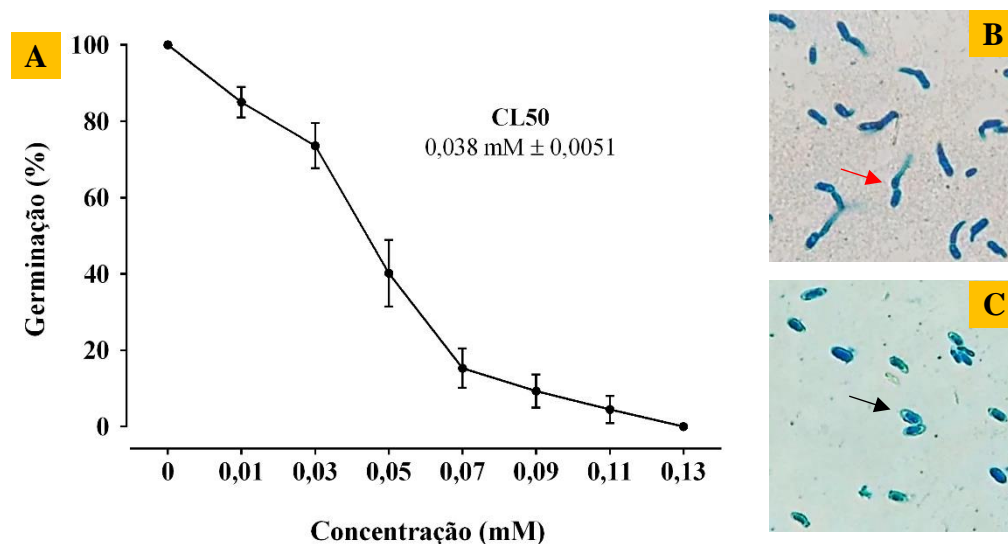


Figura 1 – Média \pm desvio padrão da germinação (%) de *Metarhizium anisopliae* s.s. em BDA suplementado com diferentes concentrações (mM) de menadiona (A). BDA + 0,01 mM visualizado a 1000x - conídios com citoplasma intensamente corados e tubo germinativo desenvolvido na grande maioria dos esporos quantificados – **seta vermelha** (B); BDA + 0,13 mM visualizado a 1000x - total inibição da germinação e discretas retrações citoplasmáticas - **seta preta** (C). Os valores médios, as barras de desvio e CL50 representam a variação encontrada nas nove amostras analisadas ($n = 9$; $p < 0,05$).

3.2. Crescimento em meio sólido e produção conidial

Quanto à produção conidial, a adição de menadiona ao meio BDA reduziu em aproximadamente 40% a concentração final de conídios quantificados ($p = 0,0372$; $n = 6$) (Figura 2A), apresentando valores médios para BDA CTR de $1,62 \times 10^7$ conídios/cm² (variação entre $1,44$ e $2,83 \times 10^7$ conídios/cm²) e BDA + MEN de $0,97 \times 10^7$ conídios/cm² (variação entre $0,86$ e $1,05 \times 10^7$ conídios/cm²).

Em relação ao desenvolvimento de colônias, quando comparados o crescimento em BDA + MEN com BDA CTR, não foram observadas variações significativas entre os grupos, com o diâmetro médio registrado entre 59,3 e 62 mm. Em relação ao fenótipo do isolado, as colônias crescidas em BDA CTR apresentaram coloração verde oliva, aparência lisa, crescimento zonado, aspecto pulverulento durante toda a extensão colonial e reverso de cor amarelo claro (Figura 2B). Já em BDA + MEN, as colônias apresentaram-se de coloração verde amarelada, com a cor verde oliva restrita ao centro, aparência lisa, crescimento zonado, aspecto pulverulento central, presença de exsudato hialino e reverso amarelo claro, com conídios concentrados mais ao centro e se dispersando na periferia da colônia, que terminava com uma pequena borda de micélio branco com aspecto algodinoso (Figura 2C).

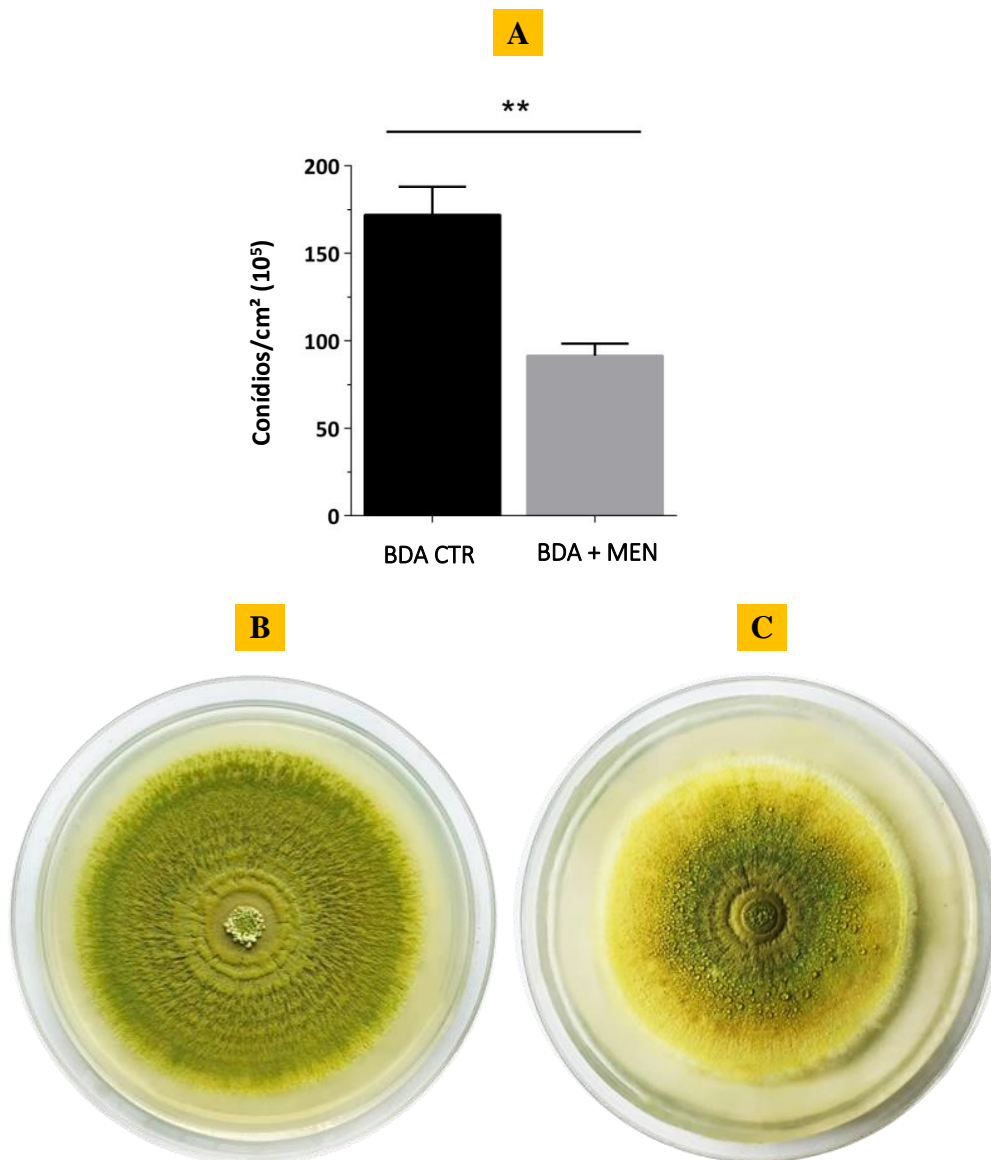


Figura 2 – Produção conidial (conídios/cm²) (A) e variações fenotípicas de *Metarhizium anisopliae* s.s. em BDA CTR (B) ou acrescido de metade da CL50 (0,019 mM) de MEN (C).

3.3. Ensaio biológico com larvas de *Rhipicephalus microplus*

O efeito sobre a virulência para larvas está representado na Tabela 1. Ao término do experimento, ambas as condições de crescimento (BDA CTR e BDA + MEN), especialmente as maiores concentrações conidiais, foram consideradas eficazes no controle de larvas de *R. microplus*. No geral, quando comparados entre si e na mesma concentração conidial (10^8 conídios/mL), BDA + MEN apresentou melhor eficácia do que BDA CTR, registrando percentuais de mortalidade superiores de aproximadamente 6,4 vezes após 5 dias de tratamento; 3,2 vezes após 10 dias de tratamento e 1,5 vezes após 15 dias de tratamento.

Quando avaliada as concentrações letais de ambos os grupos em um mesmo dia, as CL50 de BDA CTR foram numericamente superiores às de BDA + MEN (Tabela 2) até o 15º dia de análise, endossando assim o aumento da eficácia fúngica em função da presença de menadiona no meio de cultura.

Tabela 1 - Percentual médio \pm desvio padrão de mortalidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* 5, 10, 15 e 20 dias após a exposição a suspensões aquosas em diferentes concentrações fúngicas de *Metarhizium anisopliae* s.s., crescido por 15 dias em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado (BDA + MEN) ou não (BDA CTR) com menadiona.

| Dias após exposição | Controle | BDA CTR | | | | BDA + MEN | | | |
|---------------------|-----------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|--|--------------------|---------------------|-------------------|
| | | Concentração de conídios (mL ⁻¹) | | | | Concentração de conídios (mL ⁻¹) | | | |
| | | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ | 10 ⁸ | 10 ⁵ | 10 ⁶ | 10 ⁷ | 10 ⁸ |
| 5° dia | 0,3 \pm 0,5 a | 1,0 \pm 0,7 a | 1,2 \pm 0,4 a | 3,9 \pm 1,4 bc | 5,4 \pm 1,5 b | 1,6 \pm 0,7 ac | 4,5 \pm 3,3 bc | 10,0 \pm 3,3 bd | 35,0 \pm 7,8 d |
| 10° dia | 0,5 \pm 0,8 a | 5,5 \pm 1,6 ac | 6,4 \pm 2,5 ac | 18,0 \pm 6,3 d | 20,5 \pm 8,6 b | 8,5 \pm 4,1 c | 10,0 \pm 4,1 bcd | 24,5 \pm 10,1 bde | 66,5 \pm 11,1 e |
| 15° dia | 1,0 \pm 0,9 a | 8,0 \pm 2,6 ac | 7,4 \pm 2,8 ac | 20,0 \pm 5,2 be | 58,0 \pm 11,4 b | 13,5 \pm 4,1 ce | 11,0 \pm 3,9 ce | 54,5 \pm 19,6 bd | 86,5 \pm 7,8 d |
| 20° dia | 1,8 \pm 0,5 a | 9,0 \pm 2,1 ac | 11,5 \pm 4,1 bc | 52,2 \pm 12,3 d | 86,0 \pm 9,7 d | 17,0 \pm 6,7 b | 16,0 \pm 7,4 b | 58,0 \pm 19,9 d | 95,8 \pm 5,6 de |

Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido por SNK ($P \geq 0,05$)

Tabela 2 – Concentração letal 50% (CL 50) de *Metarhizium anisopliae* s.s. crescidos em BDA + MEN e BDA CTR, obtida a partir de ensaios biológicos com larvas de *Rhipicephalus microplus* 5, 10, 15 e 20 dias após o tratamento.

| | Grupos | CL50 (conídios/mL) | Intervalo de confiança (conídios/mL) | P valor |
|---------|-----------|---------------------------------|---|-------------|
| 5° dia | BDA CTR | CL 50 = $2,1248 \times 10^{14}$ | $6,5259 \times 10^{12} - 6,9183 \times 10^{16}$ | $\leq 0,01$ |
| | BDA + MEN | CL 50 = $4,9600 \times 10^9$ | $3,5255 \times 10^8 - 6,9780 \times 10^{10}$ | |
| 10° dia | BDA CTR | CL 50 = $3,3199 \times 10^{12}$ | $2,2758 \times 10^{10} - 4,8430 \times 10^{15}$ | $\leq 0,01$ |
| | BDA + MEN | CL 50 = $4,6990 \times 10^9$ | $1,1966 \times 10^8 - 1,8445 \times 10^9$ | |
| 15° dia | BDA CTR | CL 50 = $1,3990 \times 10^9$ | $2,0169 \times 10^8 - 9,7040 \times 10^9$ | $\leq 0,05$ |
| | BDA + MEN | CL 50 = $8,1236 \times 10^7$ | $3,3998 \times 10^7 - 1,9410 \times 10^8$ | |
| 20° dia | BDA CTR | CL 50 = $3,8793 \times 10^8$ | $1,0517 \times 10^8 - 1,4308 \times 10^9$ | 0 |
| | BDA + MEN | CL 50 = $4,5156 \times 10^7$ | $2,0001 \times 10^7 - 1,0195 \times 10^8$ | |

3.4. Atividade enzimática conidial

Embora as atividades antioxidantes tenham sido superiores na PIC do que PSC para ambos os grupos, os conídios de BDA + MEN apresentaram as maiores atividades nos ensaios de CAT, PER e SOD (Tabela 3). Em contraste com o grupo controle, as atividades de Pr1 e Pr2 também foram superiores, em especial dentro dos conídios, quando crescidos em meio suplementado com MEN.

Tabela 3 - Atividades enzimáticas das proteínas de superfície conidial (PSC) e intracitoplasmáticas (PIC) de conídios de *Metarhizium anisopliae* s.s. crescidos em BDA CTR e BDA + MEN.

| | BDA CTR | | BDA + MEN | |
|------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | PSC | PIC | PSC | PIC |
| <i>Proteases</i> | | | | |
| BAPNA | 0,037 ± 0,0053 a | 0,129 ± 0,0090 b | 0,088 ± 0,0023 c | 0,084 ± 0,0089 c |
| Pr1 | 20,03 ± 0,47 a | 16,26 ± 1,22 b | 14,09 ± 0,51 c | 26,79 ± 0,78 d |
| Pr2 | 3,09 ± 0,29 a | 2,70 ± 0,08 b | 2,60 ± 0,09 b | 4,40 ± 0,22 c |
| <i>Enzimas antioxidantes</i> | | | | |
| Catalase | 301,89 ± 28,69 a | 1130,35 ± 18,72 b | 67,34 ± 4,26 c | 4017,34 ± 31,26 d |
| Peroxidase | 328,93 ± 5,44 a | 178,41 ± 4,23 b | 39,80 ± 1,26 c | 629,63 ± 4,70 d |
| Superóxido desmutase | 33,18 ± 2,99 a | 213,56 ± 19,16 b | - | 990,36 ± 26,63 c |

Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste t ($P \geq 0,05$)

(-) – Atividades não detectadas por meio do ensaio enzimático

3.5. Análise proteômica

O efeito da menadiona nas proteínas detectadas no secretado micelial encontra-se disposto na Figura 3. Foram identificadas um total de 654 proteínas, sendo cerca de 48% detectadas em ambas as condições, 24,8% exclusivamente no controle (MBRm) e 27,2% na presença de menadiona (MBRm + MEN).

Entre as proteínas identificadas em ambas as condições (Tabela 4), MBRm apresentou em destaque enzimas relacionadas à infecção (Pr1B) e à oxidação de moléculas (catalase e oxidases). Em contrapartida, MBRm + MEN apresentou proteínas possivelmente relacionadas à conidiogênese (*GPI anchored protein*) e peptidases, incluindo dois subtipos de Pr1 (D e K) (Tabela 4).

Na classificação das proteínas em processos biológicos foram observadas proteínas relacionadas com a produção de precursores de metabólitos e atividade energética, resposta ao estresse e ao metabolismo de aminoácidos e lipídeos em MBRm + MEN, enquanto que no meio controle (MBRm), proteínas relacionadas à tradução, processos catabólicos e metabólicos foram as mais abundantes (Figura 4A). Quanto à função molecular, proteínas relacionadas a ligação a íons e oxidorredutase foram abundantes em ambas as amostras. Interessantemente, atividade de peptidase foi proeminente no secretoma do fungo tratado com MEN (Figura 4B).

Figura 3 – Diagrama de Venn da distribuição de proteínas de *Metarhizium anisopliae* s.s. a partir de secretado micelial obtido após 72 horas de crescimento em meio basal acrescido de cutícula de *Rhipicephalus microplus* (1%) e suplementado (MBRm + MEN) ou não (MBRm) com menadiona. Dados obtidos com o módulo AAPV do PatternLab com probabilidade de 0,01.

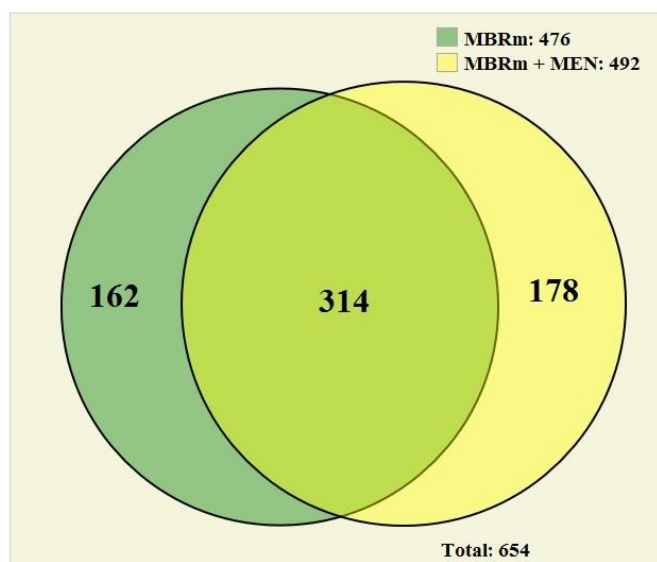


Tabela 4 – Proteínas diferencialmente expressas, presente em ambas as condições, identificadas no secretoma de *Metarhizium anisopliae* s.s. após 72 horas de crescimento em meio basal com cutícula de *R. microplus* suplementado com menadiona (MBRm + MEN) em comparadas à condição controle (MBRm).

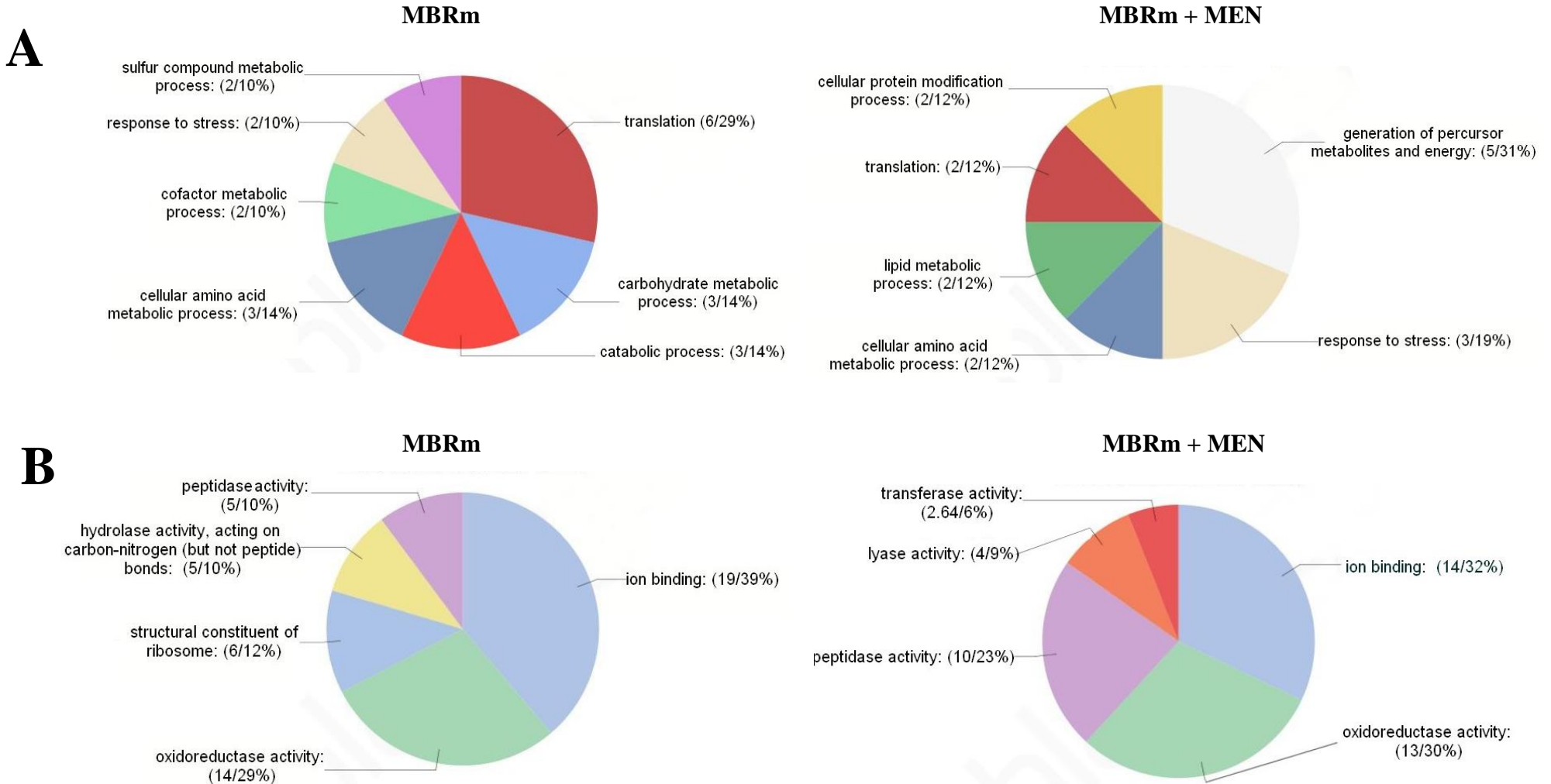
| Número de acesso | Fold Change ^{a,b} | Valor de p | Identificação proteica ^b |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------|---|
| gi 672380775 gb KFG82971.1 | 19,00 | $5,27 \times 10^{-9}$ | subtilisin-like protease Pr1B |
| gi 672378859 gb KFG81088.1 | 17,00 | $1,00 \times 10^{-5}$ | DNaseI protein |
| gi 672378460 gb KFG80697.1 | 9,50 | 0,000373 | lactonohydrolase |
| gi 672383272 gb KFG85387.1 | 7,71 | $1,00 \times 10^{-5}$ | ThiJ/PfpI family protein |
| gi 672380964 gb KFG83158.1 | 5,83 | $1,00 \times 10^{-5}$ | Catalase |
| gi 672383693 gb KFG85802.1 | 5,49 | $1,00 \times 10^{-5}$ | 1,2-a-D-mannosidase |
| gi 672382899 gb KFG85018.1 | 4,50 | 0,002312 | tyrosinase 2 |
| gi 672383860 gb KFG85966.1 | 3,80 | $1,00 \times 10^{-5}$ | hypothetical protein MANI_011378 |
| gi 672376891 gb KFG79171.1 | 3,75 | 0,000234 | NHL repeat-containing |
| gi 672378469 gb KFG80706.1 | 3,28 | $1,00 \times 10^{-5}$ | hypothetical protein MANI_111186 |
| gi 672378520 gb KFG80755.1 | 2,73 | 0,000626 | glucose oxidase, putative |
| gi 672379708 gb KFG81918.1 | 2,38 | 0,000914 | chitooligosaccharide oxidase |
| gi 672383059 gb KFG85176.1 | 2,38 | $1,00 \times 10^{-5}$ | secreted protein |
| gi 672376879 gb KFG79160.1 | 2,35 | 0,000289 | 4MeS |
| gi 672384717 gb KFG86811.1 | 2,19 | $1,00 \times 10^{-5}$ | WSC domain containing protein |
| gi 672380805 gb KFG83000.1 | -2,20 | $1,00 \times 10^{-5}$ | subtilisin-like protease PR1D |
| gi 672384190 gb KFG86290.1 | -4,19 | 0,000261 | nucleoside diphosphate kinase 1 |
| gi 672380015 gb KFG82223.1 | -5,13 | 0,000308 | serine peptidase, putative |
| gi 672383424 gb KFG85536.1 | -5,79 | 0,000155 | peroxisomal membrane protein, putative |
| gi 672376840 gb KFG79123.1 | -6,10 | $1,00 \times 10^{-5}$ | trypsin-related protease |
| gi 672381981 gb KFG84128.1 | -7,20 | 0,000102 | subtilisin-like protease PR1K |
| gi 672382585 gb KFG84709.1 | -7,22 | 0,000112 | GPI anchored protein, putative |
| gi 672380121 gb KFG82327.1 | -13,60 | $1,00 \times 10^{-5}$ | acetyl esterase |
| gi 672381527 gb KFG83708.1 | -19,56 | $1,00 \times 10^{-5}$ | carboxypeptidase Y precursor |
| gi 672375254 gb KFG77596.1 | -22,71 | $1,00 \times 10^{-5}$ | trypsin-related protease |
| gi 672379217 gb KFG81437.1 | -28,24 | $1,00 \times 10^{-5}$ | pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase family protein |

Tabela 4 – Continuação.

| | | | |
|----------------------------|--------|-----------------------|---|
| gi 672380790 gb KFG82985.1 | -32,40 | $1,00 \times 10^{-5}$ | alpha/beta-hydrolase |
| gi 672375697 gb KFG78015.1 | -36,00 | $8,01 \times 10^{-9}$ | alkaline serine protease AorO, putative |
| gi 672379279 gb KFG81495.1 | -58,89 | $1,00 \times 10^{-5}$ | hypothetical protein MANI_006852 |

^a diferenças estatísticas calculadas pelo módulo TFold do programa PatternLab, usando *fold change* superior a 2 e estando as proteínas presentes em pelo menos 4 replicatas; ^b baseado no número de *spectral count* detectados. Valores positivos indicam proteínas reguladas positivamente em MBRm, e valores negativos indicam proteínas reguladas positivamente em MBRm + MEN.

Figura 4: Categorização de proteínas diferencialmente expressas identificadas no secretoma de *Metarhizium anisopliae* em meio basal líquido com cutícula de *R. microplus* (MBRm) e contendo menadiona (MBRm + MEN). Classificação em (A) processo biológico e (B) função molecular.



Na caracterização do perfil exclusivo de MBRm + MEN, enzimas envolvidas com estresse oxidativo (SOD e oxidorreductase), penetração/degradação da cutícula (lipase, carboxipeptidase, feruloilesterase), além de diversas proteínas relacionadas à adesão (hidrofobinas) e ao metabolismo celular foram identificadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfil de proteínas identificadas exclusivamente no secretoma de *Metarhizium anisopliae* s.s. após 72 horas de crescimento em meio basal com cutícula de *R. microplus* suplementado com menadiona (MBRm + MEN).

| Número de acesso | Spectral Count | Identificação proteica |
|----------------------------|----------------|--|
| gi 672376691 gb KFG78977.1 | 18 | arginine deiminase type-3 |
| gi 672379163 gb KFG81383.1 | 16 | malate dehydrogenase |
| gi 672375572 gb KFG77893.1 | 13 | citrate synthase 2 |
| gi 672380126 gb KFG82332.1 | 12 | serine-type carboxypeptidase |
| gi 672385215 gb KFG87304.1 | 12 | beta-1,3-glucanase precursor |
| gi 672384231 gb KFG86330.1 | 6 | putative GPI anchored protein |
| gi 672382199 gb KFG84331.1 | 5 | Hydrophobin-like protein ssgA |
| gi 672377450 gb KFG79720.1 | 5 | methyltransferase SirN-like protein |
| gi 672384636 gb KFG86731.1 | 5 | cell wall protein |
| gi 672384701 gb KFG86795.1 | 5 | hydrophobin-like protein ssgA |
| gi 672380219 gb KFG82425.1 | 5 | putative aconitate hydratase |
| gi 672378086 gb KFG80341.1 | 5 | acid trehalase |
| gi 672376787 gb KFG79071.1 | 4 | nitroreductase family protein |
| gi 672385194 gb KFG87283.1 | 4 | Superoxide dismutase |
| gi 672378478 gb KFG80715.1 | 4 | dienelactone hydrolase family protein |
| gi 672375320 gb KFG77657.1 | 4 | TRI14-like protein |
| gi 672380515 gb KFG82719.1 | 4 | Secretory lipase family protein |
| gi 672377459 gb KFG79729.1 | 4 | putative O-methyltransferase |
| gi 672376342 gb KFG78637.1 | 4 | TRI14-like protein |
| gi 672375570 gb KFG77891.1 | 4 | flavo-hemoglobin |
| gi 672381780 gb KFG83957.1 | 4 | ribonuclease T2 precursor |
| gi 672383295 gb KFG85410.1 | 4 | arginine deiminase type-3 |
| gi 672381955 gb KFG84106.1 | 3 | isocitrate lyase, partial |
| gi 672377892 gb KFG80154.1 | 3 | putative phenazine biosynthesis protein |
| gi 672377534 gb KFG79802.1 | 3 | hypothetical protein MANI_008979 |
| gi 672384801 gb KFG86895.1 | 3 | glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase |
| gi 672386142 gb KFG88225.1 | 3 | oxidoreductase, 2-nitropropane dioxigenase family |
| gi 672375043 gb KFG77490.1 | 3 | carboxy-cis,cis-muconate cyclase |
| gi 672381054 gb KFG83246.1 | 3 | 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component |
| gi 672376814 gb KFG79098.1 | 2 | cell wall protein |
| gi 672385551 gb KFG87638.1 | 2 | extracellular matrix protein precursor |
| gi 672379536 gb KFG81751.1 | 2 | cytochrome c |
| gi 672379337 gb KFG81553.1 | 2 | alpha/beta-hydrolase |
| gi 672377760 gb KFG80025.1 | 2 | putative Xaa-Pro aminopeptidase pepP |
| gi 672376139 gb KFG78441.1 | 2 | 40S ribosomal protein S11 |
| gi 672382594 gb KFG84716.1 | 2 | putative 3-ketosteroid-delta-1-dehydrogenase |
| gi 672380302 gb KFG82508.1 | 2 | carboxy-cis,cis-muconate cyclase |
| gi 672381486 gb KFG83670.1 | 2 | laccase |
| gi 672380900 gb KFG83094.1 | 2 | nitrate reductase |
| gi 672381172 gb KFG83361.1 | 2 | 0S ribosomal protein S3, putative |
| gi 672379991 gb KFG82199.1 | 2 | hypothetical protein MANI_019226 |
| gi 672377985 gb KFG80243.1 | 2 | feruloylesterase |
| gi 672383347 gb KFG85461.1 | 2 | adenosine kinase |
| gi 672382272 gb KFG84403.1 | 2 | 3-ketoacyl-CoA thiolase |
| gi 672384090 gb KFG86191.1 | 2 | saccharopine dehydrogenase |
| gi 672385910 gb KFG87996.1 | 2 | putative (S)-2-hydroxy-acid oxidase |
| gi 672385459 gb KFG87547.1 | 2 | Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing protein |
| gi 672384590 gb KFG86685.1 | 2 | succinate dehydrogenase flavoprotein subunit precursor |

3.6. Validação dos dados proteômicos

A fim de confirmar os dados proteômicos, ensaios enzimáticos foram realizados com as amostras PSM e PIM (Tabela 6). A atividade de CAT foi superior no meio MBRm, tanto para PSM e PIM. Para SOD, atividades enzimáticas foram detectadas exclusivamente no secretoma do meio contendo menadiona; em relação à PIM, atividades superiores foram registradas novamente para MBRm + MEN. Quando avaliadas as atividades de proteases, Pr1 foi detectada tanto MBRm quanto MBRm + MEN, com diferença de 1,6 vezes para o controle. Esta classe de proteases foi identificada diferencialmente regulada e em ambas as amostras, como observado no ensaio enzimático. Além disso, um aumento significativo de atividade de carboxipeptidase no secretoma exposto à menadiona foi observado.

Tabela 6 – Ensaios enzimáticos das proteínas da secretado micelial (PSM) e porção intracitoplasmática micelial (PIM) de *Metarhizium anisopliae* s.s. após 72hs de crescimento em meio basal com cutícula de *R. microplus* (MBRm) e suplementado com menadiona (MBRm + MEN).

| | PSM | | PIM | |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | MBRm | MBRm + MEN | MBRm | MBRm + MEN |
| <i>Ensaio antioxidantes</i> | | | | |
| Catalase | 1475,80 ± 64,84 a | 850,15 ± 55,6 b | 2388,95 ± 67,32 c | 1445,75 ± 75,59 a |
| Superóxido Dismutase | - | 3198 ± 324 a | 152 ± 28 b | 205 ± 33 c |
| <i>Ensaio proteolíticos</i> | | | | |
| BAPNA | 0,0221 ± 0,0003 a | 0,0226 ± 0,0008 a | 0,0720 ± 0,0024 b | 0,0561 ± 0,003 c |
| Pr1 | 4,79 ± 0,10 a | 2,96 ± 0,06 b | 1,65 ± 0,05 c | 1,87 ± 0,12 d |
| Carboxipeptidase | 0,52 ± 0,07 a | 3,61 ± 0,20 b | 0,86 ± 0,08 c | 0,73 ± 0,07 c |

Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente entre si através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste t ($P \geq 0,05$)

(-) – Atividades não detectadas por meio do ensaio enzimático

4 DISCUSSÃO

Como um fator relevante para a evolução de espécies fúngicas, o estresse oxidativo tem estado evolutivamente relacionado à persistência ambiental de *Metarhizium* (LOVETT; ST LEGER, 2015). No presente estudo, a germinação de conídios de *M. anisopliae* foi drasticamente reduzida em meio sólido (BDA) suplementado com MEN. A sensibilidade de algumas espécies de *Metarhizium* a essa molécula pró-oxidante já foi previamente relatada na literatura, e isolados com CL50 inferior a 0,08 mM, assim como o testado aqui, foram considerados pouco tolerantes (AZEVEDO et al., 2014). Acredita-se que a partir da indução de EROs intracelular, um possível dano citotóxico tenha ocorrido aos conídios do presente estudo, especialmente quando expostos às mais altas concentrações de MEN, uma vez que retrações citoplasmáticas foram observadas na maioria dos conídios não germinados. Para alguns organismos eucarióticos, EROs interagem primariamente com as membranas celulares,

ocasionando modificações na estrutura lipídica, aumentando a permeabilidade da parede celular e induzindo à apoptose através de metabolismo redox (AGUIRRE et al., 2006; MONTEIRO et al., 2013). Assim, por ser um potente agente indutor de EROs, a escolha de uma subdosagem de MEN (metade da CL50 – 0,019 mM) para o desenvolvimento de *M. anisopliae* objetivou caracterizar possíveis modificações ao metabolismo fúngico. Em meio sólido (BDA + MEN), alterações fenotípicas da colônia foram evidenciadas devido à indução de H₂O₂ intracelular. A presença de EROs já foram relacionadas à ocorrência de áreas setorizadas e intenso crescimento micelial para *M. anisopliae* (WANG et al., 2005). Em especial para isolados considerados não estáveis, degradações mitocondriais como a glicação do DNA mitocondrial e alterações do potencial de membrana são conhecidas e através da rápida oxidação biomolecular, podem comprometer funções biológicas vitais como o metabolismo energético. No entanto, de forma adaptativa, embora diminuam as taxas de replicação celular, mantém a integridade de componentes como o DNA genômico e a viabilidade (LI et al., 2008).

Para o gênero *Metarhizium*, respostas ao estresse oxidativo e sua relação com a tolerância aos fatores abióticos parecem ocorrer de forma bastante individualizada entre as espécies fúngicas. Em um estudo prévio que caracterizou o efeito de MEN para *M. robertsii* observou que a indução de EROs foi capaz de aumentar a tolerância ao calor, no entanto nem a produção de conídios nem a tolerância a UV-B foram afetadas (RANGEL et al., 2008). Já para isolados de *M. brunneum* e *M. anisopliae* s.l, considerados altamente tolerantes a MEN, alta sensibilidade ao calor e à radiação UV-B foram reportadas (BRAGA et al., 2001; RANGEL et al., 2005). Neste trabalho, a presença de MEN induziu à redução de aproximadamente 40% da produção conidial de *M. anisopliae*, porém aumentou a eficácia no controle de larvas de *R. microplus*. Melhorias na virulência têm sido primariamente relacionadas ao aumento da produção de metabólitos secundários ou enzimas por *Metarhizium*, no qual atuam acelerando a morte em hospedeiros colonizados (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). O entendimento da função de enzimas antioxidantes na colonização de artrópodes, bem como seus efeitos sobre a eficácia em *Metarhizium*, embora ainda reduzidos, tem sido crescente na última década (ZHANG; FENG, 2018). Atividades de SOD, CAT e PER, importantes enzimas relacionadas à proteção de fatores ambientais como radiação UV-B (RANGEL et al., 2004), já foram previamente detectadas na superfície de conídios de *M. anisopliae* (SANTI et al., 2010 a). Com localizações em membrana, citosol e mitocôndria, uma família de seis tipos de SOD (Sod1 a Sod6) foram identificadas em conídios de *M. robertsii*, sendo algumas (Sod1, Sod2 e Sod3) caracterizadas como importantes contribuintes no processo de desintoxicação de MEN e com potencial para melhoria de virulência, termotolerância e tolerância a UV-B (ZHU et al., 2018). Aqui, devido à alta atividade oxidativa intracelular, baixas atividades foram detectadas em PSC para BDA + MEN em relação ao controle, e elevadas em PIC. Baixas atividades enzimáticas, em especial SOD, podem caracterizar menor sensibilidade ao agente oxidante, o que por consequência, implica num acúmulo de H₂O₂ no citosol - extensivamente controlado por catalases e peroxidases. Com papel fundamental na penetração e desintoxicação de componentes cuticulares de *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae), uma proteína bifuncional catalase-peroxidase foi detectada em *M. acridum* (MakatG1), sendo que a deleção do gene *MakatG1* demonstrou maior susceptibilidade a MEN, além de redução das atividades de CAT, PER, germinação e formação de apressório (LI et al., 2017).

Enzimas proteolíticas secretadas durante a colonização em *R. microplus* têm demonstrado contribuir positivamente à virulência (PERINOTTO et al., 2013; 2014). Embora vertentes relacionem que a presença de Pr1 na superfície conidial possui correlação com a eficácia para insetos (SHAH et al., 2007), o crescimento sob estresse oxidativo parece induzir respostas contrárias. Os conídios de BDA + MEN demonstram atividade superior de Pr1 e Pr2 em PIC, além de reduzir as CL50 até o 15º dia pós-tratamento. Devido aos efeitos positivos em especial sobre a eficácia e sabendo que para carrapatos altas concentrações de *Metarhizium* spp.

são necessárias para matar uma porcentagem significativa da população (FERNANDES et al., 2012), é válido considerar o uso de MEN em subdosagens como suplemento em meios de cultivo como BDA, embora em casos de produção em larga escala, a redução do número de conídios deva ser contrabalanceada antes da utilização.

O sucesso da infecção se inicia com a interação do patógeno com a cutícula, seguida da internalização fúngica (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Sabe-se que a partir da interação hidrofóbica entre algumas proteínas apolares com a camada lipídica do hospedeiro, a penetração fúngica é realizada. Na presença de MEN, algumas proteínas foram exclusivamente detectadas, como exemplo, uma *cell wall protein*, que possui múltiplas atuações na morfogênese, patogenicidade, antigenicidade e defesa contra a resposta imunológica do hospedeiro, também contribuem para o aumento da hidrofobicidade (LI et al., 2010), além de duas *hydrophobin-like protein* (*ssgA*). Um estudo que avaliou a deleção de três genes relacionados à produção de uma hidrofobina classe I por *M. brunneum*, detectou reduções significativas no crescimento, esporulação, pigmentação de colônia, hidrofobicidade conidial e em particular redução de virulência para *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (SEVIM et al., 2012).

Proteínas relacionadas ao estresse, em especial os abióticos ou de origem oxidativa, como flavohemoglobinas e *GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchored protein* também foram observadas no secretado micelial a partir da exposição a MEN. Para fungos patogênicos, a flavohemoglobina tem atuação importante na proteção ao estresse nitrosativo, reparando danos moleculares e ajudando na sobrevivência após o contato inicial com o sistema imunológico do hospedeiro (BROWN et al., 2009). Sequências gênicas relacionadas à expressão dessa proteína já foram detectadas em *M. anisopliae* quando desenvolvido na cutícula de *R. microplus*, e podem contribuir positivamente durante a infecção no artrópode (DUTRA et al., 2004). Já *GPI anchored proteins* são proteínas envolvidas na integridade celular que possuem contribuições para a conidiogênese e proteção a múltiplos tipos de estresse. A deleção do gene *Mrecm33*, responsável pela produção de proteína *GPI* em *M. robertsii*, foi capaz de tornar o isolado mais sensível a diferentes agentes oxidantes (MEN e H₂O₂), bem como acarretou em falhas de desenvolvimento, diminuição da produção conidial, redução de termotolerância conidial e decréscimo da concentração intracelular de trealose (CHEN et al., 2014), dissacarídeo produzido por fungos que protegem proteínas e membranas da desnaturação causada pelo estresse oxidativo. De possível atuação no metabolismo celular principalmente como moeda energética em situações de estresse, a metabolização de trealose intracelular é baseada na ação da enzima trealase (ELBEIN et al., 2003). Previamente observada atividade enzimática na superfície conidial de *M. anisopliae* (SANTI et al., 2010 a) e detectada aqui na presença de MEN, relatos demonstram que a ocorrência dessa enzima foi capaz de aumentar a termotolerância de *M. acridum in vitro*, embora não possua efeitos sobre a virulência (LENG et al., 2011). Por fim, enzimas como lacase, uma polifenoloxidase que catalisa a reação de diversas substâncias intracelulares, também foram evidenciadas. Em *M. anisopliae*, uma lacase classe 1 (MLAC1) foi caracterizada em estágios tardios da infecção, como a conidiogênese no hospedeiro. Todavia, o gene *Mlac1* já foi detectado em apressórios, tubos germinativos na cutícula e em corpos hifais na hemocele. Deleções de *Mlac1* cursaram com aumento da sensibilidade ao calor e a radiação UV-B, formação de apressórios defeituosos, atraso em eventos pós-penetração cuticular e, por consequência, redução de virulência (FANG et al., 2010).

De uma maneira geral, o entendimento do processo de melhoria de virulência *in vitro* deve ser avaliado de forma multifatorial, relacionando proteínas envolvidas na capacidade patogênica do isolado àquelas expressas na morfogênese celular e proteção contra o estresse. Como esperado em uma resposta oxidativa, uma maior atividade enzimática de CAT foi detectada em PIM na presença de MEN. A atuação de CAT sobre EROs tem produzido efeitos positivos para *M. anisopliae*, sendo reportados em um estudo que avaliou a partir da

superexpressão do gene *cat1*, reduções no tempo de germinação, aumento do percentual de mortalidade de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) e maior tolerância à presença de H₂O₂ exógeno, particularmente no desenvolvimento de micélios (HERNANDEZ et al., 2010). De forma complementar, diversas hidrolases foram majoritariamente detectadas na presença de MEN. Durante a infecção, proteases do tipo tripsina atuam de forma precursora à atividade de Pr1, desencadeando cascatas de reações que facilitam a penetração na cutícula do hospedeiro (MANALIL et al., 2010). Ainda, carboxipeptidases em *M. anisopliae* têm sido relacionadas à atuação conjunta com enzimas como Pr1, possivelmente agindo de forma secundária na degradação de pequenos peptídeos e no suprimento de aminoácidos essenciais ao fungo nos períodos de privação de nitrogênio e carbono (ST LEGER et al., 1994). Como Pr1 é tida como marcador em potencial de virulência para *R. microplus* (PERINOTTO et al., 2013), a detecção de diferentes subfamílias de Pr1 (Pr1D e Pr1K) na presença de MEN neste estudo pode ter relação com os melhores resultados observados no controle *in vitro* de larvas. Em relatos anteriores, a adição de cutícula de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) em meio mínimo demonstrou aumento da expressão destas isoformas de Pr1, especialmente nas horas iniciais da infecção (FREIMOSER et al., 2005). O cultivo sobre cutícula de *R. microplus* em placas com 1% de ágar demonstraram a superexpressão de diversas isoformas de Pr1, incluindo Pr1K, que embora se mantivessem altas nas horas iniciais (48hs), retornavam aos níveis basais após passadas 144h (STAATS et al., 2014). Assim, por mais que tenha-se conhecimento da evolução das isoformas e sua relação com uma pressão seletiva para desenvolvimento (ANDREIS; SCHRANK; THOMPSON, 2019), mais estudos elucidando uma possível especificidade, bem como o real efeito do estresse oxidativo sobre a expressão e atuação destas proteases para a virulência *R. microplus*, seriam bastante esclarecedores para o controle de carrapatos.

Em síntese, os efeitos de MEN sobre a eficiência de *M. anisopliae* aplicado para controle *in vitro* de *R. microplus* até o presente estudo eram desconhecidos. Com modificações pertinentes em colônia, atividades enzimáticas, virulência e secreção de proteínas, este estudo denota uma contribuição significativa para o entendimento do estresse oxidativo em *M. anisopliae*, visto que em comparação a *B. bassiana*, poucos ainda são os conhecimentos que relacionam a atuação de EROs e enzimas antioxidantes para *Metarhizium* spp. (ZHANG; FENG, 2018). Em destaque, proteínas relacionadas à virulência, morfogênese e resposta ao estresse oxidativo foram apresentadas aqui e futuramente podem ser melhores estudadas no intuito de instituir novos alvos de investigação que ampliem o entendimento do uso fungos artropodopatogênicos para carrapatos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, J.; HANSBERG, W.; NAVARRO, R. Fungal responses to reactive oxygen species. **Medical Mycology**, v. 44, p. 101–107, 2006.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.

ANDREIS, F. C.; SCHRANK, A.; THOMPSON, C. E. Molecular evolution of Pr1 proteases depicts ongoing diversification in *Metarhizium* spp. **Molecular Genetics and Genomics**, *In Press*, 2019.

AZEVEDO, R. F. F.; SOUZA, R. K. B.; BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N. Responsiveness of entomopathogenic fungi to menadione-induced oxidative stress. **Fungal Biology**, v. 118, p. 990 – 995, 2014.

- BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging cell. **Cell**, v. 120, p. 483-495, 2005.
- BARROS, B. H.; DA SILVA, S. H.; DOS REIS MARQUES, E. R.; ROSA J. C.; YATSUDA, A. P.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **Fungal Biology**, v. 114, p. 572-579, 2010.
- BEHIE, S. W.; MOREIRA, C. C.; SEMENTCHOUKOVA, I.; BARELLI, L.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. **Nature Communications**, v. 8, p.14245, 2017.
- BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; CALZOLARI, D.; PASSOS, D. O.; GUIMARÃES, J. A.; MORESCO, J. J.; YATES, J. R. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. **Journal of Proteome Research (Print)**, v. 13, p. 2282-2296, 2014.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v.101, p.512-530, 2009.
- BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium anisopliae* isolates from sites at latitudes from 61_N to 54_S. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 98-108, 2001.
- BROWN, A. J. P.; HAYNES, K.; QUINN, J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 384–391, 2009.
- CHEN, Y.; ZHU, J.; YING, S.H.; FENG, M.G. The GPI-anchored protein Ecm33 is vital for conidiation, cell wall integrity, and multi-stress tolerance of two filamentous entomopathogens but not for virulence. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 5517–5529, 2014.
- DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; BROETTO, L.; SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 245–251, 2004.
- ELBEIN, A. D.; PAN, Y. T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology**, v. 13, p. 17-27, 2003.
- FANG, W.; FERNANDES, É. K. K.; ROBERTS, D. W.; BIDOCHKA, M. J.; ST. LEGER, R. J. A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 602–607, 2010.
- FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 300-305, 2012.

FERNANDES, É. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E. N.; BAHIANSE, T. C.; MORAES, A. M.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. E. P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 15, p. 307-318, 2011.

FREGONESI, A. F.; MOCHI, D. A.; MONTEIRO, A. C. Compatibility of *Beauveria bassiana* in the laboratory for insecticides, herbicides and ripeners. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p. 1-8, 2016.

FREIMOSER, F.M., HU, G., ST LEGER, R.J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. **Microbiology**, v. 151, p. 361–371, 2005.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v.42, p. 611-643, 1997.

GÔLO, P. S.; SANTOS, H. A.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; ANGELO, I. C.; CAMARGO, M. G.; SÁ, F. A.; MASSARD, C. L.; FERNANDES, É. K. K.; ROBERTS, D. R.; BITTENCOURT, V. R. E. P. The influence of conidial Pr1 protease on pathogenicity potential of *Metarhizium anisopliae* senso lato to ticks. **Parasitology Research**, v. 114, p. 2309-2315, 2015.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. D.; LEON, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150-156, 2014.

HERNANDEZ, C. E. M.; GUERRERO, I. E. P.; HERNANDEZ, G. A. G.; SOLIS, E. S.; GUZMAN, J. C. T. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1033–1044, 2010.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 326-333, 2015.

LENG, Y.; PENG, G.; CAO, Y.; XIA, Y. Genetically altering the expression of neutral trehalase gene affects conidiospore thermotolerance of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 11-32, 2011.

LI, G.; FAN, A.; PENG, G.; KEYHANI, N. O.; XIN, J.; CAO, Y.; XIA, Y. A bifunctional catalase-peroxidase, MakatG1, contributes to virulence of *Metarhizium acridum* by overcoming oxidative stress on the host insect cuticle. **Environmental Microbiology**, v. 19, p. 4365–4378, 2017.

LI, Z.; ALVES, S. B.; ROBERTS, D. W.; FAN, M.; DELALIBERA, I. JR.; TANG, J.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; RANGEL, D. E. N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science Technology**, v. 20, p. 117-136, 2010.

LI, L.; PISCHETSRIEDER, M.; ST LEGER, R. J.; WANG, C. Associated links among mtDNA glycation, oxidative stress and colony sectorization in *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p. 1300-1306, 2008.

LOVETT, B.; ST LEGER, R. J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. **Current Genetics**, v. 61, p. 253 – 261, 2015.

MANALIL, N.S., JUNIOR TÉO, V.S., BRAITHWAITE, K., BRUMBLEY, S., SAMSON, P., HELENA NEVALAINEN, K.M.H. Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles. **Fungal Biology**, v. 114, p. 637-645, 2010.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA, I.; FERNANDES, E. K.K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, pii: S0022-2011(17), 30365-8, 2018.

MILLER, C. D.; RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S.; KWON, S.; MESSIAS, C. L.; ROBERTS, D. W.; ANDERSON, A. J. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 41–49, 2004.

MISSALL, T.A.; LODGE, J.K.; McEWEN, J.E. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. **Eukaryotic Cell**, v.3, p. 835-846, 2004.

MONTEIRO, J. P.; MARTINS, A. F.; NUNES, C.; MORAIS, C. M.; LUCIO, M.; REIS, S.; PINHEIRO, J. T.; GERALDES, C. F.; OLIVEIRA, P. J.; JURADO, A. S. A biophysical approach to menadione membrane interactions: relevance for menadione-induced mitochondria dysfunction and related deleterious/therapeutic effects. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, p. 1899–1908, 2013.

PEREIRA-JUNIOR, R. A.; HUARTE-BONNET, C.; PAIXÃO, F. R. S.; ROBERTS, D. W.; LUZ, C.; PEDRINI, N.; FERNANDES, É. K. K. Riboflavin induces *Metarhizium* spp. to produce conidia with elevated tolerance to UV-B, and upregulates photolyases, laccases and polyketide synthases genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 159 – 171, 2018.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; SALLES, C. M. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: molecular marker of fungal virulence in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, p. 123-132, 2013.

PERINOTTO, W. M. S.; GÔLO, P. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; SÁ, F. A.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A.; SALLES, C. M. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 189-196, 2014.

QUINELATO, S.; GÔLO, P. S.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ, F. A.; CAMARGO, M. G.; ANGELO, I. A.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556-565, 2012.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research**, v. 112, p. 1362 – 1372, 2008.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 116-125, 2005.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p. 77–83, 2004.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae* s.l.: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874-880, 2010 a.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; PINTO, A. F. M.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* host–pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. **Fungal Biology**, v. 114, p. 312-319, 2010 b.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, p. 1267-1274, 2010.

SEVIM, A.; DONZELLI, B. G.; WU, D.; DEMIRBAG, Z.; GIBSON, D. M.; TURGEON, B. G. Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. **Current Genetics**, v. 58, p. 79-92, 2012.

SHAH, F. A.; ALLEN, N.; WRIGHT, C. L.; BUTT, T. M. Repetead in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, p.60-66, 2007.

SHAH, F.A.; WANG, C.S.; BUTT, T.M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 259–266, 2005.

SILVA, W. O. B.; SANTI, L.; BERGER, M.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES, J. A., SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Characterization of a sporesurface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 829–834, 2009.

SREE, S. K.; PADMAJA, V. Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch.) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates

ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. **Toxicon**, v. 51, p. 1140–1150, 2008.

STAATS, C. C.; JUNGES, A.; GUEDES, R. L. M.; THOMPSON, C. E.; DE MORAIS, G. L.; BOLDO, J. T.; DE ALMEIDA, L. G. P.; ANDREIS, F. C.; GERBER, A. L.; SBARAINI, N.; DA PAIXÃO, R. L. DE A.; BROETTO, L.; LANDELL, M.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; SILVEIRA, C. P.; SERRANO, T. R.; DE OLIVEIRA, E. S.; KMETZSCH, L.; VAINSTEIN, M. H.; DE VASCONCELOS, A. T. R.; SCHRANK, A. Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. **BMC Genomics**, v. 15, p. 822, 2014.

ST LEGER, R. J.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, p. 392–398, 1994.

SU, Y.; GUO, Q.; TU J.; LI, X.; MENG, L.; CAO, L.; DONG, D.; QIU, J.; GUAN, X. Proteins differentially expressed in conidia and mycelia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* sensu stricto. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, p. 443–448, 2013.

VORONTSOVA, Y. L.; SLEPNEVA, I. A.; ALEKSEEV, A. A.; KRYUKOV, V. Y; TYURIN, M. V.; GLUPOV, V. V. The effect of entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* of different virulence on the generation of reactive oxygen species in *Galleria mellonella* larvae. **Invertebrate Survival Journal**, v. 15, p. 276–284, 2018.

WANG, Z.; ZHOUG, Q.; LI, Y.; QIAO, L.; PANG, Q.; HUANG, B. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of conidia and mycelium in the filamentous fungus *Metarhizium robertsii*. **Fungal Biology**, v. 122, p. 651–658, 2018.

WANG, C.; BUTT, T. M.; ST LEGER, R. J. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. **Microbiology**, v. 151, p. 3223–3236, 2005.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v.19, p.242–247, 2001.

XIE, X. Q.; LI, F.; YING, S. H.; FENG, M. G. Additive contributions of two manganese-cored superoxide dismutases (MnSODs) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. **PLoS One** 7, e30298, 2012.

XIE, X. Q.; WANG, J.; HUANG, B. F.; YING, S. H.; FENG, M. G. A new manganese superoxide dismutase identified from *Beauveria bassiana* enhances virulence and stress tolerance when overexpressed in the fungal pathogen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1543–1553, 2010.

ZHANG, L. B.; FENG, M. G. Antioxidant enzymes and their contributions to biological control potential of fungal insect pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 4995–5004, 2018.

ZHU, X. G.; TONG, S. M.; YING, S. H.; FENG, M. G. Antioxidant activities of four superoxide dismutases in *Metarhizium robertsii* and their contributions to pest control potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 9221-9230, 2018.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 879 - 920, 2007.

CAPÍTULO III

**SECRETOMA DE *Beauveria bassiana* s.l. RELACIONADO À INFECÇÃO EM
*Rhipicephalus microplus***

RESUMO

Beauveria bassiana é um fungo artropodopatogênico amplamente estudado como alternativa aos acaricidas químicos no controle de *Rhipicephalus microplus*. De eficácia consolidada em escala laboratorial e a campo sob condições experimentais, um melhor entendimento do processo de interação com o hospedeiro a nível molecular, especialmente relacionado ao biocontrole para carrapatos, se faz necessário. O uso da cutícula de artrópodes em meio de cultura mimetizando uma condição de infecção é um modelo experimental bastante utilizado, no qual desencadeia a secreção de diversas enzimas envolvidas na patogenia. Neste capítulo, aplicando a tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT), foi avaliado o secretoma diferencial de *B. bassiana* induzido pela cutícula de *R. microplus* (MM – Rm) e confrontado com uma condição controle na presença de glicose (MM - Gli). De um total de 236 proteínas, 32 foram identificadas em ambas as condições de estudo e 50 exclusivamente na condição de infecção, sendo estas atribuídas a diferentes aspectos, como adesão ao hospedeiro, penetração cuticular, defesa fúngica e estresse. Para uma análise global, diferentes ferramentas de bioinformática foram utilizadas. Quanto às possíveis funções moleculares detectadas, um maior número de proteínas com atividade hidrolásica, classe enzimática de todas as enzimas degradadoras de cutícula, como lipases e proteases, foram identificadas e validadas por meio de ensaios enzimáticos. Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo revelam dezenas de proteínas específicas e diferentes processos potencialmente implicados na infecção em carrapatos, o que contribui para uma melhor compreensão da base molecular envolvida no biocontrole de *R. microplus* utilizando *B. bassiana*.

Palavras-chave: fungo artropodopatogênico; proteômica; MudPIT, infecção em carrapatos.

ABSTRACT

Beauveria bassiana is widely studied as an alternative to chemical acaricides in controlling the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. Although its biocontrol efficiency has been proved in laboratory and field scales, there is a need to a better understanding of host interaction process at molecular level related to biocontrol activity. The use of the host cuticle in a culture medium, mimicking an infection condition, is an established experimental model that triggers the secretion of inducible enzymes. In this work, applying a proteomic technique multidimensional protein identification technology (MudPIT), the differential secretome of *B. bassiana* induced by the *R. microplus* cuticle (MM – Rm) was evaluated and compared with a control condition using glucose as carbon source (MM – Gli). From 236 proteins, 50 proteins were identified exclusively in infection condition, assigned to different aspects of infection like host adhesion, cuticle penetration and fungal defense, and stress. Other 32 proteins were considered up- or down-regulated. In order to get a meaningful global view of the secretome, several bioinformatic analyses were performed. Regarding molecular function classification, the highest number of proteins in the differential secretome was assigned in to hydrolase activity, enzyme class of all cuticle-degrading enzymes like lipases and proteases. These activities were also further validated through enzymatic assays. The results presented here reveal dozens of specific proteins and different processes potentially implicated in cattle tick infection improving the understanding of molecular basis of biocontrol of *B. bassiana* against *R. microplus*.

Keywords: arthropod-pathogenic fungus; proteomic; MudPIT; tick infection.

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus tem sido apontado como o principal ectoparasito causador de perdas comerciais à produção extensiva de bovinos. Devido ao hematofagismo, especialmente no Brasil, que possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, estima-se que as perdas/custos relacionados à infestação de *R. microplus* cheguem a cerca de US \$ 3 bilhões anuais (GRISI et al., 2014). Parte expressiva desses custos está relacionada ao controle de *R. microplus* utilizando acaricidas químicos como amitraz, cipermetrina, piretróides sintéticos e organofosfatos (WEBSTER et al., 2015). O uso indiscriminado desses produtos tem aumentado o surgimento de cepas resistentes a diversas bases químicas, e preocupações com a segurança ambiental, contaminação de alimentos e água, riscos para os trabalhadores e resíduos em produtos alimentícios de origem animal são crescentes (SAMISH et al., 2004; DE MENECHI et al., 2016).

O controle biológico é uma abordagem muito interessante para o manejo de pragas, não só pela segurança ambiental como pelos custos. Tido como um dos agentes de biocontrole mais estudados e aplicados em todo o mundo, *Beauveria bassiana* é um fungo filamentosamente patogênico para diversos artrópodes que causam prejuízo tanto a agricultura quanto à saúde animal e humana, como mosquitos e carrapatos (BITTENCOURT et al., 1996; FERNANDES et al., 2011; VALERO-JIMÉNEZ et al., 2014; HEINIG et al., 2015; COUTINHO-RODRIGUES et al., 2016; MASCARIN; JARONSKI, 2016). Neste cenário, a busca por métodos alternativos de controle para carrapatos, como o uso de micro-organismos como *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* ou a associação entre acaricidas químicos e biológicos tem se mostrado muito atraente (FERNANDES et al., 2011; BEYS-DA-SILVA et al., 2014; WEBSTER et al., 2015). Além disso, de acordo com a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio), o mercado de controle biológico deverá crescer de 15 a 20% nos próximos anos (MASCARIN et al., 2018).

Nos últimos anos, vários estudos foram publicados sobre a infecção de *B. bassiana* em diferentes pragas (LINO et al., 2014; VALERO-JIMÉNEZ et al., 2017; WEEKS et al., 2017). Embora a eficiência e o potencial de uso desses fungos em laboratório, piquete e condições de campo tenham sido comprovados (CAMPOS et al., 2010; STAFFORD; ALLAN, 2010; ANGELO et al., 2015; WEBSTER et al., 2015; COUTINHO RODRIGUES et al., 2016), a dinâmica molecular fúngica envolvida na infecção e morte de carrapatos ainda é pouco conhecida. Além disso, a constante comparação de eficácia entre o controle biológico e químico, bem como a ausência de legislações nacionais específicas, tem limitado o espectro atual de inserção do biocontrole de carrapatos com artropodopatógenos no mercado. Transpor essas importantes limitações para um estabelecimento comercial eficaz deve ser mandatório para os próximos anos, no qual o aumento da compreensão dos aspectos moleculares da infecção fúngica em *R. microplus* deve ter participação fundamental nesse processo.

O processo de infecção começa com a adesão conidial à cutícula, seguida pela penetração ativa pelo tegumento. A digestão cuticular é um processo multifatorial e envolve tanto a pressão mecânica exercida pelo apressório quanto a secreção de enzimas como proteases, quitinases e lipases que permitem a internalização dos fungos. Assim, proteínas e outras moléculas secretadas pelo fungo são cruciais para a patogenicidade e virulência, sendo dependentes da composição da cutícula do hospedeiro (BEYS-DA-SILVA et al., 2012). De maneira geral, o secretoma da infecção inclui proteínas, peptídeos (policetídeos e depsipeptídeos) (ELEY et al., 2007; XU et al., 2009) e outras moléculas (ácido oxálico) (KIRKLAND et al., 2005), responsáveis por manipular processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos nos artrópodes-alvo, facilitando assim a infecção e/ou desencadeando respostas de defesa (BHADAURIA et al., 2010). O uso da análise global para obter uma visão geral dos aspectos moleculares da

infecção tem sido aplicado com sucesso em diferentes patógenos, incluindo *M. anisopliae* e *B. bassiana* (BEYS-DA-SILVA et al., 2014; STAATS et al., 2014; WANG et al., 2017). Atualmente, técnicas como a co-imunoprecipitação (CoIP) e espectrometria de massas vem sendo utilizadas para identificar proteínas de ligação de calmodulina em *B. bassiana* (KIM et al., 2018). A proteômica global já foi utilizada para caracterizar exoenzimas secretadas em *B. bassiana*, revelando biomarcadores de processos biológicos e potenciais genes/proteínas candidatos a novos estudos (DIONISIO et al., 2016). No entanto, essa abordagem nunca foi usada em *B. bassiana* associada à infecção em carrapatos.

Neste estudo, a suplementação de meio mínimo com cutícula de carrapato foi utilizada para induzir o sistema de infecção fúngica, associado à tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT), visando caracterizar o secretoma de *B. bassiana*. Dezenas de proteínas potencialmente implicadas na infecção por *R. microplus* foram identificadas e relacionadas a penetração de cutícula, estresse oxidativo e sinalização celular. Tais agentes moleculares foram descritos modulando a resposta do hospedeiro ou preparando o ambiente para a colonização fúngica (FREIMOSER et al., 2005; BYE; CHARNLEY, 2008; KIM et al., 2013; BEYS-DA-SILVA et al., 2014). A identificação desses marcadores moleculares específicos induzidos por componentes do hospedeiro podem ser aplicados como alvos fenotípicos para isolados/cepas fúngicas mais efetivas a serem pesquisados a partir de bibliotecas fúngicas. Neste cenário, os fungos que expressam estes repertórios específicos de proteínas/enzimas podem ser potencialmente mais eficazes no controle do carrapato dos bovinos. Assim, estes resultados adicionam um importante e novo conjunto de proteínas ao enigma molecular da infecção de *B. bassiana* em carrapatos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Manutenção do isolado fúngico e crescimento em meio mínimo líquido

O isolado ESALQ 986 de *B. bassiana*, originalmente obtido de *R. microplus* na cidade de Piracicaba - São Paulo, foi cedido ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes (LCM) pela Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” (ESALQ). A manutenção do isolado em meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) e a produção de conídios para todos os experimentos realizados aqui seguiram descrições prévias reportadas na literatura para *B. bassiana* (COUTINHO-RODRIGUES et al., 2016). Uma suspensão fúngica na concentração de 1×10^7 conídios/mL foi inoculada em 70 mL de meio mínimo líquido (MM) acrescido de 0,05% de estearato de colesteril e 1% de cutícula de *R. microplus* (MM-Rm); como condição controle, ao MM foi somente acrescido 1% de glicose (MM-Gli) (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). As cutículas utilizadas foram obtidas a partir de infestação artificial de bezerros estabulados (Comitê de Ética/UFRRJ – nº 307/2016), previamente dissecadas com auxílio de tesoura castroviejo e pinça oftálmica (Brasmed[®]) e secas a 65°C por 50 minutos. Para higienização, as mesmas foram superficialmente esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio 0,05% por 15 minutos e triplamente rinsadas em água destilada estéril, sendo posteriormente autoclavadas para a inserção no meio de cultura (SANTI et al., 2009).

Os frascos foram mantidos sob incubação em shaker orbital a 28° C em agitação de 150 rpm por 48h. Após o crescimento, o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 + Triton X-100 0,25% foi adicionado aos cultivos na proporção de 1 mL de amostra para 2,5 mL de tampão (v/v), sendo enzimas e outras proteínas provenientes do secretomas extraídas a partir de agitação manual por 5 min (SILVA et al., 2005). Os micélios foram separados por filtração (Whatman nº 1 - Millipore Sigma-Aldrich[®]) e a fração líquida filtrada em coluna 0,22 µm (Sigma-Aldrich Millipore[®]). Sessenta e cinco mL de cada amostra de cultura foram imediatamente fervidas por

15 min para inativação de proteases e congeladas a -80°C para a liofilização. Um volume de cinco mL de cada réplica foi armazenado em alíquotas de 200 µL e mantido a -20°C para a validação através de ensaios enzimáticos.

2.2. Eletroforese em gel

Para a avaliação inicial do perfil proteico de ambas as condições (MM-Rm e MM-Gli), géis unidimensionais SDS-PAGE foram realizados, como descrito por Laemmli (1970). A amostra (50 µg de proteína) foi aplicada em gel de poli-acrilamida vertical a 12% e corada com azul de Coomassie R250 (Thermo Fisher Scientific®).

2.3. Preparação dos extratos proteicos

Os extratos liofilizados foram ressuspensos em água ultrapurificada (JTBaker® - EUA) e precipitados usando metanol/clorofórmio no *Department of Chemical Physiology and Molecular and Cellular Neuroscience* do *The Scripps Research Institute* – La Jolla – California – EUA. Após a precipitação, as amostras foram secas a 37°C e novamente ressuspensas em água. Para a normalização das unidades enzimáticas obtidas, a quantidade de proteínas totais de cada amostra foi determinada utilizando o método do ácido bicinonínico (BCA - Thermo Fisher Scientific®) a partir da albumina sérica bovina como padrão (SMITH et al., 1985).

2.4. Preparação de amostras para espectrometria de massas

Alíquotas de 100 µg de proteínas de MM-Rm e MM-Gli foram inicialmente dissolvidas em tampão de digestão (Ureia 8 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,5) (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). As proteínas foram reduzidas em tris-2-carboxietil-fosfina a 5 mM (TCEP) e alquiladas com iodoacetamida a 10 mM, sendo na sequência digeridas com 2 µg de tripsina (Promega® - EUA) por incubação a 37°C durante 16h. A proteólise foi paralisada adicionando ácido fórmico 5% (v/v) e as amostras centrifugadas a 14.000 g por 20 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. Três repetições biológicas e duas réplicas técnicas foram analisadas para ambas as condições de cultivo de *B. bassiana*.

2.5. Espectrometria de massas

Os peptídeos trípticos foram carregados em colunas previamente empacotadas para MudPIT (contendo 2,5 cm de resina de troca iônica e 2 cm de resina para fase reversa), conforme descrito por Beys-da-Silva et al. (2014). Os peptídeos foram separados em uma coluna de 11 cm (fase reversa) e analisados em espectrômetro de massas do tipo LTQ-XL (Thermo Finnigan, Palo Alto, CA) com 12 passos de separação com diferentes concentrações de sal (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Os tampões utilizados foram os seguintes: tampão A (acetonitrila 5%, ácido fórmico 0,1%), tampão B (acetonitrila 80%, ácido fórmico 0,1%) e tampão C (acetato de amônio 500 mM, acetonitrila 5%, ácido fórmico 0,1%). A identificação de proteínas e análises de quantificação foram feitas utilizando o *software* Integrated Proteomics Pipeline (IP2, www.integratedproteomics.com/). A busca para identificação das proteínas foi realizada contra o banco de dados contendo o genoma de *B. bassiana* disponível no NCBI.

2.6. Análises de bioinformática

O software PatternLab foi utilizado para identificar proteínas diferencialmente expressas (módulo TFold) ou exclusivas (módulo AAPV) das condições analisadas. Proteínas que não foram detectadas em, pelo menos, quatro das seis corridas por condição foram desconsideradas. Para as proteínas diferencialmente expressas foram utilizados os seguintes parâmetros: $p \leq 0,001$ e *fold change* maior ou igual a 2 (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). O software Blast2GO (<http://www.blast2go.org>) foi usado para categorizar as proteínas de acordo com o Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>), nos níveis: atividade biológica e função molecular. Outras ferramentas de bioinformática também foram utilizadas para investigar características das proteínas identificadas por MudPIT: TargetP 1.0 e TMHMM 2.0, para predição da localização subcelular, e SignalP 4.1 para predição de secreção (disponíveis em <http://www.cbs.dtu.dk/services/>). OrthoMCL (<http://orthomcl.org/orthomcl/>) foi utilizado para buscar proteínas ortólogas em outras espécies fúngicas.

2.7. Validação dos dados proteômicos

Alguns dos resultados obtidos no secretoma foram validados através da correlação dos dados com atividades enzimáticas de proteínas relacionadas à infecção, como lipase, protease e catalase. Para os ensaios de protease, substratos cromogênicos sintéticos específicos (0,1 mM) para serinoproteases como Pr1(Suc-ala-ala-pro-phe-pNA) e Pr2 (Bz-phe-val-arg-pNA), bem como para uma carboxipeptidase (Bz-L-tyr-pNA) foram utilizados. Os ensaios foram realizados em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 a 37°C durante 30 minutos e as cinéticas enzimáticas avaliadas a 405 nm em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices®) equipado com termostato e sistemas de agitação (SANTI et al., 2010). Uma unidade específica de protease (U/mg) foi definida como a quantidade de enzima que produz um pmol de ρ -nitroanilina por hora por micrograma (mg) de proteína nas condições de ensaio descritas.

A atividade lipásica foi testada utilizando ρ -nitrofenol palmitato (ρ NPP) (Sigma-Aldrich®) como previamente descrito (SILVA et al., 2005). Após 30 min de incubação a 37°C, a absorbância foi mensurada a 410 nm em SpectraMax (Molecular Devices®) e a atividade enzimática calculada com referência a partir de uma curva de calibração de ρ -nitrofenol (Sigma-Aldrich®). Uma unidade lipásica específica (U/mg) foi determinada como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol de ρ -nitrofenol por hora por mg de proteína nas condições supracitadas.

A atividade de catalase foi determinada usando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como substrato (SANTI et al., 2010). Vinte e cinco microlitros de cada amostra foram adicionados em dois mL de tampão fosfato 25 mM pH 8,0 + 10 mM de H_2O_2 , sendo a atividade enzimática estimada durante três minutos a 240 nm. Uma unidade específica de catalase (U/mg) foi caracterizada como a quantidade de enzima que decompõe H_2O_2 (μ mol) por hora por mg de proteína.

2.8. Análise estatística

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata a partir de pelo menos três réplicas individualizadas. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o teste *T* de Student com auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software®).

3 RESULTADOS

3.1. Visão geral do secretoma de *B. bassiana*

Comparando ambas as condições de estudo, um total de 256 proteínas foram identificadas, sendo 50 unicamente detectadas na presença da cutícula de *R. microplus* e 72 na condição controle (Figura 1).

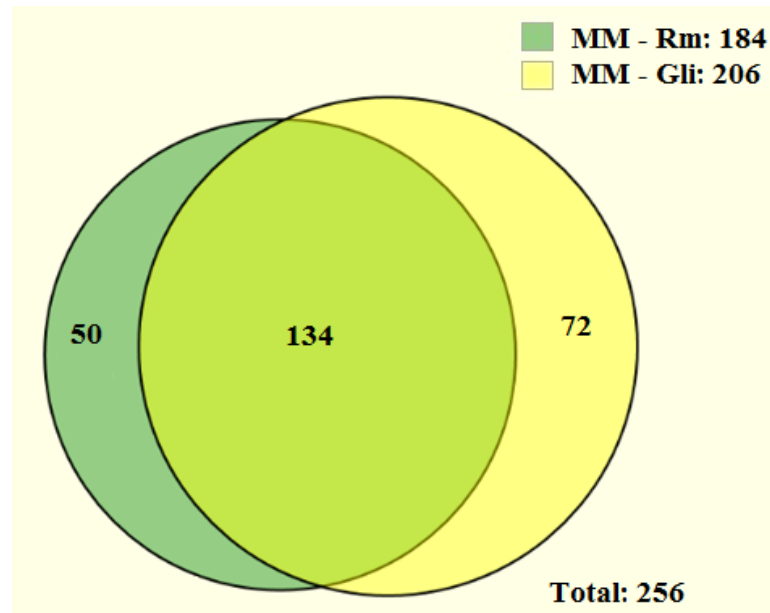


Figura 1 - Distribuição de proteínas secretadas por *Beauveria bassiana* após 48h de crescimento em meio de cultivo acrescido de cutícula de *Rhipicephalus microplus* (MM – Rm) ou glicose (MM – Gli). O diagrama de Venn foi gerado no módulo AAPV do programa PatternLab ($p < 0,01$).

Neste contexto, analisando o conjunto de moléculas exclusivamente identificadas no sistema indutor de infecção (MM – Rm), proteínas relacionadas com adesão, penetração e degradação de cutícula (lipases, proteases), defesa fúngica e estresse (catalase e oxidorredutases) puderam ser identificadas em amostras oriundas de crescimento com a presença de cutícula de *R. microplus* (Tabela 1).

Tabela 1 - Proteínas do secretoma de *Beauveria bassiana* identificadas exclusivamente em meio de cultivo contendo cutícula de *Rhipicephalus microplus* (MM – Rm).

| Número de acesso | Spectral Count | Descrição |
|----------------------------|----------------|---|
| gi 400597335 gb EJP65068.1 | 934 | glycosyl hydrolase family 2 |
| gi 400593017 gb EJP61028.1 | 395 | dihydrolipoyl dehydrogenase |
| gi 400600426 gb EJP68100.1 | 217 | antigenic cell wall galactomannoprotein, putative |
| gi 400595444 gb EJP63245.1 | 134 | peptidase family M28 |
| gi 400595333 gb EJP63138.1 | 85 | glycerophosphoryl diester phosphodiesterase |
| gi 400595035 gb EJP62860.1 | 37 | carboxypeptidase-like protein |

Tabela 1 – Continuação.

| | | |
|----------------------------|----|--|
| gi 400597723 gb EJP65453.1 | 33 | chaperonin 10 kDa subunit |
| gi 400600704 gb EJP68372.1 | 30 | metalloprotease-like protein |
| gi 400595803 gb EJP63593.1 | 28 | glucose sorbosone dehydrogenase |
| gi 400597322 gb EJP65055.1 | 26 | secreted glucosidase |
| gi 400597387 gb EJP65120.1 | 25 | branched-chain amino acid aminotransferase |
| gi 400593914 gb EJP61804.1 | 25 | hypothetical protein BBA_09224 |
| gi 400603021 gb EJP70619.1 | 21 | PA domain-containing protein |
| gi 400599275 gb EJP66979.1 | 20 | single-strand binding protein family |
| gi 400597126 gb EJP64861.1 | 19 | spermidine synthase |
| gi 400599905 gb EJP67596.1 | 18 | glutaminase GtaA |
| gi 400597193 gb EJP64928.1 | 18 | myo-inositol-1-phosphate synthase |
| gi 400593007 gb EJP61021.1 | 17 | histone H4.1 |
| gi 400597794 gb EJP65518.1 | 17 | FAD binding domain-containing protein |
| gi 400598496 gb EJP66205.1 | 16 | hypothetical protein BBA_04698 |
| gi 400598313 gb EJP66030.1 | 15 | carbonic anhydrase |
| gi 400599035 gb EJP66739.1 | 15 | hydrolase, alpha/beta fold family protein |
| gi 400596531 gb EJP64302.1 | 14 | WSC domain-containing protein |
| gi 400593888 gb EJP61782.1 | 13 | amidohydrolase-like protein |
| gi 400597578 gb EJP65308.1 | 12 | neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase |
| gi 400601343 gb EJP68986.1 | 11 | nucleoside diphosphate kinase |
| gi 400603386 gb EJP70984.1 | 11 | fasciclin domain-containing protein |
| gi 400600211 gb EJP67885.1 | 11 | WSC domain-containing protein |
| gi 400593056 gb EJP61063.1 | 10 | FAD binding domain-containing protein |
| gi 400594324 gb EJP62179.1 | 10 | transcriptional regulator |
| gi 400592888 gb EJP60927.1 | 9 | extensin-like protein |
| gi 400596103 gb EJP63887.1 | 8 | hypothetical protein BBA_07211 |
| gi 400600233 gb EJP67907.1 | 8 | fumarylacetoacetase-like protein |
| gi 400598321 gb EJP66038.1 | 8 | formamidase-like protein |
| gi 400597381 gb EJP65114.1 | 8 | magnesium-translocating P-type ATPase family protein |
| gi 400603397 gb EJP70995.1 | 8 | Glycoside hydrolase, catalytic core |
| gi 400601462 gb EJP69105.1 | 7 | hypothetical protein BBA_02140 |
| gi 400602944 gb EJP70542.1 | 7 | glycoside hydrolase family 38 |
| gi 400601443 gb EJP69086.1 | 6 | hypothetical protein BBA_02121 |
| gi 400600446 gb EJP68120.1 | 6 | peptidase family protein |
| gi 400598640 gb EJP66349.1 | 5 | CIA30 family protein |
| gi 400601625 gb EJP69268.1 | 5 | coproporphyrinogen III oxidase |
| gi 400600820 gb EJP68488.1 | 5 | FAD dependent oxidoreductase |
| gi 400596996 gb EJP64740.1 | 5 | putative glutamine synthetase |
| gi 400601859 gb EJP69484.1 | 4 | aminotransferase class I and II |
| gi 400601204 gb EJP68847.1 | 4 | AAA family ATPase |
| gi 400595632 gb EJP63424.1 | 3 | hypothetical protein BBA_07600 |
| gi 400601225 gb EJP68868.1 | 3 | adenosylhomocysteinase |
| gi 400597276 gb EJP65011.1 | 3 | Catalase-like domain, heme-dependent |
| gi 400597473 gb EJP65206.1 | 3 | peptidase S33, tripeptidyl-peptidase |

Quando comparadas ambas as condições, dentre as 134 proteínas identificadas, 16 foram consideradas mais expressas em MM – Rm, condição que mimetiza a infecção, e 16 menos expressas na presença da cutícula de *R. microplus* (Tabela 2). Na presença da cutícula de *R. microplus*, diversas hidrolases, como duas quitinases, precursores de lipase e bassiasina, além de algumas peptidases foram positivamente relacionadas à infecção.

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente expressas identificadas no secretoma de *Beauveria bassiana* s.l. quando cultivado por 48 h em condição artificial de infecção do carrapato *Rhipicephalus microplus* quando comparado ao controle (glicose).

| Número de acesso | <i>Fold change</i> ^a | <i>p</i> valor | Descrição |
|----------------------------|---------------------------------|----------------|--|
| gi 400603091 gb EJP70689.1 | 458 | 0,001 | peptidase S8 |
| gi 400603215 gb EJP70813.1 | 196 | 0,024 | cuticle-degrading protease bassiasin I precursor |
| gi 400595864 gb EJP63652.1 | 122,66 | 0,003 | peptidase family S58 |
| gi 400597004 gb EJP70813.1 | 88,33 | 0,005 | chitinase-like protein |
| gi 400595882 gb EJP63670.1 | 75,75 | 0,043 | extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4 |
| gi 400594426 gb EJP62270.1 | 72,21 | 0,035 | secreted lipase 1 precursor |
| gi 400597542 gb EJP65272.1 | 22,00 | 0,002 | catalase-like domain, heme dependent |
| gi 400600932 gb EJP68600.1 | 17,90 | 0,001 | cell wall protein |
| gi 400596545 gb EJP64316.1 | 11,83 | 0,011 | sphingomyelin phosphodiesterase |
| gi 400597426 gb EJP65159.1 | 7,74 | 0,012 | WSC domain-containing protein |
| gi 400593788 gb EJP61698.1 | 7,33 | 0,000 | CFEM domain-containing protein |
| gi 400595691 gb EJP63483.1 | 6,93 | 0,001 | sulphydryl oxidase |
| gi 400597388 gb EJP65121.1 | 5,78 | 0,002 | hypothetical protein BBA_05891 |
| gi 400594099 gb EJP61973.1 | 4,79 | 0,021 | Glycoside hydrolase, family 47 |
| gi 400593321 gb EJP61285.1 | 4,50 | 0,007 | catalase-peroxidase |
| gi 400596984 gb EJP64728.1 | 3,87 | 0,045 | chitinase-like protein |
| gi 400599543 gb EJP67240.1 | -2,05 | 0,027 | chitinase-like protein |
| gi 400603297 gb EJP70895.1 | -3,13 | 0,005 | GPI anchored cell wall protein |
| gi 400595554 gb EJP63349.1 | -3,17 | 0,013 | serine peptidase, putative |
| gi 400601454 gb EJP69097.1 | -3,45 | 0,031 | DUF985 domain protein |
| gi 400593850 gb EJP61747.1 | -3,86 | 0,013 | ubiquitin family protein |
| gi 400603200 gb EJP70798.1 | -4,86 | 0,036 | ribonuclease T2 family protein |
| gi 400595663 gb EJP63455.1 | -5,23 | 0,026 | family S53 protease |
| gi 400593632 gb EJP61558.1 | -9,77 | 0,008 | WSC domain-containing protein |
| gi 400598993 gb EJP66700.1 | -10,29 | 0,032 | glucanoyltransferase-like protein |
| gi 400595644 gb EJP63436.1 | -10,57 | 0,001 | FAD binding domain-containing protein |
| gi 400599266 gb EJP66970.1 | -11,55 | 0,004 | Bys1 family protein |
| gi 400597260 gb EJP64995.1 | -11,59 | 0,001 | Cry3Aa protein |
| gi 400594403 gb EJP62247.1 | -14,20 | 0,013 | phosphorylcholine phosphatase |
| gi 400599627 gb EJP67324.1 | -20,92 | 0,001 | small secreted protein |
| gi 400598912 gb EJP66619.1 | -32,50 | 0,001 | hypothetical protein BBA_04559 |
| gi 400595334 gb EJP63139.1 | -42,00 | 0,022 | PAF acetylhydrolase |

As proteínas foram diferencialmente expressas usando o módulo TFold do software PatternLab com *fold change* igual ou superior a 2,0. (a) Determinado com base no *spectral count* obtidos para cada proteína. Números positivos representam proteínas reguladas positivamente a partir da presença da cutícula de *R. microplus*, quando comparados ao controle (números negativos).

3.2. Análise funcional das proteínas

Proteínas secretadas por *B. bassiana* em ambos os meios de cultura analisados aqui (MM-Rm ou MM-Gli) foram categorizadas de acordo com o Gene Ontology, por processos biológicos e funções moleculares (Figura 2). Com a classificação foram observadas, em nível biológico, que mais de 75% das proteínas identificadas no secretoma MM-Rm correspondiam a processos metabólicos celulares (Figura 2A). Já para as funções moleculares observadas, a

maioria das proteínas foram categorizadas como hidrolases (classe de enzimas que digerem a cutícula, como lipases, quitinases e proteases), seguida por proteínas relacionadas a ligação a íons (Figura 2B).

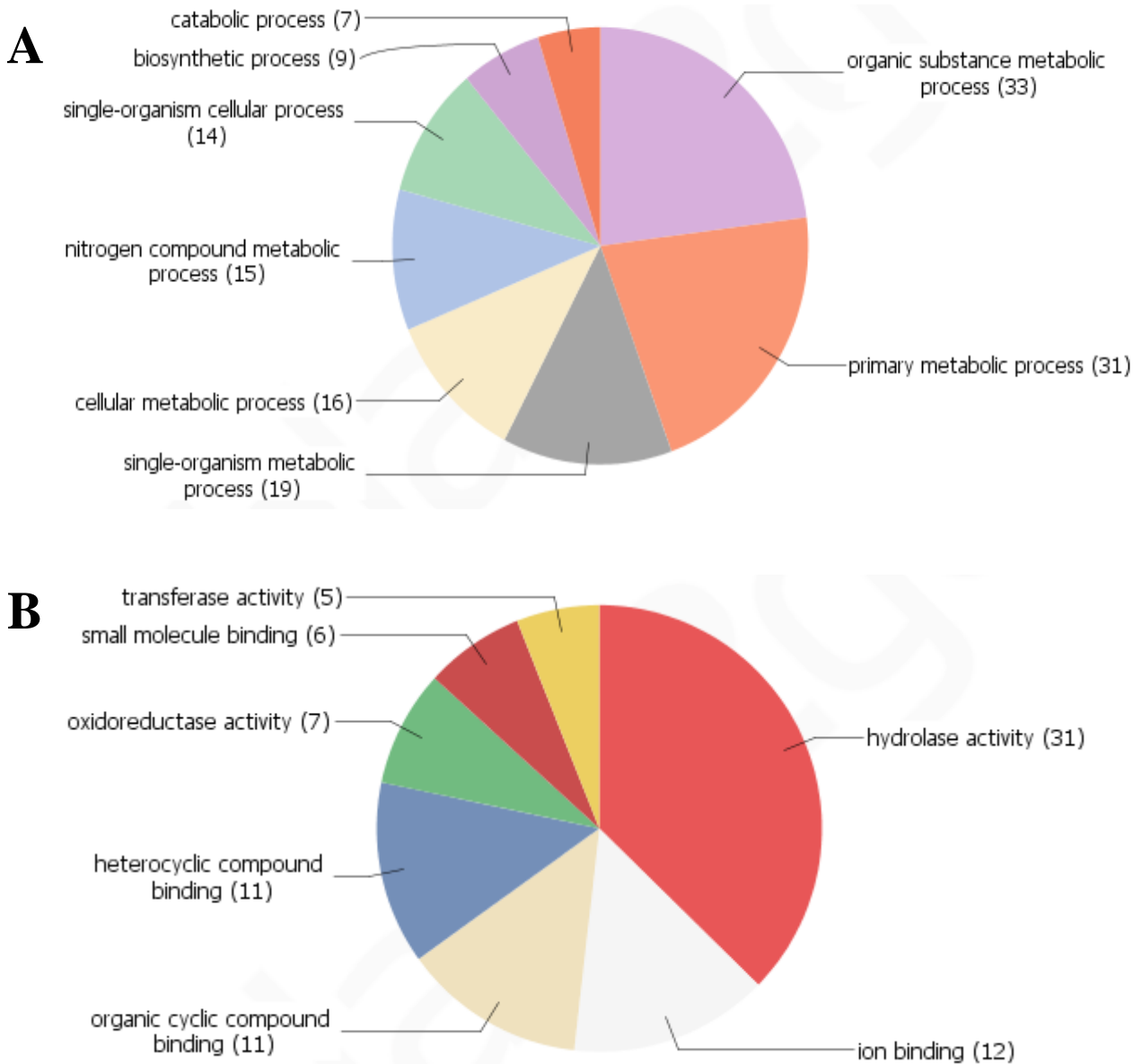


Figura 2: Categorização de proteínas diferencialmente expressas identificadas no secretoma de *Beauveria bassiana*, comparando cultura em meio de cutícula de carrapato versus controle. Classificação em (A) processo biológico, nível 3 e (B) função molecular.

De forma complementar, várias ferramentas foram aplicadas para prever a localização subcelular e sinais de secreção no secretoma de *B. bassiana* (Tabela 3). Cinquenta e oito por cento das proteínas analisadas apresentaram pelo menos dois sinais de predição positivos para secreção, atestando o enriquecimento de proteínas secretadas na amostra, como esperado.

Tabela 3 - Previsão de localização de proteínas identificadas como diferencialmente expressas em secretoma de *B. bassiana* comparando cultura em cutícula de *Rhipicephalus microplus* versus condição controle (glicose).

| Número de acesso | Descrição | Signal P | Target P | TMHMM |
|----------------------------|---|----------|----------|-------|
| up/down | | | | |
| gi 400603091 gb EJP70689.1 | peptidase S8 | Y | S | |
| gi 400603215 gb EJP70813.1 | cuticle-degrading protease bassiasin I precursor | Y | S | |
| gi 400595864 gb EJP63652.1 | peptidase family S58 | N | * | |
| gi 400597004 gb EJP70813.1 | chitinase-like protein | Y | S | |
| gi 400595882 gb EJP63670.1 | extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4 | N | * | |
| gi 400594426 gb EJP62270.1 | secreted lipase 1 precursor | Y | S | Y |
| gi 400597542 gb EJP65272.1 | catalase-like domain, heme dependent | Y | S | |
| gi 400600932 gb EJP68600.1 | cell wall protein | Y | S | |
| gi 400596545 gb EJP64316.1 | sphingomyelin phosphodiesterase | Y | S | |
| gi 400597426 gb EJP65159.1 | WSC domain-containing protein | Y | S | |
| gi 400593788 gb EJP61698.1 | CFEM domain-containing protein | Y | S | Y |
| gi 400595691 gb EJP63483.1 | sulphydryl oxidase | Y | S | |
| gi 400597388 gb EJP65121.1 | hypothetical protein BBA_05891 | N | * | |
| gi 400593321 gb EJP61285.1 | Glycoside hydrolase, family 47 | Y | S | |
| gi 400594099 gb EJP61973.1 | catalase-peroxidase | Y | S | |
| gi 400596984 gb EJP64728.1 | chitinase-like protein | Y | S | |
| gi 400599543 gb EJP67240.1 | chitinase-like protein | Y | S | |
| gi 400603297 gb EJP70895.1 | GPI anchored cell wall protein | N | S | |
| gi 400595554 gb EJP63349.1 | serine peptidase, putative | Y | S | |
| gi 400601454 gb EJP69097.1 | DUF985 domain protein | Y | S | |
| gi 400593850 gb EJP61747.1 | ubiquitin family protein | N | - | |
| gi 400603200 gb EJP70798.1 | ribonuclease T2 family protein | N | S | |
| gi 400595663 gb EJP63455.1 | family S53 protease | Y | S | |
| gi 400593632 gb EJP61558.1 | WSC domain-containing protein | Y | S | Y |
| gi 400598993 gb EJP66700.1 | glucanosyltransferase-like protein | Y | S | |
| gi 400595644 gb EJP63436.1 | FAD binding domain-containing protein | N | * | |
| gi 400599266 gb EJP66970.1 | Bys1 family protein | Y | S | |
| gi 400597260 gb EJP64995.1 | Cry3Aa protein | N | - | |
| gi 400594403 gb EJP62247.1 | phosphorylcholine phosphatase | Y | | |
| gi 400599627 gb EJP67324.1 | small secreted protein | Y | S | |
| gi 400598912 gb EJP66619.1 | hypothetical protein BBA_04559 | Y | S | |
| gi 400595334 gb EJP63139.1 | PAF acetylhydrolase | Y | S | |
| exclusive cuticle | | | | |
| gi 400597335 gb EJP65068.1 | glycosyl hydrolase family 2 | N | - | |
| gi 400593017 gb EJP61028.1 | dihydrolipoyl dehydrogenase | N | M | |
| gi 400600426 gb EJP68100.1 | antigenic cell wall galactomannoprotein, putative | Y | S | |
| gi 400595444 gb EJP63245.1 | peptidase family M28 | Y | S | |
| gi 400595333 gb EJP63138.1 | glycerophosphoryl diester phosphodiesterase | Y | S | |
| gi 400595035 gb EJP62860.1 | carboxypeptidase-like protein | Y | S | |
| gi 400597723 gb EJP65453.1 | chaperonin 10 kDa subunit | N | * | |
| gi 400600704 gb EJP68372.1 | metalloprotease-like protein | Y | | |
| gi 400595803 gb EJP63593.1 | glucose sorbosone dehydrogenase | Y | | |
| gi 400597322 gb EJP65055.1 | secreted glucosidase | Y | | |
| gi 400597387 gb EJP65120.1 | branched-chain amino acid aminotransferase | N | - | |
| gi 400593914 gb EJP61804.1 | hypothetical protein BBA_09224 | N | * | |
| gi 400603021 gb EJP70619.1 | PA domain-containing protein | N | * | Y |

Tabela 3 – Continuação.

| | | | | |
|----------------------------|--|---|---|---|
| gi 400599275 gb EJP66979.1 | single-strand binding protein family | N | M | |
| gi 400597126 gb EJP64861.1 | spermidine synthase | N | - | |
| gi 400599905 gb EJP67596.1 | glutaminase GtaA | Y | S | |
| gi 400597193 gb EJP64928.1 | myo-inositol-1-phosphate synthase | N | - | |
| gi 400593007 gb EJP61021.1 | histone H4.1 | N | - | |
| gi 400597794 gb EJP65518.1 | FAD binding domain-containing protein | N | * | Y |
| gi 400598496 gb EJP66205.1 | hypothetical protein BBA_04698 | N | * | |
| gi 400598313 gb EJP66030.1 | carbonic anhydrase | N | M | |
| gi 400599035 gb EJP66739.1 | hydrolase, alpha/beta fold family protein | Y | S | |
| gi 400596531 gb EJP64302.1 | WSC domain-containing protein | Y | S | |
| gi 400593888 gb EJP61782.1 | amidohydrolase-like protein | N | * | |
| gi 400597578 gb EJP65308.1 | neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase | N | S | Y |
| gi 400601343 gb EJP68986.1 | nucleoside diphosphate kinase | N | - | |
| gi 400603386 gb EJP70984.1 | fasciclin domain-containing protein | Y | S | |
| gi 400600211 gb EJP67885.1 | WSC domain-containing protein | Y | S | |
| gi 400593056 gb EJP61063.1 | FAD binding domain-containing protein | Y | S | |
| gi 400594324 gb EJP62179.1 | transcriptional regulator | N | S | |
| gi 400592888 gb EJP60927.1 | extensin-like protein | N | - | |
| gi 400596103 gb EJP63887.1 | hypothetical protein BBA_07211 | Y | S | |
| gi 400600233 gb EJP67907.1 | fumarylacetoacetase-like protein | N | - | |
| gi 400598321 gb EJP66038.1 | formamidase-like protein | N | - | |
| gi 400597381 gb EJP65114.1 | magnesium-translocating P-type ATPase family protein | N | * | Y |
| gi 400603397 gb EJP70995.1 | Glycoside hydrolase, catalytic core | Y | S | |
| gi 400601462 gb EJP69105.1 | hypothetical protein BBA_02140 | Y | S | |
| gi 400602944 gb EJP70542.1 | glycoside hydrolase family 38 | N | - | |
| gi 400601443 gb EJP69086.1 | hypothetical protein BBA_02121 | Y | S | |
| gi 400600446 gb EJP68120.1 | peptidase family protein | Y | S | |
| gi 400598640 gb EJP66349.1 | CIA30 family protein | N | - | |
| gi 400601625 gb EJP69268.1 | coproporphyrinogen III oxidase | N | M | Y |
| gi 400600820 gb EJP68488.1 | FAD dependent oxidoreductase | N | - | |
| gi 400596996 gb EJP64740.1 | putative glutamine synthetase | N | - | |
| gi 400601859 gb EJP69484.1 | aminotransferase class I and II | N | * | |
| gi 400601204 gb EJP68847.1 | AAA family ATPase | N | - | |
| gi 400595632 gb EJP63424.1 | hypothetical protein BBA_07600 | Y | S | |
| gi 400601225 gb EJP68868.1 | Adenosylhomocysteinase | N | * | |
| gi 400597276 gb EJP65011.1 | Catalase-like domain, heme-dependent | N | - | |
| gi 400597473 gb EJP65206.1 | Peptidase S33, tripeptidyl-peptidase | Y | S | |

Signal P: (Y) sinal peptídico, (N) sem sinal peptídico

Target P: (M) mitocondrial, (S) secreção, (*) nenhuma definição, (-) outra

TMHMM: (Y) transmembrana

A correspondência dos dados com outros fungos foi verificada em uma abordagem de busca por ortólogos para as principais proteínas detectadas. A maioria das proteínas, 68 de 83 (82%) apresentaram uma correspondência com proteínas fúngicas (Tabela 4). Além disso, 84% dessas sequências ortólogas foram relacionadas com fitopatógenos (*Fusarium graminearum*, *Neurospora crassa* e *Aspergillus oryzae*). Ortólogos de outros fungos, incluindo patógenos de animais (*Coccidioides immitis* e *Cryptococcus neoformans*) e não patogênicos (*Laccaria bicolor*) também foram encontrados.

Tabela 4 - Proteínas do secretoma de *Beauveria bassiana* cultivado em meio contendo cutícula de *Rhipicephalus microplus* e seus correspondentes ortólogos

| Proteínas do secretoma de <i>Beauveria bassiana</i> | OrthoMCL code | Organismo | Nome da proteína similar | E-value | Identidade (%) | Similaridade (%) |
|---|---------------|------------------------------|---|-----------|----------------|------------------|
| Glycoside hydrolase, catalytic core | OG5_127620 | <i>Aspergillus oryzae</i> | alpha-galactosidase | 1,00E-136 | 47 | 97 |
| fasciclin domain-containing protein | OG5_140192 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-74 | 44 | 78 |
| GPI anchored cell wall protein | OG5_155257 | <i>Aspergillus oryzae</i> | predicted protein | 2,00E-61 | 48 | 94 |
| cuticle-degrading protease bassiasin I precursor | OG5_128249 | <i>Fusarium graminearum</i> | proteinase R precursor | 1,00E-103 | 53 | 96 |
| PA domain-containing protein | OG5_128101 | <i>Fusarium graminearum</i> | similar to prostate-specific membrane antigen | 1,00E-181 | 62 | 100 |
| glycoside hydrolase family 38 | OG5_130172 | <i>Fusarium graminearum</i> | similar to alpha-mannosidase | 1,00E-181 | 72 | 100 |
| aminotransferase class I and II | OG5_126737 | <i>Fusarium graminearum</i> | similar to aspartate aminotransferase | 1,00E-181 | 74 | 96 |
| coproporphyrinogen III oxidase | OG5_128228 | <i>Fusarium graminearum</i> | coproporphyrinogen III oxidase | 1,00E-169 | 66 | 100 |
| hypothetical protein BBA_02140 | OG5_131653 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-108 | 46 | 93 |
| DUF985 domain protein | OG5_131531 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 5,00E-37 | 56 | 78 |
| nucleoside diphosphate kinase | OG5_126708 | <i>Fusarium graminearum</i> | nucleoside diphosphate kinase | 1,00E-76 | 84 | 99 |
| adenosylhomocysteinase | OG5_127233 | <i>Neurospora crassa</i> | Adenosylhomocysteinase | 1,00E-181 | 89 | 100 |
| AAA family ATPase | OG5_126926 | <i>Fusarium graminearum</i> | cell division cycle protein 48 | 1,00E-181 | 92 | 100 |
| cell wall protein | OG5_135066 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | antigenic cell wall galactomannoprotein, putative | 3,00E-08 | 30 | 96 |
| FAD dependent oxidoreductase | OG5_144614 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-131 | 45 | 93 |
| metalloprotease-like protein | OG5_137925 | <i>Neurospora crassa</i> | metalloprotease 1 | 3,00E-55 | 49 | 76 |
| peptidase family protein | OG5_127974 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-128 | 56 | 100 |
| antigenic cell wall galactomannoprotein, putative | OG5_176018 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-26 | 40 | 100 |
| fumarylacetoacetase-like protein | OG5_130701 | <i>Neurospora crassa</i> | Fumarylacetoacetase | 1,00E-146 | 58 | 97 |
| WSC domain-containing protein | OG5_169099 | <i>Laccaria bicolor</i> | n/a | 2,00E-20 | 36 | 99 |
| glutaminase GtaA | OG5_163514 | <i>Aspergillus oryzae</i> | predicted protein | 1,00E-181 | 51 | 99 |
| small secreted protein | OG5_169722 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 6,00E-28 | 45 | 95 |
| single-strand binding protein family | OG5_127389 | <i>Fusarium graminearum</i> | single-strand binding protein family domain | 2,00E-47 | 65 | 99 |
| Bys1 family protein | OG5_155858 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | BYS1 domain protein | 5,00E-35 | 50 | 95 |
| hydrolase, alpha/beta fold family protein | OG5_169806 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-101 | 50 | 97 |
| glucanosyltransferase-like protein | OG5_134260 | <i>Fusarium graminearum</i> | 1,3-beta-glucanosyltransferase gell precursor | 1,00E-149 | 59 | 100 |

Tabela 4 – Continuação.

| | | | | | | |
|---|------------|--|---|-----------|----|-----|
| CIA30 family protein | OG5_159465 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 5,00E-51 | 47 | 100 |
| hypothetical protein BBA_04698 | NO_GROUP | <i>Neurospora crassa</i> | hypothetical protein | 1,00E-07 | 26 | 53 |
| formamidase-like protein | OG5_133542 | <i>Fusarium graminearum</i> | Formamidase | 1,00E-181 | 79 | 99 |
| carbonic anhydrase | OG5_127503 | <i>Neurospora crassa</i> | carbonic anhydrase 2 | 1,00E-103 | 68 | 85 |
| FAD binding domain-containing protein | OG5_155912 | <i>Fusarium graminearum</i> | 3-ketosteroid-delta-1-dehydrogenase | 1,00E-181 | 80 | 98 |
| chaperonin 10 kDa subunit | OG5_126769 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 9,00E-51 | 92 | 99 |
| neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase | OG5_129670 | <i>Neurospora crassa</i> | neutral ceramidase | 1,00E-181 | 62 | 98 |
| Peptidase S33, tripeptidyl-peptidase | OG5_137955 | <i>Aspergillus nidulans</i> | Uncharacterized | 2,00E-75 | 33 | 92 |
| WSC domain-containing protein | OG5_190552 | <i>Neurospora crassa</i> | hypothetical protein | 1,00E-61 | 42 | 80 |
| hypothetical protein BBA_05891 | OG5_195850 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 6,00E-87 | 71 | 93 |
| branched-chain amino acid aminotransferase | OG5_159247 | <i>Fusarium graminearum</i> | branched-chain amino acid aminotransferase | 1,00E-181 | 77 | 100 |
| magnesium-translocating P-type ATPase family protein | OG5_127253 | <i>Coccidioides immitis</i> | magnesium-translocating P-type ATPase | 1,00E-181 | 57 | 96 |
| glycosyl hydrolase family 2 | OG5_132459 | <i>Neurospora crassa</i> | beta-galactosidase | 1,00E-181 | 53 | 99 |
| secreted glucosidase | OG5_130926 | <i>Fusarium graminearum</i> | endo-1,3(4)-beta-glucanase | 1,00E-109 | 64 | 99 |
| Catalase-like domain, heme-dependent | OG5_127182 | <i>Fusarium graminearum</i> | catalase A | 1,00E-181 | 72 | 99 |
| myo-inositol-1-phosphate synthase | OG5_128316 | <i>Fusarium graminearum</i> | inositol-3-phosphate synthase isozyme 2 | 1,00E-181 | 87 | 100 |
| spermidine synthase | OG5_127074 | <i>Neurospora crassa</i> | spermidine-3 | 1,00E-151 | 85 | 100 |
| putative glutamine synthetase | OG5_127086 | <i>Fusarium graminearum</i> | glutamine synthetase | 1,00E-181 | 79 | 99 |
| chitinase-like protein | OG5_130746 | <i>Neurospora crassa</i> | Chitinases | 1,00E-105 | 50 | 87 |
| WSC domain-containing protein | OG5_137956 | <i>Cryptococcus neoformans</i> | WSC domain-containing protein | 2,00E-57 | 38 | 88 |
| extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4 | OG5_128614 | <i>Fusarium graminearum</i> | antigenic dipeptidyl-peptidase Dpp4 | 1,00E-181 | 57 | 97 |
| glucose sorbosone dehydrogenase | OG5_140527 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-181 | 58 | 94 |
| sulphydryl oxidase | OG5_136067 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-105 | 48 | 95 |
| family S53 protease | OG5_130135 | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | n/a | 1,00E-114 | 42 | 100 |
| FAD binding domain-containing protein | OG5_140231 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-150 | 48 | 96 |
| serine peptidase, putative | OG5_127207 | <i>Neurospora crassa</i> | serine peptidase | 3,00E-97 | 38 | 93 |
| peptidase family M28 | OG5_209004 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-149 | 54 | 98 |
| PAF acetylhydrolase | OG5_155742 | <i>Magnaporthe grisea</i> | hypothetical protein | 2,00E-61 | 35 | 99 |
| glycerophosphoryl diester phosphodiesterase | OG5_155948 | <i>Fusarium graminearum</i> | glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family | 1,00E-155 | 60 | 100 |
| carboxypeptidase-like protein | OG5_132369 | <i>Neurospora crassa</i> | carboxypeptidase A1 | 1,00E-141 | 56 | 100 |
| secreted lipase 1 precursor | OG5_163503 | <i>Aspergillus nidulans</i> | n/a | 1,00E-114 | 49 | 86 |

Tabela 4 – Continuação.

| | | | | | | |
|--------------------------------|------------|-----------------------------|---|-----------|----|-----|
| phosphorylcholine phosphatase | OG5_165097 | <i>Fusarium graminearum</i> | phosphorylcholine phosphatase | 1,00E-139 | 69 | 91 |
| transcriptional regulator | OG5_149849 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-181 | 67 | 95 |
| Glycoside hydrolase, family 47 | OG5_149768 | <i>Neurospora crassa</i> | mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2- mannosidase | 1,00E-149 | 53 | 94 |
| hypothetical protein BBA_09224 | OG5_126619 | <i>Bombyx mori</i> | n/a | 1,00E-07 | 21 | 76 |
| amidohydrolase-like protein | OG5_138057 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-181 | 60 | 100 |
| ubiquitin family protein | OG5_127221 | <i>Fusarium graminearum</i> | ubiquitin/S27a fusion protein | 2,00E-75 | 96 | 100 |
| CFEM domain-containing protein | OG5_180741 | <i>Neurospora crassa</i> | hypothetical protein | 3,00E-12 | 47 | 77 |
| WSC domain-containing protein | OG5_187015 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-181 | 50 | 86 |
| dihydrolipoyl dehydrogenase | OG5_126968 | <i>Fusarium graminearum</i> | dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor | 1,00E-181 | 81 | 100 |
| histone H4.1 | OG5_126573 | <i>Coccidioides immitis</i> | histone H4 | 1,00E-52 | 99 | 100 |
| extensin-like protein | OG5_152770 | <i>Fusarium graminearum</i> | conserved hypothetical protein | 1,00E-62 | 37 | 92 |

3.3. Validação dos dados proteômicos

Ensaio enzimáticos foram realizados para a validação e correlação com enzimas relacionadas à infecção fúngica (Tabela 5). Corroborando com os achados proteômicos, a atividade específica de Pr1, Pr2 e carboxipeptidase foram superiores na presença de cutícula de *R. microplus*. Da mesma forma, as atividades de lipase e catalase detectadas foram em torno de 5 e 6 vezes maiores na condição de infecção do que na condição controle.

Tabela 5 – Atividade enzimática do sobrenadante de cultura de *Beauveria bassiana* crescido por 48 horas em meio basal mínimo acrescido de glicose (MM – Gli) ou cutícula de *Rhipicephalus microplus* (MM – Rm).

| | MM - Gli | MM - Rm |
|------------------|----------------|----------------|
| Lipase | 2,72 ± 0,076 | 14,52* ± 0,33 |
| Pr1 | 0,087 ± 0,0004 | 5,26* ± 0,01 |
| Pr2 | 1,41 ± 0,005 | 12,72* ± 0,01 |
| Carboxipeptidase | 0,468 ± 0,003 | 1,85* ± 0,007 |
| Catalase | 270,42 ± 2,96 | 1638,6* ± 5,21 |

Teste *T* de Student - * ($p \leq 0,001$)

4 DISCUSSÃO

A análise do secretoma de artropodopatógenos ainda é pouco abordada por grupos de pesquisa e, em particular, estudos envolvendo a infecção em carrapatos e abordagens proteômicas. O conhecimento do arsenal de moléculas produzidas durante a interação patógeno-hospedeiro permite tanto a identificação de quais proteínas encontram-se envolvidas no metabolismo celular durante a infecção, quanto possibilita relacioná-las com a patogenicidade (FÉLIX et al., 2016). Neste contexto, a suplementação com cutícula de artrópodes em meio de cultivo líquido é amplamente utilizada para desencadear respostas referentes aos mecanismos de infecção realizados por *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (SANTI et al. 2010; BEYS-DA-SILVA et al., 2014; PERINOTTO et al., 2014; KORDI et al., 2015; COUTINHO-RODRIGUES et al., 2016). Assim, o presente estudo apresenta uma visão global do painel de proteínas de *B. bassiana* secretadas relacionadas à infecção em *R. microplus* por meio do uso de MudPIT e compara com a condição controle estudada (glicose). A análise de MudPIT é uma poderosa tecnologia aplicada para avaliar proteínas secretadas na interação patógeno-hospedeiro, como já descritos para o fungo do arroz *Magnaporthe oryzae* (KIM et al., 2013) e *M. anisopliae* (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Com isso, centenas de proteínas foram identificadas aqui, sendo mais de 100 expressas diferencialmente na condição de infecção.

Por ter sido obtido originalmente de um carrapato naturalmente infectado, a escolha do isolado ESALQ 986 de *B. bassiana* utilizado neste estudo foi baseada em estudo anteriormente realizado que avaliou seu efeito sobre fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, bem como atividades de enzimas relacionadas à penetração cuticular (proteases e lipase) (COUTINHO-RODRIGUES et al., 2016). Fungos artropodopatogênicos são capazes de secretar enzimas hidrolíticas para digerir a cutícula do hospedeiro, que é considerada umas das principais barreiras a serem transpostas durante a infecção. Em linhas gerais, o sucesso da colonização é caracterizado pela ação sinérgica de várias enzimas como proteases, quitinases e lipases (GRELL et al., 2011; KORDI et al., 2015). Para o meio que mimetizava a condição de infecção - MM- Rm, a maioria das proteínas identificadas foram as hidrolases, sendo pelo menos nove proteases e duas lipases. A classe de serinoproteases é a mais estudada em fungos artropodopatogênicos e tem sido frequentemente relacionada à virulência e especificidade do hospedeiro (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Nos ensaios enzimáticos, as atividades de serinoproteases do tipo subtilisina (Pr1), tripsina (Pr2) e carboxipeptidase foram superiores na condição induzida por infecção. É bem conhecida a relevância dessas enzimas na degradação da cutícula do hospedeiro para penetração e invasão tecidual, atuando em diferentes etapas da internalização e colonização (SANTI et al. 2010). Além disso, outra importante serinoprotease - bassiasina I - que apresenta homologia com Pr1 em *B. bassiana* e *M. anisopliae* e proteinase K para *Tritirachium album*, foi detectada como diferencialmente expressa (KIM et al., 1999).

Recentemente, comparando os secretomas de *B. bassiana* a partir do crescimento na barata americana (*Periplaneta americana*) naturalmente colonizada com meio de cultivo acrescido com cutícula da mesma, cerca de 50 proteínas diferentes foram detectadas em ambas as condições de crescimento (DIONISIO et al., 2016). Devido à escolha da técnica de MudPIT, aqui, somente no secretoma induzido pela cutícula de carrapato, cerca de 256 proteínas diferentes foram detectadas. A cutícula do hospedeiro é formada por duas camadas: epicutícula, fina camada externa composta principalmente por lipídios esterificados, e procutícula, que compreende a maior parte da cutícula, rica em proteínas e quitina (BEYS-DA-SILVA et al., 2012). Especialmente para carrapatos, a composição lipídica epicuticular é altamente variável, mesmo entre carrapatos da mesma família (HUNT, 1986) ou diferentes estágios da mesma espécie (MENT et al., 2010). Em acordância com os achados para *P. americana* (DIONISIO et

al., 2016), proteases foram o grupo de maior secreção durante a infecção no hospedeiro, no entanto cerca de 15 proteínas não foram detectadas similaridades entre os hospedeiros e variações na regulação do número de proteases (EJP63103.1, EJP68480.1 e EJP66791.1), quitinase (EJP64748.1) e ascorbato peroxidase (EJP69923.1) foram reportadas. Acredita-se que divergências como estas sejam pela possível indução diferencial promovida devido aos diferentes componentes cuticulares apresentados pelos hospedeiros em estudo (BEYS-DA-SILVA et al., 2010; MANALIL et al., 2010; SANTI et al., 2010; DE BEKKER et al., 2013) e reforçam a importância de uma visão específica da infecção para cada hospedeiro (WANG et al., 2016).

Também consideradas hidrolases, enzimas lipolíticas, também foram identificadas como diferencialmente reguladas na condição de infecção (*secreted lipase I precursor* e esfingomielina fosfodiesterase) e confirmadas por ensaios enzimáticos. Tais enzimas podem ser importantes para diferentes processos celulares durante a infecção, incluindo a adesão de conídios, germinação, aquisição de nutrientes e sinalização intracelular (FENG et al., 2011). Como descrito anteriormente, *M. anisopliae*, outro conhecido fungo artropodopatogênico, secreta lipases diretamente no hospedeiro durante a infecção (BEYS-DA-SILVA et al., 2010). A inibição específica da atividade de uma lipase de *M. anisopliae* impediu a germinação de esporos e inibiu totalmente a infecção em carrapatos, atestando seu papel fundamental no controle de *R. microplus* (BEYS-DA-SILVA et al., 2010). Curiosamente, esta enzima não foi detectada em secretomas de *M. anisopliae* induzido pela cutícula de *Dysdercus peruvianus*, o inseto machador do algodão (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Portanto, a forte regulação positiva da lipase aqui reforça a implicação específica dessa enzima na atividade acaricida de *B. bassiana* e talvez deva ser melhor estudada para detectar a real relação no controle de carrapatos.

Outras proteínas relacionadas à adesão e patogenicidade também foram identificadas no secretoma de *B. bassiana*. Uma proteína contendo um domínio de fasciclina (EJP70984.1) que está relacionada ao processo de adesão celular foi detectada. Comum a diferentes organismos (XIAO et al., 2012), também está envolvida na conidiogênese e patogenicidade para o fungo fitopatogênico *Magnaporthe oryzae*, responsável por acarretar quedas substanciais na produção mundial de arroz (LIU et al., 2009). Da mesma forma, uma proteína antigênica (EJP68100.1) que é altamente hidrofóbica e pode auxiliar durante a adesão e interação fungo-cutícula (XIAO et al., 2012) foi também detectada. Nesse cenário, diversas proteínas da parede celular (PPC), previamente descritas em conídios e hifas modulando a hidrofobicidade e adesão, são comumente identificadas em fungos artropodopatogênicos. Um estudo que avaliou a presença de PPC clonadas de *M. anisopliae* em *B. bassiana*, registrou aumento de hidrofobicidade e adesão, confirmando assim a importância dessas proteínas na fase inicial do processo de infecção (LI et al., 2010). Ainda, proteínas contendo o domínio CFEM, rico em cisteína, foram descritas durante a patogenicidade (KULKARNI et al., 2003; LIANG et al., 2013; VAKNIN et al., 2014), demonstrando recentemente seu envolvimento em diversos processos, incluindo patogenicidade, produção conidial e tolerância ao estresse em *Botrytis cinerea*, um fungo fitopatogênico (ZHU et al., 2017).

Durante o processo de infecção, o sistema imunológico dos artrópodes produz espécies reativas de oxigênio (EROs) como mecanismo de defesa frente à infecção (DOU; ZHOU, 2012), e o fungo inicia a expressão de proteínas envolvidas na proteção de EROs (LIANG et al., 2013; TONG et al., 2016). Neste estudo, foram identificadas proteínas relacionadas à desintoxicação e manipulação do metabolismo redox em *B. bassiana*. Como exemplo, a proteína dihidrolipolil desidrogenase, encontrada unicamente na condição de infecção, pode estar envolvida na tolerância à radiação UV e atividade antioxidante (XIAO et al., 2012; MOON et al., 2015). Outra importante proteína detectada aqui, que apresenta domínio WSC, tem sido associada ao estresse e adaptação fúngica a diferentes hospedeiros, incluindo artrópodes e

nematoides (LIANG et al., 2013; SEN-MIAO et al., 2016; TONG et al., 2016). Proteínas clássicas relacionadas à desintoxicação de EROs - catalase e FAD-oxidoredutases - também foram identificadas exclusivamente no secretoma de *B. bassiana* na presença de cutícula de *R. microplus*. Estas proteínas, anteriormente relacionadas à resposta ao estresse, podem ser importantes em muitos aspectos da biologia fúngica, atuando diretamente na patogênica para artrópodes, na formação de estruturas específicas como hifas, promovendo adaptações ecológicas ao ambiente e induzindo a variadas sinalizações intracelulares (TUDZYNSKI et al., 2012). A superexpressão do gene *catE7* de uma catalase de *B. bassiana* acarretou em aumento da germinação e virulência contra larvas de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (CHANTASINGH et al., 2013), sugerindo que a resposta mediada por proteínas relacionadas à desintoxicação ou estresse são fundamentais durante o processo de infecção, aumentando a eficiência do fungo durante o biocontrole.

Confrontando os resultados deste estudo com descrições prévias para outros fungos artropodopatogênicos (SANTI et al., 2010 b; BEYS-DA-SILVA et al., 2014), é possível observar que em muitos aspectos, os processos patogênicos de *M. anisopliae* e *B. bassiana* são bastante semelhantes. No entanto, para todos estes estudos, assim como no presente estudo, é válido ressaltar que a secreção de proteínas foi induzida apenas pela presença da cutícula do hospedeiro, desconsiderando a resposta do hospedeiro à infecção. Com isso, novas estratégias para avaliar a real interação entre patógeno-hospedeiro deveriam ser propostas em novos estudos proteômicos. De importância ainda pouco consolidada, efetores extracelulares são definidos como pequenas moléculas ou proteínas secretadas por patógenos que atuam diretamente no hospedeiro, alterando a estrutura e o metabolismo e modulando a interação hospedeiro-patógeno em seus sítios de atuação (WAWRA et al., 2012; XIA et al., 2017; ANDERSON et al., 2017). Neste quadro, Beys-da-Silva et al. (2014) sugeriram que algumas proteínas que aparentam não ter nenhuma função durante a infecção, poderiam atuar como efetores durante o processo – como as glicosil hidrolases, proteínas com domínio rico em cisteína, além de proteínas de resposta ao estresse – favorecendo a atuação posterior de outras moléculas, como as hidrolases.

A integridade da amostra analisada é um ponto crucial para a realização de inferências proteômicas. Embora baseado no secretoma de *B. bassiana*, de forma complementar, análises da localização subcelular das proteínas encontradas foram realizadas em softwares especializados. A presença de proteínas intracelulares no secretoma poderia ser explicada, possivelmente, pela autólise ou ferimento mecânico promovido pela agitação micelial em cultura líquida. Entretanto, como bem apontado no secretoma de *Botrytis cinerea* (SHAH et al., 2009), se ocorresse lise celular, muitas proteínas intracelulares que possuem alta abundância seriam esperadas, o que não foi observado aqui. Em concordância com percentuais descritos previamente na literatura (SHAH et al., 2009; RAMPITSCH et al., 2013; BEYS-DA-SILVA et al., 2014), cerca de 58% das proteínas identificadas possuíam sinal de secreção conservado - confirmado por pelo menos dois dos três programas utilizados. Para as demais não relacionadas à possível secreção ativa pela parede fúngica, acredita-se que sejam excretadas por vias não clássicas, como as vesículas (GIRARD et al., 2013; MCCOTTER et al., 2016). Ainda neste estudo, a presença de algumas proteínas transmembrana foram identificadas. Embora uma degradação inespecífica não possa ser descartada, a presença das mesmas no secretoma pode refletir a detecção somente do domínio externo. Com relatos em *Phytophthora infestans* e *M. anisopliae* (MEIJER et al., 2014; BEYS-DA-SILVA et al., 2014), muitas destas proteínas são caracterizadas como glicoproteínas e se relacionam com sinalizações intracelulares (MEIJER et al., 2014), no qual podem apresentar unidades funcionais, tanto na parede celular quanto no citoplasma. A maioria das proteínas identificadas aqui possui um ortólogo em fungos fitopatogênicos; no entanto, suas funções no secretoma ainda precisam ser melhores avaliadas

para determinar especialmente a contribuição à patogenicidade (SHAH et al., 2009; MEIJER et al., 2014).

Em resumo, diversas proteínas com potencial de participação em variados aspectos da infecção de carrapatos foram identificadas aqui. Além disso, dezenas destas nunca foram pesquisadas em *B. bassiana*, revelando assim um novo conjunto de genes/proteínas alvo a serem estudados na interação patógeno-hospedeiro e na seleção racional de isolados fúngicos mais eficientes. Neste contexto, investigações envolvendo o uso de isolados mutantes, o silenciamento/superexpressão de genes ou o entendimento da repressão/indução da produção das principais enzimas envolvidas na patogenicidade podem otimizar o estudo de formulações para o biocontrole (BEYS-DA-SILVA et al., 2010; LEGGET et al., 2011; MASCARIN et al., 2018) e futuramente contribuir no uso de *B. bassiana* para controle de *R. microplus*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. P.; SPERSCHNEIDER, J.; WIN, J.; KIDD, B.; YOSHIDA, K.; HANE, J.; SAUNDERS, D. G. O.; SINGH, K.B. Comparative secretome analysis of *Rhizoctonia solani* isolates with different host ranges reveals unique secretomes and cell death inducing effectors. **Scientific Reports**, v. 7, n. 10410, 2017.

ANGELO, I. C.; TUNHOLI-ALVES, V. M.; TUNHOLI, V. M.; PERINOTTO, W. M. S.; GÔLO, P. S.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; PINHEIRO, J., BITTENCOURT, V. R. E. P. Physiological changes in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) experimentally infected with entomopathogenic fungi. **Parasitology Research**, v. 114, p.219–225, 2015.

BEYS-DA-SILVA, W.O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **Fungal Biology**, v. 114, p.10–15, 2010.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Biocontrol of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* by the acaricidal fungus *Metarhizium anisopliae*. In: **Ticks: disease, management and control**. 1ª ed. New York: Nova Science Publishers Inc, 2012. cap 12, p 217–246.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; CALZOLARI, D.; PASSOS, D. O.; GUIMARÃES, J. A.; MORESCO, J. J.; YATES, J. R. Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 2282–2296, 2014.

BHADAURIA, V.; BANNIZA, S.; WANG, L. X.; WEI, Y. D.; PENG, Y. L. Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, p. 81–95, 2010.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; PERALVA, S. L. F. S.; VIEGAS, E. C.; ALVES, S. B. Avaliação dos efeitos do contato de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, p. 81–84, 1996.

BYE, N. J.; CHARNLEY, A. K. Regulation of cuticle-degrading subtilisin proteases from the entomopathogenic fungi, *Lecanicillium spp*: implications for host specificity. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 81–92, 2008.

CAMPOS, R. A.; BOLDO, J. T.; PIMENTEL, I. C.; DALFOVO, V.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; VAINSTEIN, M. H.; BARROS, N. M. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria spp.* to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 1421–1430, 2010.

CHANTASINGH, D.; KITIKHUN, S.; KEYHANI, N.O.; BOONYAPAKRON, K.; THOETKIATTIKUL, H.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Identification of catalase as an early up-regulated gene in *Beauveria bassiana* and its role in entomopathogenic fungal virulence. **Biological control**, v. 67, p. 85–93, 2013.

COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; PERINOTTO, W. M. S.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; SANTI, L.; BERGER, M.; MARCIANO, A. F.; DE SÁ, F. A.; NOGUEIRA, M. R. S.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence, proteolytic and lipolytic activities of Brazilian *Beauveria bassiana* sl isolates (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Rhipicephalus microplus* ticks (Acari: Ixodidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, p. 239–249, 2016.

DE BEKKER, C.; SMITH, P. B.; PATTERSON, A. D.; HUGHES, D. P. Metabolomics reveals the heterogeneous secretome of two entomopathogenic fungi to ex vivo cultured insect tissues. **PLoS One**, v. 8, e. 70609, 2013.

DE MENEGHI, D.; STACHURSKI, F.; ADAKAL, H. Experiences in tick control by acaricide in the traditional cattle sector in Zambia and Burkina Faso: possible environmental and public health implications. **Front Public Health**, v. 4, p. 239, 2016.

DIONISIO, G.; KRYGER, P.; STEENBERG, T. Label-free differential proteomics and quantification of exoenzymes from isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Insects**, v. 7, p. 54, 2016.

DOU, D.; ZHOU, J. M. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. **Cell Host Microbe**, v. 12, p.484–495, 2012.

ELEY, K. L.; HALO, L. M.; SONG, Z.; POWLES, H.; COX, R. J.; BAILEY, A. M.; LAZARUS, C. M.; SIMPSON, T. J. Biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **ChemBioChem**, v. 8, p. 289–297, 2007.

FÉLIX, C.; DUARTE, A. S.; VITORINO, R.; GUERREIRO, A. C.; DOMINGUES, P.; CORREIA, A.C.; ALVES, A.; ESTEVES, A. C. Temperature modulates the secretome of the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1096, 2016.

FENG, J.; HWANG, R.; HWANG, S. F.; GAUDET, D.; STRELKOV, S. E. Molecular characterization of a *Stagonospora nodorum* lipase gene LIP1. **Plant Pathology**, v. 60, p. 698–708, 2011.

FERNANDES, E. K.; ANGELO, I. C.; RANGEL, D. E.; BAHIANSE, T. C.; MORAES, A. M.;

ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307–318, 2011.

FREIMOSER, F. M.; HU, G.; ST LEGER, R. J. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. **Microbiology**, v. 151, p. 361–371, 2005.

GIRARD, V.; DIERYCKX, C.; JOB, C.; JOB, D. Secretomes: the fungal strike force. **Proteomics**, v. 133, p. 4597–4608, 2013.

GRELL, M. N.; JENSEN, A. B.; OLSEN, P. B.; EILENBERG, J.; LANGE, L. Secretome of fungus-infected aphids documents high pathogen activity and weak host response. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 343–352, 2011.

GRISI, L. M. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, p. 150–156, 2014.

HEINIG, R. L.; PAAIJMANS, K. P.; HANCOCK, P. A.; THOMAS, M. B. The potential for fungal biopesticides to reduce malaria transmission under diverse environmental conditions. **Journal of Applied Ecology**, v. 52, p. 1558–1566, 2015.

HUNT, L. M. Differentiation between three species of *Amblyomma* ticks (acari: Ixodidae) by analysis of cuticular hydrocarbons. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 80, p. 245–249, 1986.

KIM, H. K.; HOE, H. S.; SUH, D. S.; KANG, S. C.; HWANG, C.; KWON, S. T. Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 777–783, 1999.

KIM, J.; OH, J.; YOON, D. H.; SUNG, G. H. Identification of calmodulin binding proteins in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Folia Microbiologica**, 63:13–16, 2018.

KIM, S. G.; WANG, Y.; LEE, K. H.; PARK, Z. Y.; PARK, J.; WU, J.; KWON, S. J.; LEE, Y. H.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R.; KIM, S. T.; KANG, K. Y. In-depth insight into *in vivo* apoplastic secretome of rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. **Journal Of Proteome Research**, v. 78, p. 58–71, 2013.

KIRKLAND, B. H.; EISA, A.; KEYHANI, N. O. Oxalic acid as a fungal acaricidal virulence factor. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 346–351, 2005.

KORDI, M. K.; FARROKHI, N.; MASOUDI, A.; SHADMEHRI, A. D.; SHAHROKH, G. Expression analyses of some *Beauveria bassiana* genes in response to cuticles of four different insects. **Journal of Crop Protection**, v. 4, p. 675–690, 2015.

KULKARNI, R. D.; KELKAR, H. S.; DEAN, R. A. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 118–121, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEGGET, M.; LELAND, J.; KELLAR, K.; EPP, B. Formulation of microbial biocontrol agents – an industrial perspective. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, p. 101–107, 2011.

LI, J.; YING, S. H.; SHAN, L. T.; FENG, M. G. A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 975–984, 2010.

LIANG, L.; WU, H.; LIU, Z.; SHEN, R.; GAO, H.; YANG, J.; ZHANG, K. Z. H. Proteomic and transcriptional analyses of *Arthrobotrys oligospora* cell wall related proteins reveal complexity of fungal virulence against nematodes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 8683–8692, 2013.

Lino ZR, Juventino LT, Raúl RG, Estibaliz S (2014) Lethal effects of a Mexican *Beauveria bassiana* (Balsamo) strain against *Meccus pallidipennis* (Stal). *Braz J Microbiol* 45:551–557

LIU, T. B.; CHEN, G. Q.; MIN, H.; LIN, F. C. MoFLP1, encoding a novel fungal fasciclin-like protein, is involved in conidiation and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10, p. 434–444, 2009.

MANALIL, N. S.; JUNIOR TÉO, V. S.; BRAITHWAITE, K.; BRUMBLEY, S.; SAMSON, P.; NEVALAINEN, K. M. Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles. **Fungal Biology**, v. 114, p. 637–645, 2010.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p. 177, 2016.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA I, J. R.; FERNANDES, E. K. K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, PII S0022-2011: 30365–30368, 2018.

MCCOTTER, S. W.; HORIANOPOULOS, L. C.; KRONSTAD, J. W. Regulation of the fungal secretome. **Current Genetics**, v. 62, p. 533–545, 2016.

MEIJER, H. J. G.; MANCUSO, F. M.; ESPADAS, G.; SEIDL, M. F.; CHIVA, C.; GOVERS, C.; SABIDÓ, E. Profiling the secretome and extracellular proteome of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, p. 2101–2113, 2014.

MENT, D.; GINDIN, G.; SOROKER, V.; GLAZER, I.; ROT, A.; SAMISH, M. *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 132–139, 2010.

MOON, E.; PARK, H. M.; LEE, C. H.; DO, S. G.; PARK, J. M.; HAN, N. Y.; DO, M. H.; LEE, J. H.; KIM, S. Y. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a potential UVB target in skin epidermis:

using an integrated approach of label-free quantitative proteomics and targeted metabolite analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 117, p.70–85, 2015.

PERINOTTO, W. M.; GÔLO, P. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J.; SÁ, F. A.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; JUNGES, A.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A.; SALLES, C. M.; BITTENCOURT, V. R. Enzymatic activities and effects of mycovirus infection on the virulence of *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 189–196, 2014.

RAMPITSCH, C.; DAY, J.; SUBRAMANIAM, R.; WALKOWIAK, S. Comparative secretome analysis of *Fusarium graminearum* and two of its nonpathogenic mutants upon deoxynivalenol induction in vitro. **Proteomics**, v. 13, p. 1913–1921, 2013.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology** v. 129, p. 389–403, 2004.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; BERGER, M.; GUIMARÃES, J. A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. **Toxicon**, v. 55, p. 874–880, 2010.

SANTI, L.; SILVA, W. O.; PINTO, A. F.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 824–828, 2009.

SEN-MIAO, T.; YING, C.; SHENG-HUA, Y.; MING-GUANG, F. Three DUF1996 proteins localize in vacuoles and function in fungal responses to multiple stresses and metal ions. **Scientific Reports**, v. 6, p. 20566, 2016.

SHAH, P.; ATWOOD, J. A.; ORLANDO, R.; EL; MUBAREK, H.; PODILA, G. K.; DAVIS, M. R. Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. **Journal of Proteome Research**, v. 83, p.1123–1130, 2009.

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

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B., J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-78, 1985.

STAATS, C. C.; JUNGES, A.; GUEDES, R. L.; THOMPSON, C. E.; DE MORAIS, G. L.; BOLDO, J.T.; DE ALMEIDA, L. G.; ANDREIS, F. C.; GERBER, A. L.; SBARAINI, N.; DA PAIXÃO, R. L.; BROETTO, L.; LANDELL, M.; SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; SILVEIRA, C.P.; SERRANO, T.R.; DE OLIVEIRA, E. S.; KMETZSCH, L.; VAINSTEIN, M. H.; DE VASCONCELOS, A. T.; SCHRANK, A. Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. **BMC Genomics**, v. 15, p.822, 2014.

- STAFFORD, K. C.; ALLAN, S. A. Field applications of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 47, p.1107–1115, 2010.
- TONG, S. M.; CHEN, Y.; ZHU, J.; YING, S. H.; FENG, M. G. Subcellular localization of five singular WSC domain-containing proteins and their roles in *Beauveria bassiana* responses to stress cues and metal ions. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, p. 295–304, 2016.
- TUDZYNSKI, P.; HELLER, J.; SIEGMUND, U. Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. **Current Opinion Microbiology**, v. 15, p. 653–659, 2012.
- VAKNIN, Y.; SHADKCHAN, Y.; LEVDANSKY, E.; MOROZOV, M.; ROMANO, J.; OSHEROV, N. The three *Aspergillus fumigatus* CFEM-domain GPI-anchored proteins (CfmA-C) affect cell-wall stability but do not play a role in fungal virulence. **Fungal Genetics Biology**, v. 63, p. 55–64, 2014.
- VALERO-JIMÉNEZ, C. A.; DEBETS, A. J.; VAN KAN, J. A.; SCHOUSTRA, S. E.; TAKKEN, W.; ZWAAN, B. J.; KOENRAADT, C. J. Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. **Malaria Journal**, v. 13, p. 479, 2014.
- VALERO-JIMÉNEZ, C. A.; VAN KAN JAL, KOENRAADT, C. J. M.; ZWAAN, B. J.; SCHOUSTRA, S. E. Experimental evolution to increase the efficacy of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes: effects on mycelial growth and virulence. **Evolutionary Applications**, v. 10, p. 433–443, 2017.
- WANG, J. J.; BAI, W. W.; ZHOU, W.; LIU, J.; CHEN, J.; LIU, X. Y.; XIANG, T. T.; LIU, R. H.; WANG, W. H.; ZHANG, B. L.; WAN, Y. J. Transcriptomic analysis of two *Beauveria bassiana* strains grown on cuticle extracts of the silkworm uncovers their different metabolic response at early infection stage. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 145, p. 45–54, 2017.
- WANG, Z. K.; WANG, J.; LIU, J.; YING, S. H.; PENG, X. J.; FENG, M. G. Proteomic and phosphoproteomic insights into a signaling hub role for Cdc14 in asexual development and multiple stress responses in *Beauveria bassiana*. **PLoS One**, v. 11, e0153007, 2016.
- WAWRA, S.; BELMONTE, R.; LOBACH, L.; SARAIVA, M.; WILLEMS, A.; VAN WEST, P. Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. **Curr Opin Microbiol**, v. 15, 685–669, 2012.
- WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U. A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE, G. M.; BEYSDA-SILVA, W. O.; MARTINS, J. R.; SCHRANK, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 207, p.302–308, 2015.
- WEEKS, E. N.; MACHTINGER, E. T.; GEZAN, S. A. KAUFMAN, P. E.; GEDEN, C. J. Effects of four commercial fungal formulations on mortality and sporulation in house flies (*Musca domestica*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, p.15–22, 2017.

XIA, C.; WANG, M.; CORNEJO, O. E.; JIWAN, D. A.; SEE, D. R.; CHEN, X. Secretome characterization and correlation analysis reveal putative pathogenicity mechanisms and identify candidate avirulence genes in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* fsp tritici. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 2394, 2017.

XIAO, G.; YING, S. H.; ZHENG, P.; WANG, Z. L.; ZHANG, S.; XIE, X. Q.; SHANG, Y.; LEGER, R. J. S.; ZHAO, G. P.; WANG, C.; FENG, M. G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v. 2, p. 483, 2012.

XU, Y.; OROZCO, R.; KITHSIRI; WIJERATNE, E. M.; ESPINOSA-ARTILES, P.; LESLIE GUNATILAKA, A. A.; PATRICIA STOCK, S.; MOLNÁR, I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 353–364, 2009.

ZHU, W.; WEI, W.; WU, Y.; ZHOU, Y.; PENG, F.; ZHANG, S.; CHEN, P.; XU, X. BcCFEM1, a CFEM domain-containing protein with putative GPIanchored site, is involved in pathogenicity, conidial production, and stress tolerance in *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Microbiol**, v. 8, p. 1807, 2017.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados do presente estudo, foi possível concluir que:

1. Repiques sucessivos em meio BDA afetaram o desenvolvimento de diferentes isolados de *Metarhizium*, apresentando colônias com variações fenotípicas e redução da produção conidial.
2. Somente após sucessivos repiques (20º ciclo), os isolados ARSEF 552 (*M. pingshaense*) e ARSEF 2521 (*M. anisopliae* s.s.) reduziram a eficácia no controle de fêmeas de *R. microplus*, apresentaram atraso na mortalidade de larvas diminuíram as atividades lipolíticas e proteolíticas tanto da superfície conidial quanto do secretado micelial.
3. Embora o uso do agente oxidante menadiona tenha sido capaz de alterar o desenvolvimento e reduzir a produção conidial do isolado ARSEF 2521 de *M. anisopliae*, melhorias à virulência contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e à atividade enzimática conidial foram observadas quando uma subdosagem (metade da CL50) foi adicionada ao meio de cultivo sólido.
4. A presença de menadiona em meio líquido basal acrescido de cutícula de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* possibilitou a detecção de diversas proteínas, em especial àquelas relacionadas à proteção contra fatores ambientais, morfogênese e patogenicidade.
5. O secretoma de *B. bassiana* foi caracterizado em meio que mimetiza a infecção em *R. microplus*, sendo diversas proteínas identificadas que futuramente poderão ser utilizadas como alvos fenotípicos na seleção de isolados fúngicos com potencial relevante para o controle de artrópodes, e em especial aplicado ao controle de carrapatos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do estresse em fungos artropodopatogênicos tem contribuído substancialmente no entendimento da patogenia e imprimido melhorias significativas à eficácia. Aqui, os efeitos deletérios de repiques sucessivos foram observados no controle *in vitro* de *R. microplus*. Redução de atividade enzimática e modificações do desenvolvimento fúngico são características indesejáveis e muitas vezes antagonistas à virulência. Assim, medidas como o cultivo em hospedeiros-alvo e posterior reisolamento – neste caso, os carrapatos – podem imprimir melhorias significativas, ou mesmo assegurar a manutenção da patogenicidade, em especial para isolados que encontrem preservados por longos períodos.

Em outra vertente, o estresse oxidativo, embora acarrete severos danos à célula, como visto aqui por meio do uso de menadiona, pode imprimir efeitos positivos ao biocontrole de *R. microplus*. Novas investigações considerando o efeito positivo do estresse à virulência devem ser as diretrizes atuais para a aplicação de um controle microbiológico mais eficaz utilizando fungos com *Metarhizium* spp.

Por fim, o estudo do secretoma de *B. bassiana* em meio que mimetiza algumas das condições da infecção em *R. microplus*, permite construir uma base de dados - futuros alvos proteicos de estudo - que favoreçam o entendimento da relação patógeno-hospedeiro e orientem na seleção de agentes para biocontrole em programas de controle de pragas, e em especial os carrapatos.

ANEXOS


1 – Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (UFRRJ)



Seropédica 14 de julho de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 037/2014 intitulado “**MANUTENÇÃO DE COLÔNIA DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* VISANDO A AVALIAÇÃO DO EFEITO DE FUNGOS ACARIPATOGÊNICOS NO SEU CONTROLE**” encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Parasitologia Animal, Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 14 de julho de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.



Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV



Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV