

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

**O COMPLEXO LIPOLÍTICO DE *Metarhizium anisopliae* E SUA RELAÇÃO  
COM O PROCESSO DE INFECÇÃO DE HOSPEDEIROS ARTRÓPODES**

Tese de doutorado

**Walter Orlando Beys da Silva**

Porto Alegre, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**O COMPLEXO LIPOLÍTICO DE *Metarhizium anisopliae* E SUA RELAÇÃO  
COM O PROCESSO DE INFECÇÃO DE HOSPEDEIROS ARTRÓPODES**

**Walter Orlando Beys da Silva**

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

ORIENTADORES: Marilene Henning Vainstein  
Augusto Schrank

Porto Alegre, 2009

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães pelo apoio e contribuições durante o desenvolvimento desta tese.

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

Aos professores da minha comissão de acompanhamento Prof. Dr. Hugo Verli e Prof. Dr. Carlos Termignoni por acompanhar a trajetória do doutorado.

Aos professores da banca, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Furlaneto, Prof. Dr. Dráuzio Rangel e Prof. Dr. Carlos Termignoni, pela avaliação do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Zaha pela leitura da tese.

Aos colegas e amigos Markus, Renata, José, Antônio, Lucas, Broetto, Fernanda, Simone, Kátia, Ângela, Lenise e Juliano pela convivência, apoio, contribuições e aprendizado.

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

Ao CNPq e CAPES pelo financiamento deste trabalho.

Aos amigos Sílvia e Luciano Saucedo pelo constante apoio e convivência.

A minha mãe pelo exemplo e apoio incondicional durante minha vida e formação profissional.

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

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

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	vii
Lista de figuras e tabelas	viii
Resumo	ix
Abstract	xi
<b>1. Introdução</b>	<b>13</b>
1.1. O controle biológico	13
1.2. O controle biológico e <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
1.3. Taxonomia de <i>M. anisopliae</i>	19
1.4. A aranha marrom <i>Loxosceles</i> sp.	20
1.5. O carrapato bovino <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	26
1.6. O processo de infecção	28
1.7. Fatores de virulência de <i>M. Anisopliae</i>	35
1.8. Lipases	40
1.8.1. Lipases e lipídeos	42
1.9. Lipases e sistemas de infecção	43
1.10. Lipases e <i>M. anisopliae</i>	49
<b>2. Objetivos</b>	
2.1. Objetivo Geral	52
2.2. Objetivos específicos	52
<b>3. Capítulos</b>	
3.1. Capítulo 1- Potential biocontrol of brown spider, <i>Loxosceles</i> sp., by the arthropod pathogenic fungus <i>Metarhizium anisopliae</i>	53
3.2. Capítulo 2- Substrate regulates <i>Metarhizium anisopliae</i> lipolytic enzymes secretion: a putative relation to the infection system	67
3.3. Capítulo 3- Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent <i>Metarhizium anisopliae</i>	80
3.4. Capítulo 4- Antibodies production against spore surface lipase from <i>Metarhizium anisopliae</i>	87
3.5. Capítulo 5- <i>Metarhizium anisopliae</i> lipolytic activity plays a pivotal role in <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> infection	102

<b>4. Discussão</b>	<b>125</b>
<b>5. Conclusões</b>	<b>133</b>
<b>6. Perspectivas</b>	<b>135</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b>	<b>136</b>
<b>8. Anexo</b>	<b>155</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Cm	Centímetro
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido etilnodiaminotetracético, sal sódico
G	grama, aceleração da gravidade
H	Hora
Kcat	Constante de catálise
Km	Constante de Michaelis-Menten
kDa	quilodaltons = 1.000 daltons
L	Litro
M	Molar
MC	Meio de Cove
Mg	Miligrama
Min	minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MUF	Metilumbeliferil
Nm	Nanômetro
OD	densidade óptica em absorbância em comprimento de onda
pNP	p-nitrofenil
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	potencial hidrogeniônico
Rpm	rotações por minuto
S	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
Triton X-100	éter octilfenólico de decaetilenoglicol
Tween	Polisorbitano
U	Unidade de atividade enzimática
V	Volts
v/v	volume por volume
Vmax	Velocidade inicial máxima

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Exemplos de aranha marrom.	22
<b>Figura 2.</b> Acidentes com picada de aranha marrom evidenciando lesões características como edema e dermonecrose	25
<b>Figura 3.</b> O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	27
<b>Figura 4.</b> Ciclo de infecção e possível mecanismo de penetração do fungo <i>M. anisopliae</i> e seus hospedeiros	30
<b>Figura 5.</b> Constituição básica do tegumento de artrópodes	32
<b>Figura 6.</b> Reações catalisadas por lípases	41
<b>Figura 7.</b> Possíveis funções de lipases microbianas extracelulares durante o processo de infecção	48
<b>Tabela 1.</b> Artrópodes alvos suscetíveis a infecção de <i>Metarhizium anisopliae</i>	18
<b>Tabela 2.</b> Produtos comercializados a base de <i>Metarhizium anisopliae</i>	19



## RESUMO

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) são serino hidrolases de considerável relevância fisiológica e potencial uso industrial. O fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* é um dos mais importantes e bem estudados agentes biológicos para o controle de muitos artrópodes-praga. Lipases secretadas por *M. anisopliae* podem estar potencialmente envolvidas no processo de infecção do hospedeiro, porém, estudos sobre estas enzimas vêm sendo negligenciados principalmente em fungos patogênicos. Neste trabalho, investigamos o complexo lipolítico de *M. anisopliae* relacionado com a infecção de hospedeiros artrópodes. *M. anisopliae* foi eficiente no controle da aranha marrom, *Loxosceles* sp., uma importante praga com grande impacto na saúde pública e também um modelo aracnídeo alternativo para bioensaios. Uma mortalidade de 100% para indivíduos juvenis foi observada em 12 dias e 9 dias para adultos usando  $10^9$  conídios.mL<sup>-1</sup> com valores de LT<sub>50</sub> de 8,35 dias e 6,57 dias respectivamente. Além disso, diferentes fontes de carbono, como constituintes da cutícula de artrópodes, influem na secreção de enzimas lipolíticas por *M. anisopliae*. Valores altos de atividade lipolítica foram induzidos em meios de cultura contendo constituintes do tegumento de artrópodes, quitina e estereato de colesteril. Em zimogramas, muitas bandas de atividade lipolítica foram observadas em todos os meios de cultura testados. Uma lipase de superfície de esporo de *M. anisopliae* (MASSL) fortemente associada à superfície do esporo do fungo foi purificada e caracterizada. Análises eletroforéticas mostraram que a massa molecular desta lipase é ~66 kDa e o pI 5,6. O seqüenciamento da proteína revelou que os peptídeos identificados em MASSL compartilham identidade com muitas lipases ou sequências relacionadas à lipases. A enzima foi capaz de hidrolisar muitos substratos com alguma preferência por esterres com cadeia de ácido graxo curta. Os valores de Km e Vmax para os substratos pNP palmitato (pNPP) e pNP laurato foram respectivamente 0,474 mM and 1,093 mMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> e 0,712 mM e 5,696 mMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. A temperatura ótima da lipase purificada foi de 30 °C e a enzima foi mais estável em valores de pH mais ácidos

(pH 3–6). A atividade de MASSL foi estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  e inibida por  $\text{Mn}^{2+}$ . O efeito inibitório na atividade exercido por EDTA e EGTA foi limitado, enquanto o inibidor de lipase ebelactone B inibiu completamente MASSL. Metanol 0,5% aparentemente não afetou a atividade enquanto  $\beta$ -mercaptoetanol ativou a enzima. Anticorpos contra MASSL foram produzidos e análises de *western blot* sugerem que o anticorpo é específico para lipase. Este trabalho também apresenta o perfil de atividade de lipase durante o processo de infecção do carrapato *Rhipicephalus microplus* e o efeito do inibidor de lipase ebelactona B na infecção. Durante a exposição dos carrapatos aos esporos a atividade de lipase aumenta de 0,03 a 0,312 U usando pNPP como substrato. Em zimogramas, bandas de atividade lipolítica foram detectadas em carrapatos tratados com esporos sem inibidor. O tratamento prévio dos esporos com o inibidor de atividade de lipase inibiu completamente a atividade lipolítica e preveniu a infecção do hospedeiro *R. microplus*. Os resultados apresentados neste trabalho são avanços importantes na elucidação da função desempenhada pelas lipases no processo de infecção do hospedeiro de *M. anisopliae*.

## ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are serine hydrolases of considerable physiological significance and industrial potential. The filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is one of the most important and best-studied biological agents for the control of many arthropod pests. Lipases secreted by *M. anisopliae* could potentially be involved in the host infection process, but studies about these enzymes have been neglected, mainly in fungi. In this work, we investigated the lipolytic complex of *M. anisopliae* related with infection of arthropod hosts. For this purpose, we attested the efficiency of *M. anisopliae* to control the brown spider, *Loxosceles* sp., an important plague with great impact on public health, as an alternative arachnid model other than the cattle tick for bioassays. A mortality rate of 100% for juvenile *Loxosceles* sp. was observed 12 days after application and 9 days for adults, using  $10^9$  conidia.mL<sup>-1</sup> with LT<sub>50</sub> values of 8.35 days and 6.57 days, respectively. We also evaluated the effects of different carbon sources, such as components of the arthropod cuticles, on the secretion of lipolytic enzymes by *M. anisopliae*. Higher values of lipolytic activities were induced in the culture media containing arthropod tegument constituents chitin and cholesteryl stearate. In zymograms, several lipolytic activity bands were observed in all culture media tested. An *M. anisopliae* spore surface lipase (MASSL) strongly bound to the fungal spore surface has been purified and characterized. Electrophoretic analyses showed that the molecular weight of this lipase is ~66 kDa and pI is 5.6. Protein sequencing revealed that identified peptides in MASSL shared identity with several lipases or lipase-related sequences. The enzyme was able to hydrolyze several substrates, with some preference for esters with a short acyl chain. The values of Km and Vmax for the substrates pNP palmitate (pNPP) and pNP laurate were respectively 0.474 mM and 1.093 mMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> and 0.712 mM and 5.696 mMol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. The optimum temperature of the purified lipase was 30 °C and the enzyme was most stable within the most acid pH range (pH 3–6). MASSL activity was stimulated by Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> and inhibited by Mn<sup>2+</sup>.

The inhibitory effect on activity exerted by EDTA and EGTA was limited, while the lipase inhibitor Ebelactone B completely inhibited MASSL. Methanol 0.5% apparently did not affect MASSL activity while  $\beta$ -mercaptoethanol activated the enzyme. Antibodies against MASSL were produced and western blot analysis suggests that the antibody is lipase specific. This work presents also the lipase activity profile during the host infection process of tick *Rhipicephalus microplus* and the effect of lipase activity inhibitor ebelactone B on infection. During the course of tick exposure to spores lipase, activity increased from 0.03 to 0.312 U, using pNPP as substrate. In zymograms, bands of lipase activity were detected in ticks treated with spores without inhibitor. The previous treatment of spores with lipase activity inhibitor completely inhibited lipolytic activity, and prevented the infection of the *R. microplus* host. We hope that results presented in this work will contribute to elucidate the role played by lipases in *M. anisopliae* host infection process.

## **1. INTRODUÇÃO**

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

### **1.1. O controle biológico**

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

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

O controle biológico se baseia em um dos fundamentos básicos das relações ecológicas entre os seres vivos de que cada espécie, seja animal, vegetal ou microbiana, possui inimigos naturais. Desta forma, organismos capazes de inibir o crescimento populacional de outros podem ser utilizados no controle de populações específicas que possam vir a se tornar pragas. Um agente biocontrolador eficiente deve propiciar uma redução significativa dos danos causados por um organismo praga, por morte ou redução de seu crescimento populacional (MELO & AZEVEDO, 1998). O controle biológico pode ser aplicado pela proteção e manutenção do desenvolvimento de um antagonista natural ou através da introdução de um competidor, patógeno ou predador exógeno (GRONVOLD et al. 1996). A aplicação de um organismo exógeno em um ambiente a fim de controlar uma determinada praga constitui no emprego do controle biológico clássico. Porém, respeitando as características básicas de um bom agente biocontrolador com potencial comercial, é fundamental a adaptação e o sucesso deste agente exógeno no ambiente de aplicação, para efetivo controle da praga alvo de maneira harmoniosa e sem impacto a outras espécies nativas (HOWARTH, 1996). Aspectos de grande relevância sobre o uso do controle biológico estão relacionados à intensidade e diferenças de formulações de aplicação. O uso de formulações de biopesticidas sem adição de agentes químicos caracteriza o controle biológico completo; a aplicação de agentes biocontroladores (75 a 100%) associados a outros agentes caracteriza o controle biológico substancial e a redução do emprego de controladores químicos (entre 25 e 50%) com o

uso de biocontroladores caracteriza o controle biológico parcial (GRONVOLD et al. 1996).

Comparado ao controle químico, o controle biológico apresenta inúmeras vantagens, especialmente quanto ao impacto ambiental, custo, manuseio, especificidade e desenvolvimento de resistência. Entretanto, os bioinseticidas, de maneira geral, apresentam ainda uma eficiência mais baixa em relação ao tempo de morte do organismo alvo, quando comparado ao controle químico. Esforços têm sido realizados com o intuito de potencializar o controle biológico utilizando microrganismos, visando otimizar a produção e o inóculo destes agentes, além de aumentar a estabilidade dos mesmos. O estudo das características básicas da relação entre o microrganismo e o seu respectivo hospedeiro tem permitido um melhor entendimento do processo de patogenicidade e de suas características específicas.

Entre os organismos utilizados como agentes no controle biológico de pragas, destacam-se os microrganismos pela facilidade de manuseio e aplicação, custo e conhecimento do processo de produção, além da eficiência pronunciada de algumas espécies já amplamente utilizadas com este intuito. Entre os microrganismos utilizados no controle de pragas destacam-se os fungos filamentosos, pois estes não necessitam ser ingeridos para que possam efetivar o controle do organismo-alvo, desenvolvendo-se, de forma ativa, diretamente sobre o tegumento do hospedeiro.

Os fungos foram os primeiros patógenos de insetos a serem utilizados para o controle microbiano destes organismos, destacando-se os gêneros: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (SHAH & PELL, 2003). A

grande variabilidade genética desses entomopatógenos pode ser considerada uma das suas principais vantagens. Mais de 700 espécies de fungos pertencentes a aproximadamente 90 gêneros são agentes etiológicos de 80% das doenças de insetos (ALVES, 1998).

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

Atualmente, *M. anisopliae* é um importante agente utilizado no controle biológico de pragas, tendo sua ação bastante estudada e amplamente utilizada (SHAH & PELL, 2003). Este fungo infecta mais de 300 espécies de insetos, incluindo pragas importantes tanto para agricultura como para pecuária (ALVES, 1998).

No Brasil, *M. anisopliae* é utilizado com sucesso desde 1965, para o controle da cigarrinha-da-cana (*Mahanarva posticata*) e, a partir daí, houve a instalação de laboratórios na região Nordeste para viabilizar sua utilização no controle biológico (MARQUES et al. 1981). Sua utilização tem aumentado nos últimos anos, atingindo milhares de hectares. Tal sucesso possibilitou a diminuição do uso de produtos químicos que inicialmente era de 150.000 ha/ano para 12.000 ha/ano, ou seja, uma redução de quase 90% (MELO & AZEVEDO, 1998), havendo ainda, perspectivas para sua utilização em nível comercial em outros países (FERNANDEZ, 2000). Além do controle da cigarrinha-da-cana, *M. anisopliae* é utilizado no Brasil para controlar a broca da cana-de-açúcar (*Diatrea saccharalis*), a cigarrinha das pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreriana*), percevejos da soja dos gêneros *Nezara* e *Piezodorus*, broca do café (*Diploschema rotundicollee*) e broca do rizoma



(*Cosmopolites sordidus*) em bananeira (ALVES, 1998). Em trabalhos experimentais, o fungo foi testado com sucesso sobre larvas de *Lucilia sericata* (WRIGHT et al. 2004), *Dysdercus peruvianus* (LUBECK, et al. 2008), *Musca domestica* (ALVES, 1998) e ectoparasitos de abelhas *Varroa destructor* (KANGA et al. 2003). Sua patogenicidade tem sido ainda demonstrada para alguns vetores de doenças humanas (SHERLOCK & GUITTON, 1982; SILVA & MESSIAS, 1986; SCHOLTE et al. 2005) e para carrapatos de diferentes gêneros e espécies (KAAYA et al. 1996; ZHIOUA et al. 1997; FRAZZON et al. 2000; FARENHORST et al. 2008). A Tabela 1 apresenta uma listagem de pragas comprovadamente suscetíveis à infecção e controle por *M. anisopliae*.

O primeiro relato de ocorrência natural de *M. anisopliae* infectando fêmea ingurgitada de carrapato foi realizado por COSTA et al. (2002), no município de Paracambi, no estado do Rio de Janeiro. Este fato evidenciou a possibilidade do uso de *M. anisopliae* como biocontrolador do carrapato bovino *R. microplus*, para o qual foi demonstrada elevada mortalidade em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas (BITTENCOURT et al. 1994; CASTRO et al. 1997; CORREIA et al. 1998; MONTEIRO et al. 1998; BITTENCOURT et al. 1999, 2000; FRAZZON et al. 2000; ONOFRE et al. 2001; FERNANDES et al. 2004). Recentemente foi relatada a capacidade de adaptação para o crescimento em raízes de plantas (ST LEGER, 2008).

**Tabela 1** - Artrópodes alvos suscetíveis a infecção de *M. anisopliae*.

Artrópode	Área de Impacto	Referência
<i>Aedes aegypti</i> (Vetor da dengue)	Saúde pública	SCHOLTE et al. 2007
<i>Anopheles gambiae</i> (Vetor da malária)	Saúde pública	SCHOLTE et al. 2005
<i>Triatoma infestans</i> (Vetor da doença de Chagas)	Saúde pública	JUAREZ et al. 2000; LAZZARINI et al. 2006
<i>Blatella germânica</i>	Saúde pública	QUESADA-MORAGA et al. 2004
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Pecuária	FRAZZON et al. 2000
<i>Glossina</i> sp. (Vetor da doença do sono)	Saúde pública	KAAYA & MUNYINI, 1995
<i>Peregrinus maidis</i>	Agricultura	TOLEDO et al. 2007
<i>Capnodis tenebrionis</i>	Agricultura	MARANINNO et al. 2006

Atualmente surgem cada vez mais produtos formulados a partir dos conídios de *M. anisopliae* para o manejo orgânico de pragas em diferentes países, inclusive no Brasil (Tabela 2). A regulamentação de biopesticidas deve respeitar normas, registros e regulamentações do país. Aspectos relacionados à segurança ambiental e ao manejo pelo usuário, além de possíveis implicações na saúde humana destacam-se entre as normas e exigências para aplicação e comercialização legal destes agentes biocontroladores. Nos últimos anos, entre os 171 biopesticidas desenvolvidos para o controle de ácaros e insetos 35,7% destes continham *M. anisopliae* em sua formulação (FARIA & WRAIGHT, 2007).

**Tabela 2** - Produtos comercializados a base de *M. anisopliae*.

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

Fonte: Ajay Bio-Tech (2009), Natural Rural (2009), Control Biologico (2009), Biotropic (2009).

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

*M. anisopliae* (Metschn.) Sorokin foi primeiramente isolado pelo microbiologista russo Metchnikoff em 1879 de uma praga de cereais, o besouro *Anisoplia austriaca*, e descrito por Sorokin em 1883 como *M. anisopliae*. Este fungo é amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado facilmente no solo, onde sobrevive por longos períodos (ALVES, 1998). *M. anisopliae* foi classificado durante muito tempo como Deuteromiceto pertencente à classe Hiphomycetes (TULLOCH, 1976). Entretanto, utilizando análises de seqüências da região de ITS (*internal transcribed spacers*) do rDNA, LIU et al. (2001, 2002) identificaram o fungo *M. anisopliae* var. *majus* como sendo a forma anamorfa de *Cordyceps brittlebankisoides*, classificando *M. anisopliae* var. *majus* como um ascomiceto.

Morfologicamente, *M. anisopliae* apresenta-se como um fungo filamentoso, com micélio hialino e septado, possuindo conidióforos

característicos, dos quais emergem conídios cilíndricos organizados em colunas. São conhecidas duas formas de reprodução: a reprodução assexual, responsável pelo crescimento vegetativo do fungo e a reprodução parassexual, que envolve os fenômenos de heterocariose e de recombinação mitótica. O desenvolvimento vegetativo de *Metarhizium* ocorre normalmente na faixa de temperatura entre 15 e 32 °C, sendo a temperatura ideal entre 24 e 30 °C e pH ótimo de 6,9 (DRIVER et al. 2000; ARRUDA, 2005). No entanto, existe tolerância a um intervalo de pH relativamente amplo (2,0 a 8,5). Os requisitos nutricionais do fungo são poucos, podendo utilizar como fonte de carbono o amido, a glicose, o glicerol, a maltose, a sacarose e a quitina (ALVES, 1998). Em uma revisão da classificação, levando-se em consideração análises de seqüências do rDNA, DRIVER et al. (2000) reavaliaram a taxonomia do gênero *Metarhizium* e encontraram um alto nível de diversidade genética entre 123 isolados analisados. Seus resultados confirmaram a prevalência do grupo *M. anisopliae* e os autores reconheceram duas outras variedades (*M. anisopliae* var. *lepidiotum* e *M. anisopliae* var. *acridum*), além de duas novas variedades de *M. flavoviride* (*M. flavoviride* var. *novazealandicum* e *M. flavoviride* var. *pemphigum*). Recentemente uma nova linhagem de *Metarhizium* foi isolada na China de cupins da espécie *Odontotermes formosanus* e classificada como uma nova variedade (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) (DONG et al. 2007).

#### **1.4. A aranha marrom *Loxosceles* sp.**

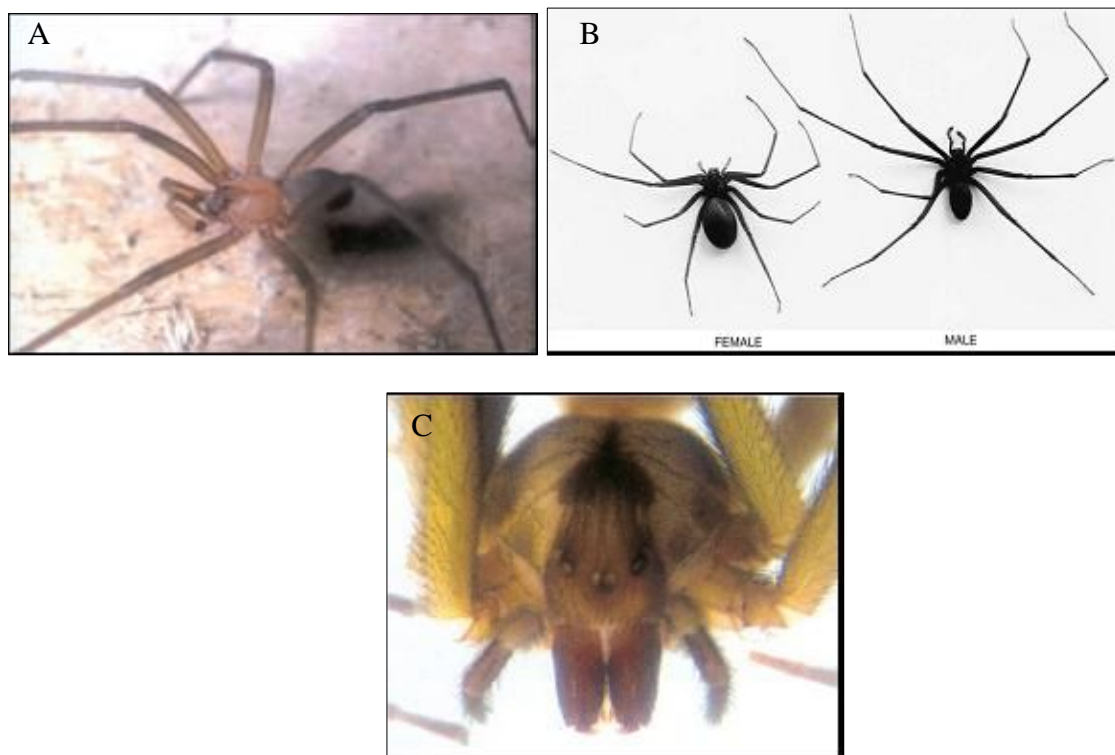
As aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles*, popularmente conhecidas como aranha marrom, são pragas urbanas, causadoras do

loxoscelismo, de grande relevância e impacto na saúde pública mundial. O termo loxoscelismo é usado para definir os acidentes envolvendo picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* e a sintomatologia resultante. As aranhas deste gênero possuem distribuição mundial e acidentes têm sido descritos nas Américas, Europa, Ásia, África e Oceania (SILVA et al. 2004). Existem cerca de 100 espécies de aranhas *Loxosceles*, porém, muitas destas são conhecidas a partir de poucos espécimes ou são endêmicas de áreas muito restritas e com importância exclusivamente acadêmica (SWANSON & VETTER, 2006). Na América do Norte, a aranha responsável pela maioria dos acidentes e a mais bem estudada é da espécie *L. reclusa* (SWANSON & VETTER, 2006). No Brasil, existe cerca de oito espécies relatadas, a maioria delas nas regiões sul e sudeste (SEZERINO et al. 1998). Porém, três espécies estão implicadas na grande maioria dos casos de envenenamento humano no Brasil e na América do Sul: *L. intermedia* (América do Sul), *L. gaucho* (Brasil) e *L. laeta* (Brasil e Argentina) (MALAQUE et al. 2002; SWANSON & VETTER, 2006), sendo *L. laeta* a mais tóxica (SWANSON & VETTER, 2006).

No Brasil, o loxoscelismo foi responsável por 36% dos 17781 casos de picadas de aranha entre os anos de 1990 e 1993, de acordo com o Ministério da Saúde (SEZERINO et al. 1998). Na região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná, o loxoscelismo é particularmente proeminente, com média anual de mais de 2500 acidentes por ano (MARQUES DA SILVA & FISCHER, 2005). *L. intermedia* é a aranha marrom predominante nos estados do Paraná e Santa Catarina (SILVA et al. 2004).

As aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidas como aranha marrom pela sua cor em tons de marrom, variando do marrom claro (*L. laeta*) até

chocolate escuro (*L. gaucho*). São aranhas pequenas e o tamanho do seu corpo varia de 8 até 15mm e suas pernas de 8 a 30 mm de comprimento. Apresentam dimorfismo sexual, sendo normalmente as fêmeas maiores que os machos e possuem seis olhos arranjados em pares com um par anterior e mais dois pares laterais, um de cada lado, (Figura 1) sendo esta disposição dos olhos descrita como melhor característica para identificação da aranha marrom, pois não varia entre as espécies de *Loxosceles* (VETTER & VISSCHER, 1998; SWANSON & VETTER, 2006).



**Figura 1 – Exemplos de aranha marrom. (A) *L. laeta*** (SWANSON & VETTER, 2006) e **(B) *L. intermedia*** (SILVA et al. 2004). Vista anterior de *L. reclusa* mostrando o padrão de 6 olhos arranjados em pares (SWANSON & VETTER, 2006).

As aranhas marrom são animais sedentários, apresentando hábito noturno e comportamento defensivo, preferindo presas mortas (SANDIDGE, 2003) não sendo consideradas agressivas para o homem (FURBEE et al. 2006). Constroem teias pegajosas e irregulares em forma de algodão esfiapado (FUTRELL, 1992). Preferem lugares secos, escuros, tranqüilos e ao abrigo das intempéries do ambiente, vivendo em frestas de barrancos, sob paus e pedras, cascas de árvores, sob troncos de árvores caídos e entulhos (FISCHER, 1996; ANDRADE et al. 1999, SILVA et al. 2004). Adaptam-se às condições domiciliares, alojando-se atrás de quadros, móveis, rodapés soltos, pilhas de tijolos, telhas e entulhos em geral, garagens, etc (FISCHER, 1996; FURBEE et al. 2006). Toleram temperaturas variando de 8 a 43 °C e podem sobreviver por dias e até mesmo meses sem água e alimento (FUTRELL,1992), vivendo de 3 a 7 anos (ANDRADE et al. 2000). Alimentam-se de pequenos insetos e servem de alimento para anfíbios, répteis e aves. Com um ano de vida atingem a maturidade sexual (FISCHER, 1996).

O veneno da aranha marrom é usado para paralisar a presa e também como mecanismo de defesa. A picada desta aranha pode causar uma síndrome necrotizante-hemolítica, e é a forma mais grave de araneísmo no Brasil (Figura 2) (SILVA, 2002). Sua peçonha é do tipo proteolítica e hemolítica, podendo produzir reações cutâneas (dermonecrose) e/ou viscerais levando, em alguns casos, até ao óbito (SILVA et al. 2004). Os principais sintomas resultantes da ação do veneno incluem, além da lesão necrosante, efeitos sistêmicos como febre, sensação de frio, erupções na pele, coceira, dores nas juntas e hemólise (FURBEE et al. 2006). Pelo fato destas aranhas não serem agressivas, as picadas, normalmente imperceptíveis, ocorrem quando as

peças comprimem-nas contra o corpo quando vestem suas roupas ou dormindo (FURBEE et al. 2006). O local da picada mais freqüente é o tronco e as regiões proximais dos membros (SEZERINO et al. 1998; MALAQUE et al. 2002). A forma cutânea de reação do veneno é de instalação lenta e progressiva e as principais manifestações clínicas locais são edema e eritema no local da picada, cuja lesão evolui com áreas hemorrágicas mesclada com palidez (“placa marmórea”), cercada por eritema, empastamento doloroso, com sensação de dor em queimadura ou prurido; após a delimitação da lesão, há formação de crosta necrótica seca que se desprende deixando uma úlcera que pode demorar meses para cicatrização completa (SILVA, 2002). Na forma cutâneo-visceral observa-se, além das manifestações locais, comprometimento clínico devido à hemólise intravascular como anemia, icterícia e hemoglobinúria, que se instalam geralmente nas primeiras 24 h. Nos casos graves pode haver evolução para insuficiência renal aguda, de etiologia multifatorial, sendo esta a principal causa de óbito no loxoscelismo (SILVA, 2002).

Pelo constante avanço dos grandes centros urbanos e o conseqüente desmatamento e diminuição de predadores naturais, a aranha marrom tornou-se, em várias regiões do mundo, uma praga de grande relevância médica. O transporte e o comércio contribuem muito para o envio e posterior colonização de novos locais por diferentes espécies de aranha marrom. Pelos hábitos deste animal e ausência de controladores específicos, o controle biológico surge como uma importante opção de controle populacional e, conseqüentemente, prevenção de acidentes ocasionados por esta praga.





**Figura 2 - Acidentes com picada de aranha marrom evidenciado lesões características como eritema e dermonecrose. (A) e (B) fechamento do olho via inflamação, edema e área de necrose (AKDENIZ et al. 2007); (C) lesão local 48h após a picada evidenciado dermonecrose e delimitação da área hemorrágica; (D) paciente 26 dias após a picada com intensa lesão necrótica (HOGAN et al. 2004).**

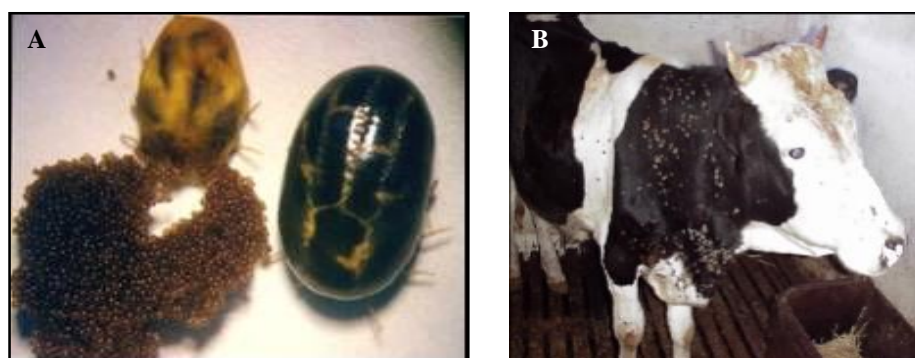
### 1.5. O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *R. microplus* (Figura 3) é um ectoparasita hematófago, cujo principal hospedeiro é o bovino. Este parasita é encontrado em áreas tropicais e subtropicais, entre as latitudes 40°N e 30°S, e estão disseminados por todo o continente americano, exceto no Chile e nos Estados Unidos, onde foram erradicados (FURLONG et al. 2002). A introdução desta praga no Brasil ocorreu com as primeiras importações de bovinos zebuínos (*Bos indicus*) do continente asiático, de onde o carrapato é originário (HOOGSTRAL, 1985). Assim como outros artrópodes-pragas, o controle deste organismo é feito por agentes químicos, acarretando no surgimento de resistência, principalmente em regiões com alta incidência de carrapatos.

*R. microplus* gera diversas perdas econômicas, tornando-se o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul. Um único carrapato suga, em média, de 2 a 3 mL de sangue do hospedeiro, o que reflete em grandes perdas na produção de leite e carne. Além disso, durante o processo de alimentação, os carrapatos podem causar ação traumática e espoliativa, pela dilaceração de células e tecidos, bem como ação tóxica, pela inoculação de substâncias através da saliva (LEAL et al. 2003). Além disso, este carrapato pode atuar como vetor de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e por rikétsias do gênero *Anaplasma* (ANGUS, 1996; LEAL et al. 2003; ESTRADA-PEÑA et al. 2006). Este parasita pode modificar os parâmetros bioquímicos sanguíneos, funções renais e digestivas do hospedeiro (CORREIA et al. 1998; GONZÁLES-ACUÑA & GUGLIELMONE, 2005) e causa importantes alterações sistêmicas

na hemostasia durante a infestação de bovinos (RECK et al. 2009). GRISI et al. (2002) relataram que as perdas econômicas causadas por *R. microplus* podem chegar a cerca de dois bilhões de dólares anuais, valores que resultam da diminuição de ganho de peso, gastos com ectoparasiticidas, diminuição da produção de leite, depreciação do couro e lesões contaminadas, predispondo a miíases.

No Rio Grande do Sul, a diminuição da produção de carne e da qualidade do couro aumentou devido à introdução do gado da espécie *Bos taurus*, mais suscetível ao carrapato (EVANS et al. 2000). Alternativas ao controle químico, como o emprego atestadamente eficiente, em laboratório, de *M. anisopliae* pode ser extremamente interessante comercialmente por todas as vantagens inerentes ao seu emprego.



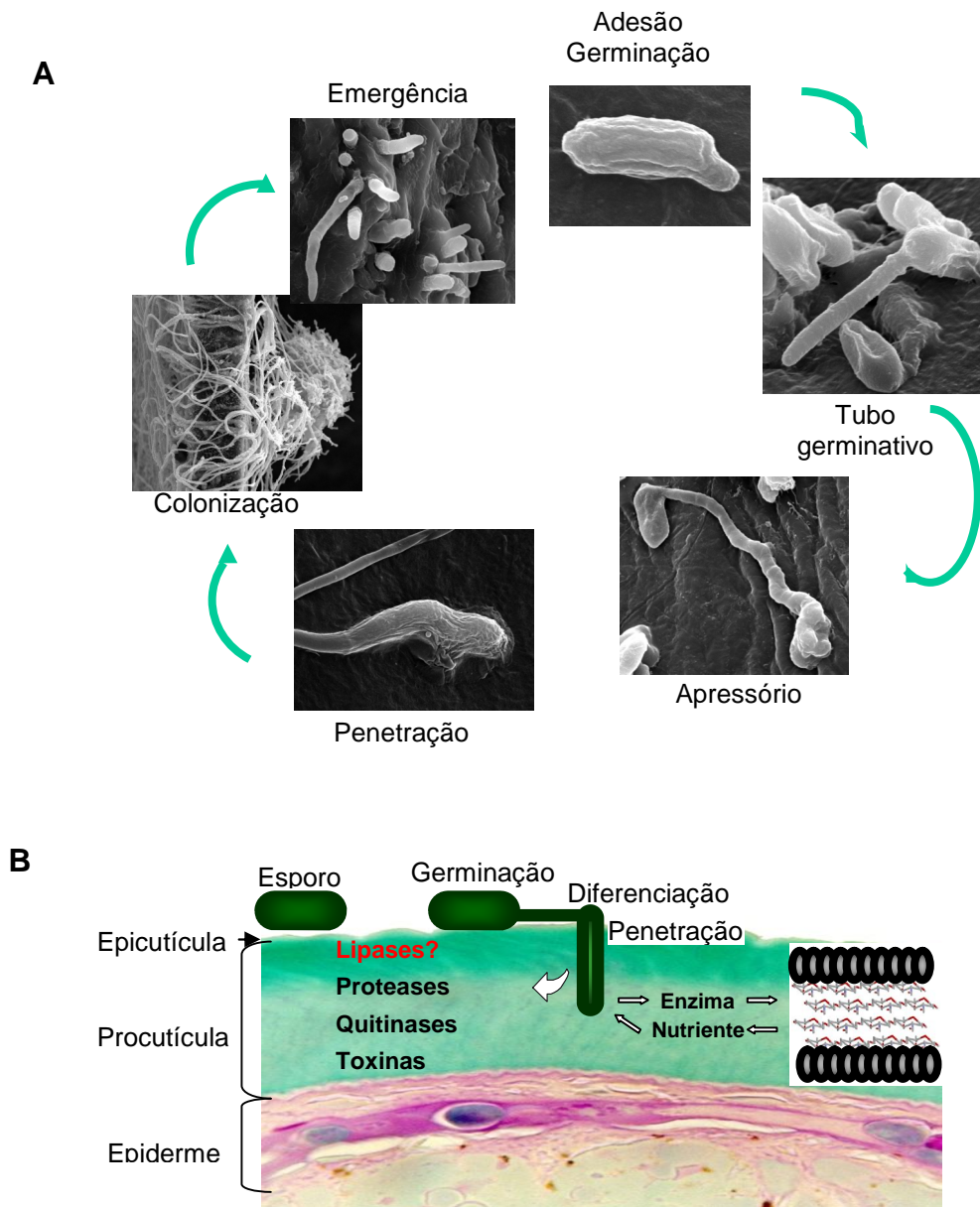
**Figura 3 – O carrapato *R. microplus*.** (A) Fêmeas de *R. microplus* ovipositando (esquerda), com considerável diminuição de tamanho em relação a fêmea ingurgitada (direita). Tamanho aproximado de 5mm (<http://www.ufrgs.br/depbiot/201>). (B) bovino com infestação de carrapatos (EMBRAPA Gado de Corte).

## 1.6. O processo de infecção

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

O mecanismo de infecção ocorre pela combinação de dois processos: pressão mecânica, exercida pela extremidade modificada das hifas (apressório) e, degradação por enzimas hidrolíticas como proteases e quitinases (Figura 4) (KUCERA, 1980; ST. LEGER et al. 1986a, 1991b; PINTO et al. 1997; ALVES, 1998; KRIEGER DE MORAES et al. 2003; BARRETO et al. 2004; SILVA et al. 2005). Encontrando condições ambientais favoráveis, os esporos do fungo interagem hidrofobicamente com a cutícula do hospedeiro (BIDOCHKA et al. 1997). Esta etapa é considerada limitante para o sucesso da infecção e o papel de hidrofobinas (ST LEGER et al. 1992; FANG et al. 2007) e de adesinas é extremamente relevante (WANG & ST LEGER, 2007a). A adesão do esporo é mediada por interação hidrofóbica entre proteínas apolares, as hidrofobinas, e a camada lipídica do hospedeiro (ST LEGER et al. 1992; FANG et al. 2007). Recentemente, foi demonstrada a participação de uma adesina (MAD1) na adesão de esporos em larvas de *Manduca sexta*, sendo diminuída a germinação e a virulência em mutantes nulos para o gene que codifica esta proteína (WANG & ST LEGER, 2007a). Estruturas da superfície, topologia e composição química da cutícula dos artrópodes também podem afetar a

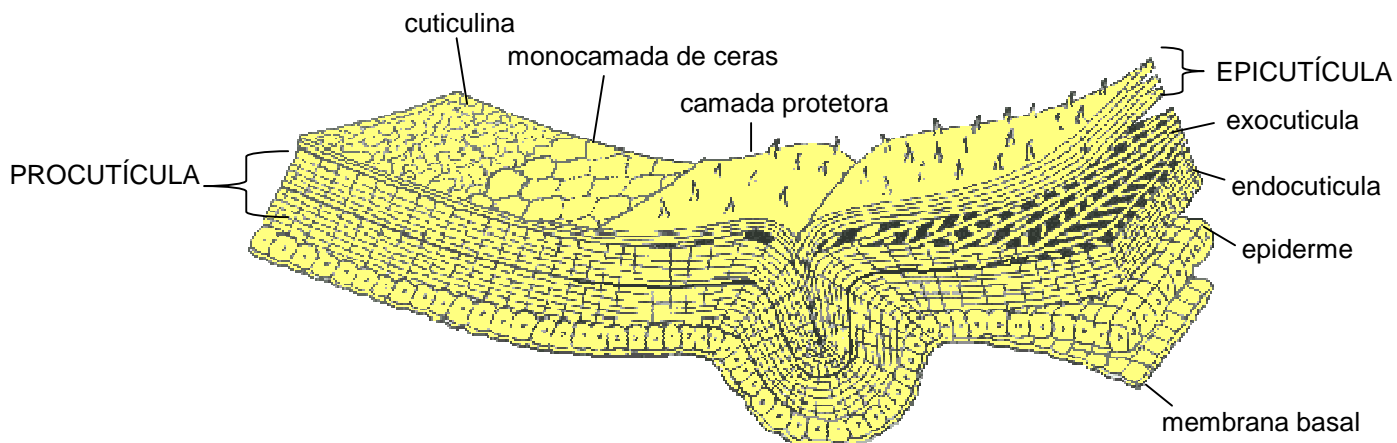
adesão do esporo (LORD & HOWARD, 2004; PEDRINI et al. 2007). *M. anisopliae* é capaz de reconhecer sinais específicos do hospedeiro, provavelmente lipídios da epicutícula, sendo a especificidade decorrente destes sinais (PEDRINI et al. 2007). Segundo ST LEGER et al. (1991a), os componentes presentes na epicutícula são extremamente heterogêneos, inclusive entre artrópodes do mesmo gênero. Após o contato e adsorção sobre o tegumento do hospedeiro o esporo germina e o fungo desenvolve-se iniciando todo o processo de infecção.



**Figura 4 - Ciclo de infecção e possível mecanismo de penetração do fungo *M. anisopliae* em seus hospedeiros. (A) Ciclo de infecção sobre o carrapato bovino *R. microplus* (modificado de ARRUDA, 2005). (B) Durante o processo de penetração na cutícula dos hospedeiros o fungo secreta diversas enzimas hidrolíticas, com função relacionada a aquisição de nutrientes e degradação dos componentes do tegumento do hospedeiro. No detalhe uma representação esquemática da procutícula (cedida por SCHRANK, A.).**

A cutícula do hospedeiro é a principal barreira contra infecções e apresenta natureza química complexa nos artrópodes, sendo formada por duas camadas: a epicutícula e a procutícula (Figura 5). A procutícula compreende a maior parte da cutícula sendo sua composição basicamente de natureza protéica e quitinosa (CLARKSON & CHANRLEY, 1996). Nesta porção encontram-se, portanto, sítios específicos para ação de proteases e quitinases. Porém, para que o fungo alcance esta camada do tegumento é necessário que este transponha a epicutícula, camada superficial, composta majoritariamente por lipídeos esterificados, substratos específicos para a ação de lipases.

A epicutícula, camada mais externa da cutícula, é delgada (0,1 – 3  $\mu\text{m}$ ) e composta por pelo menos duas camadas distintas sendo a mais interna denominada de cuticulina composta por lipoproteínas, lipídeos polimerizados e polifenóis, e outra mais externa, uma camada orientada de ceras formada exclusivamente por lipídeos esterificados a partir de ácidos graxos (em sua maioria de cadeia longa) e álcoois (HACKMAN & FILSHIE, 1982; PEDRINI et al. 2007). Em alguns insetos pode haver ainda uma camada protetora sobre esta camada de ceras com a função de protegê-la de processos abrasivos.



**Figura 5 - Constituição básica do tegumento de artrópodes.** (SILVA, 2005)

Na superfície do esporo ainda não germinado, foi detectada a presença de enzimas como proteases, esterases e N-acetilglicosidases, que auxiliam na adesão e na aquisição preliminar de nutrientes, causando modificações superficiais na cutícula do hospedeiro (ST LEGER et al. 1990). Estes esporos germinam sobre o inseto produzindo um tubo germinativo, que, na extremidade, se modifica formando o apressório. *M. anisopliae* pode desenvolver o apressório *in vitro* ou *in vivo*, sendo influenciado pela superfície topográfica e por superfícies hidrofóbicas duras (ST LEGER et al. 1991b; MILNER, 2000). O apressório acumula açúcares, sendo responsável pela geração de pressão osmótica necessária para a penetração (WANG & ST LEGER, 2007b). Recentemente, foram demonstrados pelo menos quatro sinais diferentes que afetam a formação do apressório: (i) a fração polar da cutícula do hospedeiro, (ii) os níveis de nutrientes, (iii) a superfície hidrofóbica, e (iv) sinais ainda desconhecidos resultantes da carapaça do hospedeiro (WANG &



ST LEGER, 2005). Após a formação do apressório, desenvolvem-se os grampos de penetração, que são caracterizados por uma alteração na parede celular da porção do apressório que está em contato com o hospedeiro, sendo mais fina e saliente (ST LEGER et al. 1991b; CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Após transpor a cutícula, há um espessamento das hifas e a formação de blastosporos responsáveis pela nutrição do fungo com a degradação das fontes de carbono da hemolinfa dos hospedeiros. Com o desenvolvimento do fungo, toxinas e metabólitos secundários, como os ácidos cítrico e oxálico, são secretados (BIDOCHKA et al. 1997).

A penetração do fungo no hospedeiro ocorre por uma combinação de pressão mecânica e degradação enzimática (ST LEGER et al. 1986a; ARRUDA et al. 2005; SILVA et al. 2005). Nesta etapa do processo patogênico são produzidas enzimas fundamentais para a degradação da cutícula, como lipases/esterases, quitinases e proteases (KUCERA, 1980; ST. LEGER et al. 1986a, 1991b; ALVES, 1998; KRIEGER DE MORAES et al. 2003; SILVA et al. 2005). As primeiras enzimas comprovadamente secretadas no início da penetração são as proteases, que participam da hidrólise da porção protéica da cutícula. Possivelmente as lipases precedam as proteases devido à camada de composição lipídica externa, epicutícula, encontrada na cutícula dos artrópodes (ST LEGER et al. 1986a). Entretanto, muito pouco tem sido relatado em relação a estas enzimas que comprovadamente são secretadas por *M. anisopliae* (SILVA et al. 2005), inclusive durante o processo de infecção do carrapato bovino *R. microplus* (SILVA, 2005). A atividade quitinolítica decorre à proteolítica devido à estrutura física da cutícula de artrópodes, uma vez que as fibras de quitina funcionam como sítios de ancoramento para algumas

proteínas, estando, portanto recobertas por uma matriz de natureza protéica (BIDOCHKA et al. 1997).

Após a penetração, inicia-se o processo de colonização. As hifas germinam, sofrem um engrossamento, ramificam-se e desenvolvem-se como blastosporos na hemocele. O fungo coloniza a cavidade interna do corpo do hospedeiro e produz metabólitos secundários, como ácidos orgânicos e toxinas ciclodepsipeptídicas, conhecidas como destruxinas (DTX) que vão pronunciar o processo patogênico. Foram descritos diferentes tipos de DTX: A, B, C, D e E, e outras 27 variantes (WANG et al. 2003), as quais causam paralisia muscular e inibição da função de hemócitos e túbulos de Malpighi além da supressão do sistema imune do hospedeiro (BIDOCHKA et al. 1997; MELO & AZEVEDO, 1998; KERSHAW et al. 1999; PAL et al. 2007). As destruxinas, encontradas em *M. anisopliae* podem variar de acordo com o substrato utilizado pelo fungo. O tempo de colonização pode variar, dependendo do hospedeiro e das condições ambientais (HSIAO & KO, 2001; WANG et al. 2003).

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

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

A grande variabilidade genética que apresenta esta espécie resulta no aparecimento de muitas linhagens com diferentes graus de virulência, especificidade, produção de conídios e resistência à luz ultravioleta (ALVES, 1998; ARRUDA, 2005). Linhagens patogênicas de *Metarhizium* para uma espécie particular de hospedeiro, podem não apresentar as mesmas características de patogenicidade para outras espécies de artrópodes (HUXHAM et al. 1989). Uma definição aceita de virulência é “o grau de patogenicidade entre um grupo ou espécies” (SHAPIRO-ILAN et al. 2005), e a variação na virulência de linhagens fúngicas sobre uma variedade de insetos pode ser relacionada com a produção de enzimas, entre outros fatores (BIDOCHKA & KHACHATOURIANS, 1990).

Para que as hifas atravessem a cutícula dos artrópodes, o reconhecimento e a resposta do hospedeiro parecem críticos para a seqüência de eventos que culmina em uma infecção eficiente. Sugere-se que várias classes de genes de patogenicidade estejam envolvidas nesse processo (FREIMOSER et al. 2003; DUTRA et al. 2004): Pode-se dividir estes grupos de genes como: (i) aqueles que codificam receptores que detectam a presença do hospedeiro; (ii) aqueles que codificam enzimas que facilitam a penetração; (iii) aqueles cujos produtos inativam as defesas do hospedeiro; e (iv) aqueles que codificam toxinas necessárias para causar sintomas de doença (SCREEN et al. 2001; FREIMOSER et al. 2003).

Vários fatores têm sido apontados como possíveis determinantes de patogenicidade para *M. anisopliae*, entre os quais a produção de toxinas e a

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

A possibilidade de correlação entre a virulência de fungos entomopatogênicos com a produção de enzimas que degradam a cutícula de insetos tem sido amplamente investigada. Entretanto, apenas a protease PR1A, uma protease do tipo subtilisina, está comprovadamente envolvida na entomopatogenicidade de *M. anisopliae* (ST. LEGER et al. 1996a; JOSHI et al. 1997). Quando cópias múltiplas do gene *pr1a*, fusionadas a um promotor constitutivo, foram inseridas em *M. anisopliae*, a sua eficiência no processo de infecção foi substancialmente aumentada, ocorrendo uma redução de 25% no tempo necessário para matar larvas de *Manduca sexta* em comparação com a linhagem selvagem (ST. LEGER et al. 1996a). Entretanto, WANG et al. (2002) mostraram que mutantes espontâneos estáveis de *M. anisopliae* linhagem V275 deficientes para os genes *pr1a* e *pr1b* são capazes de infectar o inseto *Galleria mellonella*. A infecção ocorreu em níveis similares àqueles da linhagem selvagem, mas com uma redução na patogenicidade para outro inseto, *Tenebrio molitor*. Este fato demonstrou que estas proteases não são os únicos fatores envolvidos na patogenicidade (WANG et al. 2002).

*M. anisopliae* produz várias isoformas de proteases do tipo subtilisina PR1. No banco de seqüências *Genbank* encontram-se disponíveis seqüências de onze genes de protease da família das subtilisinas PR1 (PR1A a K), sendo essas encontradas em um banco de ESTs, estabelecido por FREIMOSER et al (2003). As diferentes isoformas das subtilisinas são oriundas de eventos de duplicação gênica e provavelmente estas isoformas estão relacionadas com a patogenicidade, aumento da adaptabilidade em diferentes ambientes e especificidade para o hospedeiro podendo ocorrer também com genes de outras hidrolases envolvidas neste processo (BAGGA et al. 2004; HU & ST LEGER, 2004).

A segunda classe de proteases com maior produção *in vitro*, quando *M. anisopliae* é cultivado em cutícula de insetos, é a de serino proteases relacionadas com tripsinas (PR2) (GILLESPIE et al. 1998; ST. LEGER et al. 1994). Duas destas isoformas de PR2 parecem estar associadas ao apressório, sugerindo que estão disponíveis durante os primeiros estágios da colonização da cutícula (ST. LEGER et al. 1994b). Embora o gene que codifica para uma destas serino proteases tenha sido clonado e caracterizado, ainda não está completamente elucidada a função de PR2 na patogenicidade. Entretanto, é possível que PR2 seja relevante na indução ou na ativação de PR1A (SMITHSON et al. 1995). Outras proteases também são secretadas por *M. anisopliae* como do tipo cisteíno-protease (Pr4, podendo ser uma isoforma de Pr2) (COLE et al. 1993), carboxipeptidases (ST. LEGER et al. 1994b; JOSHI & ST LEGER, 1999) e metaloproteases (ST LEGER et al. 1994a). A identificação de inibidores de proteases produzidos por artrópodes durante o

processo infeccioso constitui um indício da importância destas enzimas para a infecção de *M. anisopliae* em hospedeiros (SASAKI et al. 2008).

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

Apenas três genes que codificam quitinases de *M. anisopliae* foram clonados: genes *chit1*, *chit2* e *chit3* (BOGO et al. 1998; FREIMOSER et al. 2003; BARATTO, 2005) e um quarto gene, o gene *chit11* descrito por KANG et al. (1998). Entretanto, foi sugerido que o gene *chit11* é oriundo de *E. coli*, sendo seu isolamento um artefato da construção da biblioteca do fungo, pois o gene apresenta 100% de homologia com o gene *chiA*, identificado em um projeto genoma de *E. coli* (FRANCETIC et al. 2000). SCREEN et al. (2001) demonstraram que transformantes de *M. anisopliae* var. *anisopliae* superexpressando o gene *chit1* (que codifica para uma quitinase de 42 kDa) de

*M. anisopliae* var. *acridum* não alterou a patogenicidade contra *M. sexta*. Porém, isto não significa que estas enzimas não participem da infecção.

Estudando o complexo quitinolítico secretado por *M. anisopliae* var. *anisopliae* em condições de indução, PINTO et al. (1997) demonstraram a presença de pelo menos três enzimas quitinolíticas e mais recentemente, SILVA et al. (2005) detectaram pelo menos seis enzimas quitinolíticas. Uma destas quitinases, de 30kDa (CHIT30), apresenta atividade de endo e exoquitinase. Como esta capacidade provavelmente habilita esta quitinase a degradar mais eficientemente a quitina, é provável que desempenhe uma função importante durante o processo de penetração dos hospedeiros. SILVA et al. (2005) demonstraram a presença desta quitinase CHIT30 durante o processo de infecção e penetração de *M. anisopliae* sobre o carrapato bovino *R. microplus* através de imunolocalização, sugerindo a importância desta enzima no processo de patogenicidade. Em um trabalho com outro fungo entomopatogênico, *Beauveria bassiana*, a superexpressão de uma endoquitinase, denominada Bchit1, ocasionou um aumento da virulência para um afídeo (*Myzus persicae*), diminuindo 50% a sua concentração letal e em 50% o tempo que levou para matar os insetos adultos (FANG et al. 2005), o que contribuiu para a conclusão que as quitinases são enzimas que estão potencialmente envolvidas na patogenicidade. A ação das quitinases em processos específicos como infecção de patógenos requer um mecanismo de indução/repressão, em que a quitina e seus produtos de degradação induzem a secreção de quitinases, enquanto glicose e outras fontes de carbono facilmente metabolizáveis reprime a secreção (KRIEGER DE MORAES et al. 2003; SILVA et al. 2005). Porém, a regulação destas enzimas não está completamente

elucidada, uma vez que transcritos de genes de quitinases aparecem durante o cultivo em meio contendo glicose (BARATTO et al. 2006).

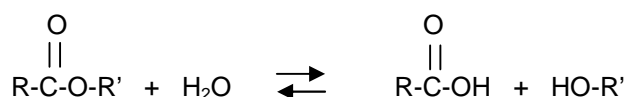
### **1.8. Lipases**

Lipases (triacilglicerol ester hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam, entre outras reações, a hidrólise das ligações éster de lipídeos gerando álcoois e ácidos graxos (Figura 6). São enzimas de considerável importância fisiológica e industrial, constituindo um dos mais importantes grupos de biocatalizadores com aplicação biotecnológica (JAEGER & EGGERT, 2002; JOSEPH et al. 2008; REIS et al. 2009), por serem utilizadas nos mais variados segmentos industriais, como a indústria química, de alimentos, farmacêutica, do papel, coureira, de cosméticos, detergentes, entre outras (SHARMA et al. 2001; JAEGER & EGGERT, 2002; REETZ, 2002; JOSEPH et al. 2008; REIS et al. 2009).

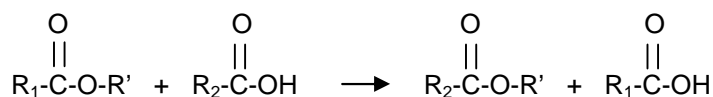
O número de lipases comerciais vem crescendo desde os anos 80 em virtude da demanda por estes biocatalisadores, visto suas características de grande potencial industrial (BORNSCHEUER et al. 2002). A maioria das lipases comerciais é de origem microbiana, destacando-se alguns fungos filamentosos pelo baixo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



### Hidrólise e esterificação



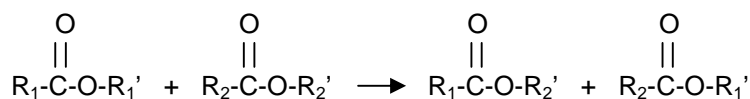
### Acidólise (reação de éster com ácido)



### Alcoólise (reação de éster com álcool)



### Transesterificação (reação de éster com éster)



**Figura 6- Reações catalisadas por lipases.**

Ao contrário das esterases, as lipases possuem uma atividade pronunciada na interface óleo-água, fenômeno este que ocorre por características estruturais específicas pertencentes a este grupo de enzimas (JAEGER et al. 1999; UEDA et al. 2002; REIS et al. 2009). As lipases possuem um oligopeptídeo helicóide, uma espécie de “tampa” que protege o sítio ativo. Ao interagir com uma superfície hidrofóbica, o sítio ativo é exposto, permitindo livre acesso ao substrato; processo este característico das verdadeiras lipases, chamado de ativação interfacial (REETZ, 2002; JOSEPH et al. 2008). O sítio ativo destas enzimas é caracterizado geralmente por uma tríade composta de serina (nucleófilo), histidina (resíduo básico) e aspartato (resíduo ácido –

podendo ser ácido glutâmico em alguns casos), crucial para todas as reações catalisadas pelas lipases sendo, portanto, classificadas como serino hidrolases (UPPENBERG et al. 1994a,b; JAEGER et al. 1999; REETZ, 2002; JOSEPH et al. 2008).

### **1.8.1. Lipases e lipídeos**

Os lipídeos, principal alvo de ação das lipases, possuem diversas funções no metabolismo e constituição de todos os seres vivos, formando o quarto principal grupo de moléculas biológicas encontradas em todas as células, e apresentando uma variedade estrutural maior do que todas as outras moléculas biológicas (VOET et al. 2000). Os lipídeos são caracterizados basicamente por possuírem um esqueleto carbônico, serem majoritariamente hidrofóbicos e a maioria dos seus constituintes serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Não são poliméricos, mas têm, por suas características estruturais e químicas, a capacidade de se agregarem, exercendo neste estado sua mais característica função como matriz estrutural de membranas biológicas. Além de servirem como estoque de energia e como componentes estruturais de membranas celulares, são também extremamente importantes como efetores biológicos. Os lipídeos atuam na sinalização intra e extracelular, transporte intracelular e transcrição gênica, entre outras funções (VOET et al. 2000; STEHR et al. 2003). Diversas substâncias constituem este importante grupo de moléculas, como gorduras, óleos, ácidos graxos, algumas vitaminas, hormônios entre outras. Além disso, os lipídeos podem exercer a função de proteção contra dessecação ao formarem uma barreira

impermeável à água, como é o caso dos lipídeos que ocorrem na cutícula de plantas e artrópodes (BUCZEK, 1999; SHAH, 2005; BENOIT et al, 2007; PEDRINI et al 2007; REINA-PINTO & YEPHREMOV, 2009), protegendo-os também contra predadores e infecções microbianas.

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

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

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

Além das diversas possibilidades de aplicação industrial e importância fisiológica, é crescente a evidência de que lipases são importantes fatores de virulência microbianos (STEHR et al. 2003). Vem aumentando o número de trabalhos relacionando as lipases e os mais diversos sistemas de infecção, ou comprovando papéis importantes exercidos por estas enzimas nestes sistemas.

Entre os muitos microrganismos estudados onde se caracteriza a participação de lipases durante seu processo de infecção, estão as bactérias. Algumas do gênero *Staphylococcus* são amplamente estudadas em relação à

participação destas enzimas. *S. epidermidis*, descrito como um habitante comensal da pele de seres humanos, pode se tornar um patógeno oportunista e duas lipases secretadas durante o processo de infecção podem ter um papel importante, suportando o crescimento e a colonização ao clivar triacilgliceróis derivados do sebo (LONGSHAW et al. 2000). Isolados clínicos de *S. aureus* oriundos de infecções profundas produzem lipases em níveis muito maiores que os isolados superficiais, indicando a importância na nutrição e na disseminação da bactéria (ROLLOF et al. 1987). A principal função para estas enzimas na virulência realmente é relacionada à degradação de lipídeos para aquisição de nutrientes (BRADY et al. 2006). Estudos *in vitro* com lipase purificada de *S. aureus* mostraram que ela pode também influenciar a quimiotaxia de células do sistema imune humano (ROLLOF et al. 1988). Além disso, granulócitos incubados com a lipase mostraram um decréscimo em relação à capacidade fagocitária, possivelmente por danos estruturais na superfície de células imune causados pela enzima microbiana. Outra evidência da participação de lipases no processo de infecção de *S. aureus* é seu potencial imunogênico, já que anticorpos IgG anti-lipase foram detectados em pacientes infectados por este microrganismo e também em biofilmes (RYDING et al. 1992; ETZ et al. 2002; BRADY et al. 2006). Outra importante bactéria que habita a pele de seres humanos é o agente causador da acne *Propionibacterium acnes*, que secreta diversas enzimas, incluindo lipases relacionadas com a colonização da pele humana. Neste sistema, as lipases têm um importante papel na patogênese, tanto em células livres, como em biofilmes (COENYE et al. 2007). Ácidos graxos livres liberados pela ação da atividade lipolítica facilitam a adesão bacteriana e, conseqüentemente, a

colonização dos folículos sebáceos (MISKIN et al. 1997). Além disso, produzem alguns ácidos graxos irritantes que contribuem substancialmente para a inflamação (JAPPE, 2003).

As lipases também atuam no processo de infecção de *Pseudomonas aeruginosa* de maneira sinérgica com outras enzimas, como uma fosfolipase C, desorientando a resposta imune, iniciando danos teciduais e estimulando processos inflamatórios (KÖNIG et al. 1996). No complexo *Burkholderia cepacia*, um importante grupo de 10 espécies de patógenos altamente relacionados associados com infecção em fibrose cística, a lipase é relevante na infecção de células epiteliais de pulmão (MULLEN et al. 2007). Em *Mycobacterium tuberculosis*, as lipases estão também potencialmente relacionadas com diferentes etapas da infecção (CÔTES et al. 2008). Por tudo isso fica evidente a relevância destas enzimas nos sistemas bacterianos de infecção. Porém, estes não são os únicos microrganismos onde as lipases participam ativamente.

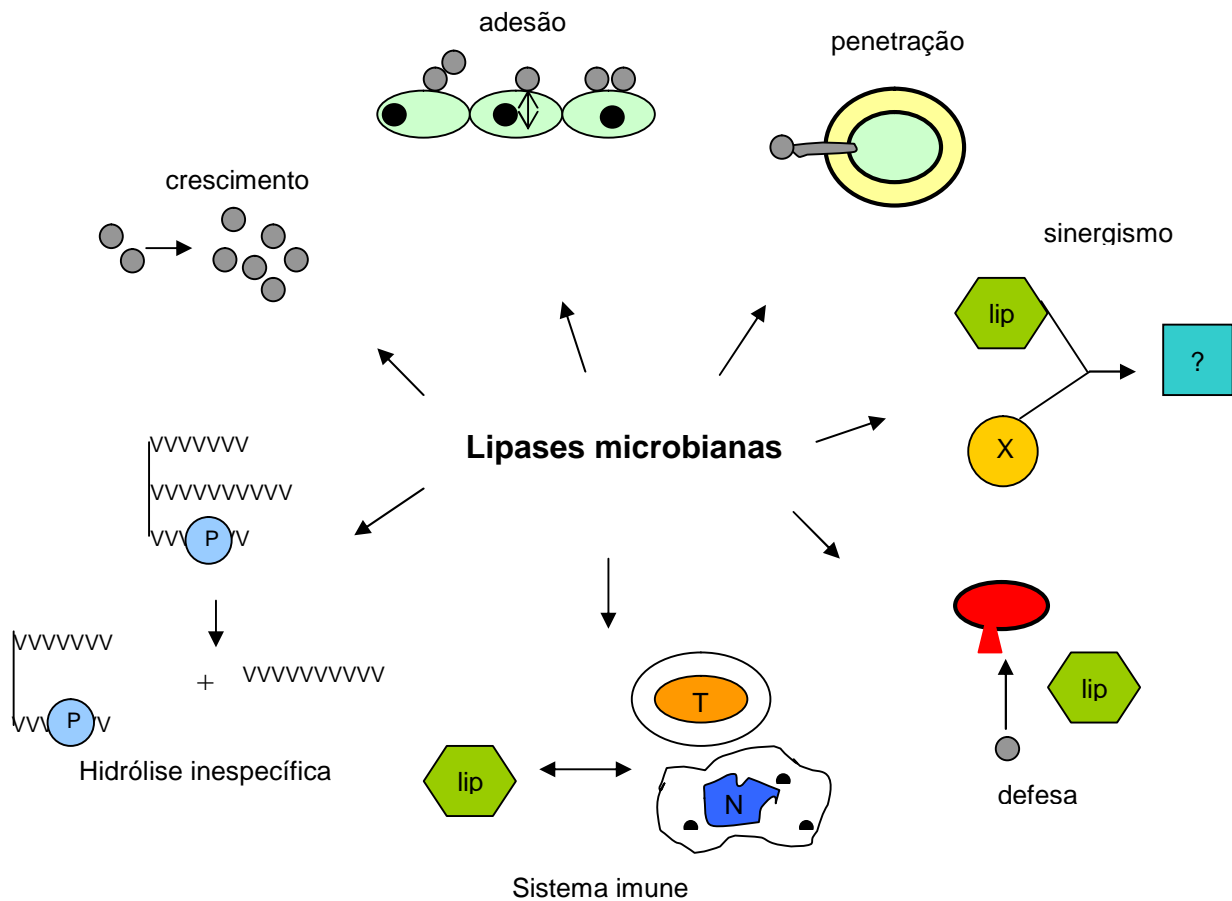
Os fungos são outro importante grupo de microrganismos patogênicos. Leveduras do gênero *Malassezia*, apesar de constituírem a microbiota normal da pele de humanos, podem causar dermatites, infecções brandas de pele e até mesmo infecções sistêmicas. Seis de sete espécies do gênero *Malassezia* requerem lipídeos exógenos para seu crescimento (PAPAVASSILIS et al. 1999). A adição de um indutor de lipase aumentou o crescimento celular e induziu a transição desta levedura para seu estágio filamentosos, associado com a doença (STEHR et al. 2003). Para a levedura negra *Hortea werneckii*, causadora de uma importante infecção de pele, a atividade lipolítica descrita por GÖTTLICH et al. (1995) aumentou a quantidade de interações hidrofóbicas

por liberação de ácidos graxos livres, o que pode facilitar a adesão à superfície do hospedeiro e a conseqüente colonização do mesmo. Por meio de técnicas moleculares foi comprovada a expressão durante a infecção experimental de ratos de quatro genes correspondentes a lipases de *Candida albicans* (GILFILLAN et al. 1998), uma levedura comensal que pode se tornar invasiva e patogênica e é bastante comum em amostras clínicas. Esta foi a primeira evidência de que lipases secretadas por um fungo patogênico de humanos estão envolvidas no processo de infecção (STEHR et al. 2003). STEHR et al. (2004) mostraram ainda que vários genes de lipases são expressos em níveis diferentes e em diferentes estágios de infecção em modelos experimentais e em amostras de pacientes infectados por *C. albicans*. Recentemente foi comprovado que a lipase 8 de *C. albicans* é um importante fator de virulência pois mutantes deficientes no gene desta proteína foram menos virulentos em modelos murínicos de infecção intravenosa (GACSER et al. 2007a).

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

inicial no sítio de infecção na folha do hospedeiro (COMMENIL et al. 1998). Além disso, a inibição da atividade de lipase preveniu a infecção por *B. cinerea* de tecidos de folhas de tomateiros (COMMENIL et al. 1998). O patógeno *Fusarium graminearum* também secreta uma lipase comprovadamente reconhecida como fator de virulência para infecção de cereais (VOIGT et al. 2005).

A caracterização de lipases nos mais diversos sistemas de infecção vem atribuindo diferentes papéis desempenhados por estas enzimas. Como descrito anteriormente, destacam-se algumas funções como influência na resposta imune, adesão, sinergismo entre outros (Figura 7). Apesar destas fortes evidências, estudos sobre lipases de fungos patogênicos vêm sendo negligenciados (STEHR et al. 2003). Em relação às lipases de fungos patogênicos de artrópodes ou microrganismos patogênicos destes organismos em geral, os estudos são muito escassos e publicações referentes às lipases durante o processo de infecção nestes sistemas específicos ainda não existem.



**Figura 7 - Possíveis funções de lipases microbianas extracelulares durante o processo de infecção.** Crescimento: lipólise pode disponibilizar nutrientes; adesão: liberação de ácidos graxos livres aumenta a quantidade de interações hidrofóbicas, facilitando a adesão célula-célula e interação célula-superfície hospedeira; penetração: degrada camadas lipídicas, facilitando a penetração; sinergismo: lipases atuam com outras enzimas; defesa: degradação por lise de componentes celulares de outros microrganismos e células que interfiram na infecção do hospedeiro; sistema imune: lipases e seus produtos podem ter efeito em células imunes iniciando processos inflamatórios; hidrólise inespecífica: lipases podem exercer outras atividades como fosfolipolítica (SILVA, 2005).



### 1.10. Lipases e *M. anisopliae*

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

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

A fim de se identificar proteínas participantes do processo de infecção de *M. anisopliae* outras abordagens vêm sendo realizadas, principalmente com o uso de ferramentas moleculares que permitem uma visão global do padrão de

expressão deste fungo frente a componentes estruturais dos seus hospedeiros (FREIMOSER et al. 2003; DUTRA et al. 2004). No banco de ESTs (*expressed sequence tags*) estabelecido por FREIMOSER et al. (2003), foram identificadas seqüências parciais prováveis codificadoras de enzimas lipolíticas, sendo uma esterase e três lipases. Neste trabalho, FREIMOSER et al. (2003) cultivaram duas variedades de *M. anisopliae* em meios de cultura líquido acrescido com cutícula de insetos para indução de enzimas relacionadas com a infecção. Duas destas seqüências possivelmente correspondentes a enzimas lipolíticas foram identificadas para a variedade *anisopliae*, com um amplo espectro de hospedeiros, e outras duas para a variedade *acridum*, específica para gafanhotos.

A fim de contribuir na elucidação da possível participação de lipases durante o processo de infecção de hospedeiros artrópodes por *M. anisopliae*, objetivamos, neste trabalho, estudar a regulação da secreção de enzimas lipolíticas, bem como avaliar a importância da atividade lipolítica durante a infecção do carrapato bovino *R. microplus* e a purificação e caracterização de uma lipase de superfície de esporo com posterior elucidação de seu papel na infecção de hospedeiros artrópodes. Para isso, avaliamos o potencial de *M. anisopliae* no controle da aranha marrom, *Loxosceles* sp., como modelo alternativo para estudos de infecção. Além disso, purificamos e caracterizamos as propriedades bioquímicas e cinéticas de uma lipase de superfície de esporo e produzimos anticorpos contra esta enzima. Avaliamos o efeito destes anticorpos durante a infecção do carrapato bovino *R. microplus* e da aranha marrom e o efeito de um inibidor específico de atividade de lipase na infecção do carrapato bovino. Também utilizamos diferentes meios de cultura com

constituintes do tegumento de hospedeiros artrópodes e outros compostos de mesma natureza para comparação da secreção de atividade lipolítica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar o complexo lipolítico de *M. anisopliae* e sua relação com o processo de infecção de hospedeiros artrópodes.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito de *M. anisopliae* no controle da aranha marrom, *Loxosceles* sp., como modelo de infecção de aracnídeo alternativo ao carrapato bovino.

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

Purificar e caracterizar uma lipase de superfície de esporo de *M. anisopliae*, bem como produzir anticorpos contra esta enzima.

Avaliar o efeito dos anticorpos produzidos contra a lipase de superfície de esporo de *M. anisopliae* durante o processo de infecção do carrapato bovino *R. microplus* e da aranha marrom *Loxosceles* sp.

Avaliar o efeito da inibição da atividade lipolítica durante o processo de infecção do carrapato bovino *R. microplus*.

### 3. CAPÍTULOS

Os resultados desta tese estão organizados em cinco capítulos apresentados na forma de manuscritos científicos.

#### 3.1. Capítulo 1

Potential biocontrol of brown spider, *Loxosceles* sp., by the arthropod pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*

Manuscrito submetido ao periódico Medical and Veterinary Entomology

Neste capítulo apresentamos o efeito de *M. anisopliae* sobre indivíduos jovens e adultos da aranha marrom *Loxosceles* sp., uma praga urbana causadora do loxoscelismo. Os acidentes ocasionados por esta aranha têm um grande impacto na saúde pública mundial, inclusive no Brasil, com milhares de casos por ano. A comprovação do potencial de *M. anisopliae* como agente biocontrolador desta aranha pode ser de suma importância na busca de futuras estratégias de controle populacional e, conseqüentemente, na redução do loxoscelismo.

**Potential biocontrol of brown spider, *Loxosceles* sp., by the arthropod pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae***

Walter Orlando Beys da Silva<sup>a</sup>, Lucélia Santi<sup>a</sup>, Augusto Schrank<sup>a,b</sup>, Marilene Henning Vainstein<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, UFRGS

\*Corresponding author: Marilene Vainstein at *Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil*

Phone +55 (051) 3308-6060

E-mail: mhv@cbiot.ufrgs.br

Fax +55 (051) 3308-7309

## Abstract

*Loxosceles* spp. (Aranae: Sicariidae), brown spiders, are an important plague with great impact on public health. These spiders have a worldwide distribution, and accidents (loxoscelism) have been described in all continents. The population control for this organism is unspecific and alternative and most effective strategies for control of brown spider population are necessary. This work attests the efficiency of an alternative to control the brown spider (*Loxosceles* sp.) using the arthropod pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. A mortality rate of 100% for juvenile *Loxosceles* sp. was observed 12 days after application of  $10^9$  conidia.mL<sup>-1</sup> with LT<sub>50</sub> value of 8.35 days. For adult *Loxosceles* sp. a 100% mortality rate was observed 9 days using the same conidial concentration, and LT<sub>50</sub> of 6.57 days. LC<sub>50</sub> values on day 25 post-treatment were  $2.39 \times 10^7$  and  $6.83 \times 10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup> for juvenile and adult spiders, respectively. Public health strategies aiming at spider population control and based on the use of *M. anisopliae* could offer an interesting alternative to reduce loxoscelism occurrence.

Keywords: biological control, brown spider, *Loxosceles* sp., *Metarhizium anisopliae*.

## Introduction

Brown spiders (*Loxosceles* genus) bites cause several and damaging clinical conditions, classically associated with dermonecrotic lesions and systemic manifestations including intravascular haemolysis, disseminated intravascular coagulation and acute renal failure (Silva *et al.*, 2004). Systemic reactions may be severe in some patients and occasionally fatal. These spiders have a worldwide distribution and accidents have been described in America, Europe, Asia, Africa and Oceania. Some urban regions around the world, such as the metropolitan area of Curitiba city, Brazil, present thousands of loxoscelism (accidents caused by spiders from *Loxosceles* genus) cases per year (Málaque *et al.*, 2002). Particularly in these regions, loxoscelism is an important and severe public health problem, with great economic impact. Population control strategies for these and other spiders are unspecific, and are mostly based on the use of insecticides. In this scenario, re-infestation is a continuous problem and the toxic side effects of the indiscriminate use of insecticides for humans have to be considered (Forks, 2000). Thus, alternative and more effective strategies to control brown spider populations and the consequent loxoscelism occurrences have recently gained considerable importance.

The fungus *Metarhizium anisopliae* is a well-studied and broad host-range arthropod pathogen, including agricultural pests and plagues of medical relevance (Luz *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 2004; Scholte *et al.*, 2005; Lazzarini *et al.*, 2006; Walker & Lynch, 2007). In Brazil, it is used to control insect pests in sugar cane plantations and offers a great application potential against other arthropods, including arachnids as the bovine tick *Boophilus microplus* (Frazzon *et al.*, 2000; Arruda *et al.*, 2005). The host infection mechanism of the fungus *M. anisopliae* has been widely studied and it is now



relatively well understood (St Leger *et al.*, 1986b; Arruda *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005).

In this work, we present the effect of *M. anisopliae* on the control of the brown spider, *Loxosceles* sp., an important public health plague with worldwide distribution.

## **Materials and methods**

### *M. anisopliae*

*M. anisopliae* var. *anisopliae* isolate E6 was originally isolated from insects (Rosato *et al.*, 1981) and kept as previously described (Bogo *et al.*, 1998). Fungus cultivation for conidia production was performed using 100 g of rice added to 30 mL 0.5% peptone solution. The culture media was autoclaved in polypropylene bags for 30 minutes. In each bag,  $10^6$  spores were inoculated and the fungus was grown at 28 °C for 14 days. For conidial suspension production, 100 mL of sterile distilled water were added to a polypropylene bag containing grown and sporulated fungus. The material was manually shaken, and the resulting suspension was collected. Prior to use, the concentration of conidia was determined by direct count using a Neubauer hemocytometer. Suspensions were diluted in sterile distilled water to a final concentration of  $1 \times 10^9$  conidia.mL<sup>-1</sup>, or other concentrations used in this work.

For re-isolation of *M. anisopliae*, experimentally infected spiders were maintained in a plate with 90% humidity at 28 °C for fungus growth and sporulation. After spider death and fungus sporulation, spores collected on the spider cadaver were placed onto MCc agar plates to germinate.

*Loxosceles* sp.

All *Loxosceles* sp. spiders were collected from a highly infested house in Viamão city, Rio Grande do Sul State, Brazil. The spiders were fed and maintained at 20 °C, individually in 50 mL plastic tubes (Labconco, USA) without lid and covered with screen tissues and had free access to sterile water.

*Spider bioassays, determination of lethal time (LT<sub>50</sub>), lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of M. anisopliae and statistical analysis*

The bioassays were performed using recently fed spiders. For each experiment, we used ten *Loxosceles* sp. adult or juvenile individuals. *M. anisopliae* conidia were applied through sprinkling until the body of spider had been totally covered by conidial suspension. After fungus inoculation, the spiders were individually placed in 50 mL plastic tubes (Labconco, USA) without lid and covered with screen tissues. Spiders had free access to sterile water. All spiders were maintained in a humid chamber (>90% relative humidity), at 28 °C. Controls consisted of *Loxosceles* sp. spiders treated with sterile distilled water instead conidial suspension and submitted to the same conditions described above. Horizontal infection was tested placing spider cadavers with sporulated fungus in the same environment of non-inoculated spiders, under the same conditions described above. Experiments were carried out in three replicates and the spiders were observed daily to determine LT<sub>50</sub> mortality and residual survival. *M. anisopliae* lethality was tested in three conidial concentrations (10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> and 10<sup>9</sup> conidia.mL<sup>-1</sup>), as described, to determine LC<sub>50</sub>. Analysis of probit was conducted to obtain the LC<sub>50</sub> and the LT<sub>50</sub> values using SPSS 13.0 for Windows.

## Results

A mortality rate of 100% for juvenile *Loxosceles* sp. was observed 12 days after application of  $10^9$  conidia.mL<sup>-1</sup> (Fig. 1A). Concentrations of  $10^8$  and  $10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup> caused 33.3 and 13.3% of mortality, respectively, during the same period. LT<sub>50</sub> values were observed to be 8.35, 16.46 and 22.77 days for  $10^9$ ,  $10^8$  and  $10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 1). For adult *Loxosceles* sp. a 100% mortality rate was observed 9, 15 and 21 days after conidia application of  $10^9$ ,  $10^8$  and  $10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup>, respectively (Fig. 1B). LT<sub>50</sub> was observed at 6.57, 10.12 and 16.69 days for  $10^9$ ,  $10^8$  and  $10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 1). In all experiments, the survival rate in the brown spiders control group was 100%. LC<sub>50</sub> values on day 25 post-treatment were  $2.39 \times 10^7$  and  $6.83 \times 10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup> for juvenile and adult spiders, respectively.

In the re-isolation experiment, *M. anisopliae* was successfully re-isolated from spider cadavers. Horizontal infection did not occur and no damaging effect were observed for spiders target when were placed in the same environment of brown spiders cadavers with sporulated fungus. During fungal infection, a degree of preference was observed in spider articulations, as legs inter-segmental regions, where *M. anisopliae* was an intense development.

## Discussion

*M. anisopliae* is widely used and studied for the biological control of agriculture pests and arthropods of medical relevance, as mosquitoes vectors of malaria and dengue (Scholte *et al.*, 2005; Scholte *et al.*, 2007; Walker & Lynch, 2007). To our knowledge, this is the first study that evaluated the effect of a microorganism to control a venomous

arthropod of medical relevance. We have shown here that the fungus *M. anisopliae* can be used to control juvenile and adult *Loxosceles* sp. spiders.

Concentrations above  $10^7$  and a concentration of  $10^9$  conidia.mL<sup>-1</sup> of *M. anisopliae* caused mortality of adult and juvenile spiders at different times. These results have also been obtained for others arthropods, as the blowfly *Lucilia sericata* (Wright *et al.*, 2004) and the housefly *Musca domestica* (Darwish & Zayed, 2002). A gradual conidia dose-dependent response was seen after achieving a certain threshold, also observed by Zhioua *et al.* (1997) and Frazzon *et al.* (2000) for the tick *B. microplus* infected with *M. anisopliae*. In the present study, the adults were more susceptible to fungal infection in comparison to juvenile spiders, as evidenced by the LT<sub>50</sub> values obtained.

Entomopathogenic fungi developed distinct strategies for their attachment to hosts, varying considerably in their ways of action, virulence and degree of host specificity (Clarkson & Charnley, 1996). *M. anisopliae* infects arthropods hosts by direct penetration of intact cuticle. However, some degree of preference was observed in spider articulations, also reported for *Frankliniella occidentalis*, *Nezara viridula* and *B. microplus* (Goettel *et al.*, 1989; Vestergaard *et al.*, 1999; Arruda *et al.*, 2005). McCauley *et al.* (1968) reported that infection sites varied among host species, and that most infections occurred in the membranous inter-segmental regions.

Horizontal infection did not occur, possibly because all spider cadavers with sporulated fungus were quickly mummified with spider web that isolates conidia and protects the target spider.

This work attests the efficiency of an alternative to control the brown spider *Loxosceles* sp. using the arthropod pathogenic fungus *M. anisopliae*. This fungus seems to be a promising alternative to unspecific chemical insecticides in use due to its

verified efficiency in *Loxosceles* sp. infection and control. The development of specific spider traps containing *M. anisopliae* conidia for domestic use and the treatment of highly infested sites by *Loxosceles* sp. with conidial suspension in urban areas could be an alternative for spider population control and consequently reduce loxoscelism.

### **Acknowledgments**

The work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are very grateful to Msc. Kátia Moura for the collection of the brown spiders for this work.

### **References**

- Arruda, W., Lubeck, I., Schrank, A. & Vainstein, M.H. (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration in *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 37, 231-244.
- Bogo, M.R., Rota, C.A., Pinto Jr, H., Ocampos, M., Correa, C.T., Vainstein, M.H. & Schrank, A. (1998) A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology*, 37, 221-225.
- Clarkson, J.M. & Charnley, A.K. (1996) New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4, 197-204.
- Darwish, E. & Zayes, A. (2002) Pathogenicity of two entomopathogenic hyphomycetes, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, to the housefly *Musca domestica* L. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 32, 785-796.

- Forks, T.P. (2000) Brown recluse spider bites. *Journal of the American Board of Family Practice*, 13, 415–423.
- Frazzon, A.P.G., Vaz junior, I., Masuda, A., Schrank, A. & Vainstein, M.H. (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94, 117-125.
- Goettel, M.S., St Leger, R.J., Rizzo, N.W., Staples, R.C. & Roberts, W. (1989) Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Journal of Genetic Microbiology*, 135, 2233-2239.
- Lazzarini, G.M., Rocha, L.F. & Luz, C. (2006) Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycological Research*, 110, 485-492.
- Luz, C., Tigano, M.S., Silva, I.G., Cordeiro, C.M. & Aljanabi, S.M. (1998) Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 839-846.
- Málaque, C.M.S., Castro-Valencia, J.E., Cardoso, J.L.C., Franca, F.O.S., Barbaro, K.C. & Fan, H.W. (2002) Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44, 139-143.
- McCauley, V.J.E., Zacharuck, R.Y. & Tinline, R.D. (1968) Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 12, 444-459.
- Rosato, Y.B., Messias, C.L. & Azevedo, J.L. (1981) Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38, 1-3.

- Scholte, E., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., Killeen, G.F. & Knols, B.G.J. (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308, 1641-1652.
- Scholte E.J. , Takken W. & Knols B.G. (2007) Infection of adult *Aedes aegypt* and *A. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* *Acta Tropical*, 102, 151-158.
- Silva, W.O.B., Mitidieri, S., Schrank, A. & Vainstein, M.H. (2005) Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 40, 321-326.
- Silva, P.H., Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W. & Veiga, S.S. (2004) Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, 44, 693-709.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M. & Charnley, A.K. (1986b) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of Genetic Microbiology*, 132, 1509-1517.
- Vestergaard, S., Butt, T.M., Bresciani, J., Gillespie, T.A. & Eilenberg, J. (1999) Light and electron microscopy studies of the infection of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 25-33.
- Walker, K. & Lynch, M. (2007) Contributions of *Anopheles* larval control to malaria suppression in tropical Africa: review of achievements and potential. *Medical and Veterinary Entomology*, 21, 2-21.
- Wright, C., Brooks, A. & Wall, R. (2004) Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Pest Management Science*, 60, 639-644.

Zhioua, E., Browning, M., Johnson, P.W., Ginsberg, H.S. & LeBrum, R.A. (1997)

Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*

(deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*,

83 ,815-818.



Fig. 1- Effect of *M. anisopliae* conidial concentration in control of *Loxosceles* sp.

juvenile (A) and adult (B). Concentrations of *M. anisopliae*: (■)  $10^9$  conidia.mL<sup>-1</sup>; (Δ)  $10^8$  conidia.mL<sup>-1</sup>; (○)  $10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup>. Bars represent standard error.

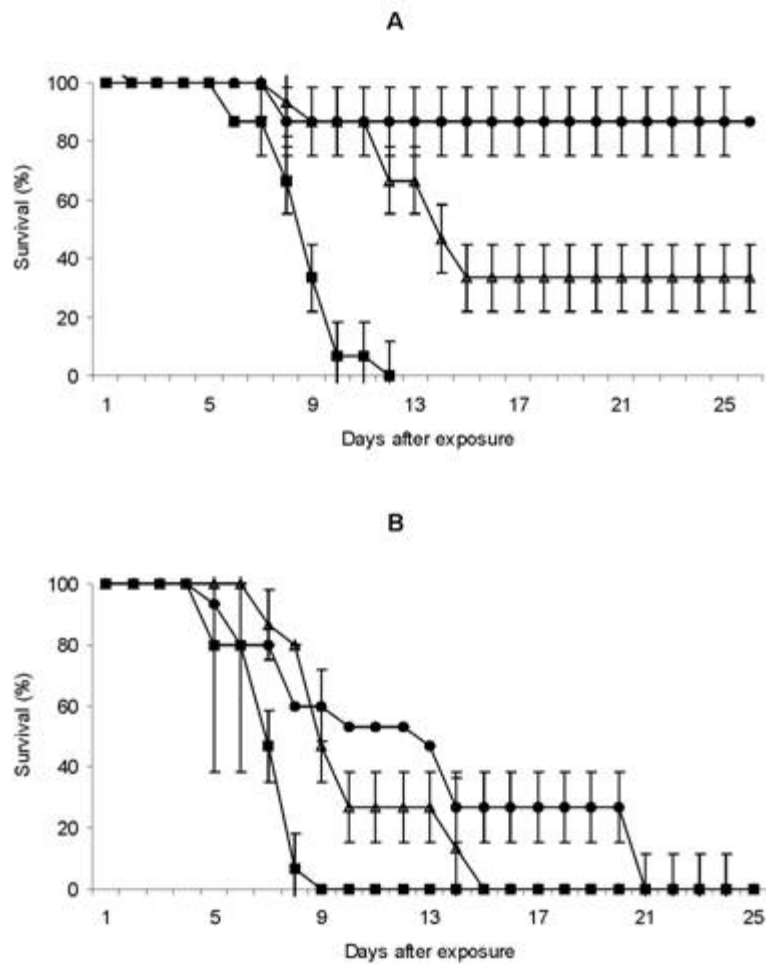


Table 1- LT<sub>50</sub> values in days following immersion of *Loxosceles* sp. juvenile and adult in aqueous suspension of *M. anisopliae* conidia (95% confidence).

Suspension (conidia.mL <sup>-1</sup> )	LT <sub>50</sub> (days)	
	Juveniles	Adults
10 <sup>7</sup>	22.77	16.69
10 <sup>8</sup>	16.46	10.12
10 <sup>9</sup>	8.35	6.57

### 3.2. Capítulo 2

Substrate regulates *Metarhizium anisopliae* lipolytic enzymes secretion: a putative relation to the infection system

Manuscrito submetido ao periódico Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology

Neste capítulo apresentamos e caracterizamos o perfil de atividade lipolítica secretada por *M. anisopliae* frente a diferentes fontes de carbono. Evidenciamos aqui que constituintes da cutícula de artrópodes têm um efeito positivo na secreção de enzimas lipolíticas, bem como no desenvolvimento do fungo. Os resultados deste trabalho permitem um melhor entendimento do mecanismo regulatório do complexo lipolítico de *M. anisopliae* e sua relação com o processo de infecção do hospedeiro.

**Substrate regulates *Metarhizium anisopliae* lipolytic enzymes secretion: a putative relation to the infection system**

Walter O. B. Silva <sup>a</sup>, Lucélia Santi <sup>a</sup>, Ana Paula F. Corrêa <sup>a</sup>, Lucas A. D. Silva <sup>a</sup>,  
Augusto Schrank <sup>a,b</sup>, Marilene H. Vainstein <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biotecnologia, <sup>b</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, CEP 91501-970, Porto  
Alegre, RS, Brazil

\*Corresponding author. Phone +55 (051) 3308-6060; Fax +55 (051) 3308-7309.

*E-mail address:* [mhv@cbiot.ufrgs.br](mailto:mhv@cbiot.ufrgs.br) (M.H.Vainstein)

## Abstract

The entomopathogenic filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is a well-characterized, broad host-range arthropod pathogen applied in biological control of several arthropod plagues. Studies on the participation of proteases and chitinases during host infection have been reported but little is known about lipolytic enzymes in this fungus. Lipolytic enzymes of several pathogenic microorganisms play different roles in the infection and have their synthesis regulated during this process. In this work we present the effects of different carbon sources, such as components of the arthropod cuticles, on the secretion of lipolytic enzymes by *M. anisopliae*. Differences in the induction of lipolytic activity were observed among several carbon sources tested. Higher activities of lipase or lipase/esterase were found in the culture media containing arthropod tegument constituents, chitin and cholesteryl stearate. In zymograms, several bands of lipolytic activity were observed in all culture media tested. The results presented here reinforce the possibility of the lipolytic enzymes acting actively in this infection system.

*Keywords:* Biological control; Esterase; Lipase; Lipolytic enzymes; *M. anisopliae*

## 1. Introduction

The filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is one of the most important and best-studied biological agents for control of many arthropod plagues (Frazzon et al., 2000; Gillepsie et al., 1998; Scholte et al., 2007). The host infection process begins with conidial adhesion to host surface and integument penetration (Askary et al., 1999). Conidia attachment to cuticle is thought to involve non-specific adhesion mechanisms mediated by the hydrophobicity of the conidial cell wall (Boucias et al., 1988; 1991). The attachment is followed by germination and formation of penetration structures. To penetrate the host cuticle *M. anisopliae* utilizes a synergistic strategy of secretion of hydrolytic enzymes, such as proteases, chitinases and possibly lipases, and mechanical mechanisms to transpose the first and main host barrier to infection. The participation of proteases and chitinases in the infection process has been shown (Dutra et al., 2004; Gillepsie et al., 1998; Silva et al., 2005). Microbial lipases are also secreted by pathogenic microorganisms and may have a role as virulence factors (Stehr et al., 2003) and have been described to act during host infection by bacteria and fungi (Gácsér et al., 2007; Gribbon et al., 1997; Smoot, 1997; Stehr et al., 2003). A range of extracellular enzymes able to degrade host cuticle is produced by *M. anisopliae* in liquid cultures added of extracts from host cuticle (Krieger De Moraes et al., 2003). Among such enzymes, the lipases are poorly characterized. In a previous work, we characterized lipolytic activity in *M. anisopliae* culture filtrates and optimized culture conditions to the production of lipases (Silva et al., 2005). Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are versatile serine hydrolases which catalyze several reactions. There is a great interest in the versatility of these enzymes due to their applications in different industrial segments (Jaeger and Eggert, 2002; Reis et al., 2009).

Here, we present the effects of different carbon sources, such as components of the arthropod cuticle, in the secretion profile of lipolytic enzymes from *M. anisopliae* cultures.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism and culture conditions

*M. anisopliae* var. *anisopliae* E6, originally isolated from insects (Rosato et al., 1981) was kept and conidia were produced as described earlier (Pinto et al., 1997). The experiments were performed in triplicate in 125 mL Erlenmeyer flasks with 20 mL of sterile growth medium containing 0.6% (w/v) NaNO<sub>3</sub>, 0.2% (w/v) glucose, 0.2% (w/v) peptone and 0.05% (w/v) yeast extract supplemented with different combinations of carbon sources. Supplementary carbon sources were glucose, olive oil, chitin, which can also be used as a nitrogen source (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) and an animal lipid cholesteryl stearate (Acros organics – New Jersey, USA). The medium was inoculated with 10<sup>6</sup> conidia.mL<sup>-1</sup> and the flasks were incubated for different times in an orbital shaker operating at 150 rpm at 28 °C. After growth, 0.25% (v/v) SDS was added and mixed for enzyme extraction as described (Silva et al., 2005). For biomass determination the mycelium was separated from the culture supernatants the by filtration through Whatman no. 1 filter paper and dried at 80 °C until constant weight was achieved.

## 2.2. *Quantification of lipolytic and proteolytic activity and protein*

Lipolytic activity of culture supernatants was assayed using *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP), *p*-nitrophenyl myristate (*p*NPM) and *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB) (all from Sigma Chem. Co., St. Louis, USA). Samples (10 µL) were mixed with 90 µL of substrate solution at pH 8.0 (Silva et al., 2005). After 30 to 60 minutes of incubation at 37 °C, the absorbance was measured spectrophotometrically at 410 nm using a plate spectrophotometer Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA), and an enzyme-free control. One lipase unit (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 µmol *p*-nitrophenol per hour, in the assay condition described above. Protease activity was determined using azocasein (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) and one unit of protease activity was defined as the amount of enzyme that increases the absorbance in 0.1 unit, in 1 h in the conditions described above (Sangali and Brandelli, 2000). Protein measurements were carried out by the method of bicinchoninic acid (BCA protein assay - Pierce), using bovine serum albumin as standard (Smith et al., 1985).

## 2.3. *Zymograms*

Culture supernatants were concentrated by liophilization and used as sample for zymograms. The detection of lipase activity in 10% polyacrilamide native gels was performed using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl (MUF)-butyrate (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA). After electrophoresis, the gels were immersed in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 solution containing 2% Triton X-100 and 10  $\mu$ M of MUF-butyrate, at 37  $^{\circ}$ C, under slow agitation for 10 min. Upon UV illumination (UV-B lamp Sankyo Denki G15T8E, Japan), bands of lipase activity were revealed by fluorescence and photographed (Diaz et al., 1999).

### 3. Results

Lipolytic activity was detected in all cultures analyzed when  $\rho$ NP-palmitate was used as substrate as well as for the substrates  $\rho$ NP-butyrate or  $\rho$ NP-myristate. We found a higher lipase activity in filtrates from cultures added of cholesteryl stearate 1% plus chitin 0.8% after 48 h of growth, followed by cholesteryl stearate plus chitin 0.8% plus glucose 1% as substrate, with decreasing lipase activity along the progress of the fungus growth (Fig. 1A). These results were similar to those found when  $\rho$ NP-myristate was used as substrate, but in higher levels (Fig. 1B). In general, we observed a higher specific activity when  $\rho$ NP-palmitate was used as substrate in the culture medium containing cholesteryl stearate, where a higher specific activity was detected in 48 h cultures in a medium containing constituents of arthropods tegument, cholesteryl stearate 1% plus chitin 0.8% ( $980 \pm 6$  U/mg protein) as well as when  $\rho$ NP-myristate substrate was used ( $270 \pm 10$  U/mg protein) (Table 1). When  $\rho$ NP-butyrate was used as substrate a different profile and much higher levels of lipolytic activity were observed in comparison to the other two substrates (Fig. 1). For this substrate, the highest activity found was in the medium containing cholesteryl stearate 1% plus chitin 0.8% plus glucose 1% in 96 h of growth (Fig. 1C). The specific activities in 72 and 96 h (when the higher levels of activity were reached), have also shown much higher values in culture media containing the constituents of arthropods tegument (Table 1).

Cholesteryl stearate induced higher levels of lipase activity, mainly when it was combined with chitin (Fig. 1). The specific activity was also higher in the medium containing this lipid in all the times and substrates tested. Moreover, the liquid culture media added of cholesteryl stearate and chitin, with or without glucose, provided a



better growth substrate for the fungus as detected by dry weight (data not shown). Besides, proteolytic activities were also significantly higher in culture media containing the constituents of arthropods cuticle in almost all incubations times analyzed (Table 1).

The zymograms for lipolytic activity from *M. anisopliae* culture filtrates revealed a complex pattern of lipolytic enzymes. This pattern became more complex with the progress of the culture incubation time for all the culture media analyzed except the medium supplemented only with glucose 1% (Fig. 1D).

#### 4. Discussion

Recent studies have shown the relevance of the lipases in infection systems of several microbial pathogens (Stehr et al., 2003). Lipolytic enzymes of several pathogenic microorganisms play different roles in the infection and have their synthesis regulated during this process (Gácsér et al., 2007; Stehr et al., 2004). Different chromogenic substrates were used in order to assess the pattern of the lipolytic enzymes secreted by *M. anisopliae*. Here we found differences of lipolytic activity induction among several different substrates. When pNP-butyrate was used as substrate much higher levels of lipolytic activity were observed in comparison to the other two substrates. It could be reasoned that pNP-butyrate is not an exclusive substrate for lipases, but it is also a substrate for esterases that are also probably being secreted by the fungus. Nevertheless, for all pNP-esters substrates tested, higher activities of lipase or lipase/esterase (pNP-butyrate) were found in the culture media containing constituents of arthropod tegument which is composed mainly of proteins, chitin and lipids. These results reinforce the physiologic importance of the secretion of lipases and esterases in *M. anisopliae*, possibly involved in the infection of the host (Clarkson and Charnley, 1996; Silva et al., 2005). Unlike chitinases (Krieger de Moraes et al., 2003; Barreto et al., 2004) in which glucose plays an important regulatory role in their secretion, lipolytic enzymes did not display this behavior, since glucose does not seem to play significant influence on the induction or repression of the lipases or esterases activities here analyzed, except on the case of cholesteryl stearate associated with chitin.

The lipid cholesteryl stearate, an ester formed from cholesterol and stearic acid, is characteristic of animal cells. Besides, lipids form the outer layer and the most protective layer of the epicuticle in many arthropods (Pedrini et al., 2007), for that

reason, being the first barrier to be transposed by the pathogen. Comparatively to olive oil, the other lipidic source tested, cholesteryl stearate induced higher levels of lipase activity, mainly when it was combined with chitin that provided also a better growth substrate for the fungus. This suggests that these specific constituents, present in the host tegument, are more easily recognized by the fungus, inducing higher levels of lipase activity. It can also suggest that *M. anisopliae* utilizes these specific elements more readily, reflecting in higher mycelium mass produced. Olive oil is a vegetal lipidic source that usually induces higher levels of lipolytic activity in fungi (Shirazi et al., 1998; Maia et al., 1999; Lee et al., 2009), nevertheless higher specific activities were found in the medium containing cholesteryl stearate in all the times and substrates tested reinforcing our hypothesis of the specificity that *M. anisopliae* might have for this animal lipid.

The fact of proteolytic activities have shown also higher values in presence of elements of arthropod tegument could suggest that the enzymes involved in the infection, lipases and proteases, may really act synergistically in order to degrade the cuticle of the host as previously postulated (St Leger et al., 1993).

The complexity in zymograms with several lipolytic activity bands is in favor of the expected participation of the lipolytic activity during host infection. As postulated for the pathogenic yeast *Candida albicans*, which also have a vast repertoire of lipolytic enzymes, the significant number of these enzymes possibly reflects the flexibility of adaptation of the pathogen to environmental changes (Stehr et al., 2004). It is probably an adaptive mechanism by which new host environments with different compositions can be conquered (Stehr et al., 2003). Further studies regarding lipases of *M. anisopliae* should be carried out, mainly to reveal the true role played by these enzymes, already described as virulence factors in many pathogenic microorganisms (Stehr et al., 2003).

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are very grateful to Dr. Adriano Brandelli for reading the manuscript and for the valuable comments.

## References

- Askary, H., Benhamou, N., Brodeur, J., 1999. Ultrastructural and chytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 74, 1-13.
- Barreto, C.C., Staats, C.C., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2004. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. Curr. Microbiol. 48, 102-107.
- Boucias, D.G., Pendlant, J.C., Latge, J.P., 1988. Nonespecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1795-1805.
- Boucias, D.G., Pendlant, J.C., Latge, J.P., 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod hosts. In: Cole GT, Hoch HC (Eds.) The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press, New York, pp. 101-128.
- Clarkson, J.M., Charnley, A.K., 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends Microbiol. 4, 197-204.
- Diaz, P., Prim, N., Javier Pastor, F.I., 1999. Direct fluorescence based lipase activity assay. Biotechniques. 27, 696-700.
- Dutra, V., Nakazato, L., Broetto, L., Schrank, I.S., Vainstein, M.H., Schrank, A., 2004. Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the infection process of the tick *Boophilus microplus* cuticle. Res. Microbiol. 155, 245-251.
- Frazzon, A.P.G., Da Silva Vaz Junior, I., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol. 94, 117-125.
- Gácsér A., Schäfer W., Nosanchuk J.S., Salomon S, Nosanchuk JD, 2007. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. Fungal Genet. Biol. 44, 1336-1341.
- Gillepsie, J.P., Bateman, R., Charnley, A.K., 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust *Schistocerca gregaria*. J. Invertebr. Pathol. 71, 128-137.
- Gribbon, E.M., Cunliffe, W.J., Holland, K.T., 1997. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. J. Gen. Microbiol. 139, 1745-1751.

- Jaeger, K.E., Eggert, T., 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin Biotechnol.* 13, 390-397.
- Krieger De Moraes, C., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2003. Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.* 46, 205-210.
- Lee, J.H., Kwon, C.H., Kang, J.W., Park, C., Tae, B., Kim, S.W., 2009. Biodiesel production from various oils under supercritical fluid conditions by *Candida antartica* lipase B using a stepwise reaction method. *Appl. Biochem. Biotechnol.* DOI 10.1007/s12010-008-8488-5.
- Maia, M.M.D., Morais, M.M.C., Morais Jr, M.A., Melo, E.H.M., Lima Filho, J.L., 1999. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Rev. Microbiologia.* 30, 304-309.
- Pedrini, N., Crespo R., Juarez, M.P., 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 124–137.
- Pinto, A.S., Barreto, C.C., Schrank, A., Ulhoa, C.J., Vainstein, M.H., 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Microbiol.* 43, 322-327.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R., 2009. Lipases at interfaces: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 147, 237–250.
- Rosato, Y.B., Messias, C.L., Azevedo, J.L., 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 38, 1-3.
- Sangali, S., Brandelli, A., 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J. Appl. Microbiol.* 89, 735-743
- Shirazi, S.H., Rahman, S.R., Rahman, M.M., 1998. Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 595-597.
- Scholte E.J., Takken W., Knols B.G.J., 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta. Trop.* 102, 151-158.
- Silva, M.V., Santi, L., Staats, C.C., Costa, A.M., Colodel, E.M., Driemeier, D., Vainstein, A., Schrank, A., 2005. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res. Microbiol.* 156, 382-392.

- Silva, W.O.B., Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Proc. Biochem. 40, 321-326.
- 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., 1985. Measurement of the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 150, 76-85.
- Smoot, D.T., 1997. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct Mechanism. 113, S31-S34.
- St Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K., 1993. Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Gen. Microbiol. 139, 237-243.
- Stehr, F., Felk, A., Gácsér, A., Kretschmar, M., Mähner, B., Neuber, K., Hube, B., Schafer, W., 2004. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. FEMS Yeast Res. 4, 401-408.
- Stehr, F., Kretschmar, M., Kroger, C., Hube, B., Schafer, W., 2003. Microbial lipases as virulence factors. J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 22, 347-355.

**Table 1**Lipase and protease specific activity of culture supernatants of *M. anisopliae* grown in different carbon sources at different times.

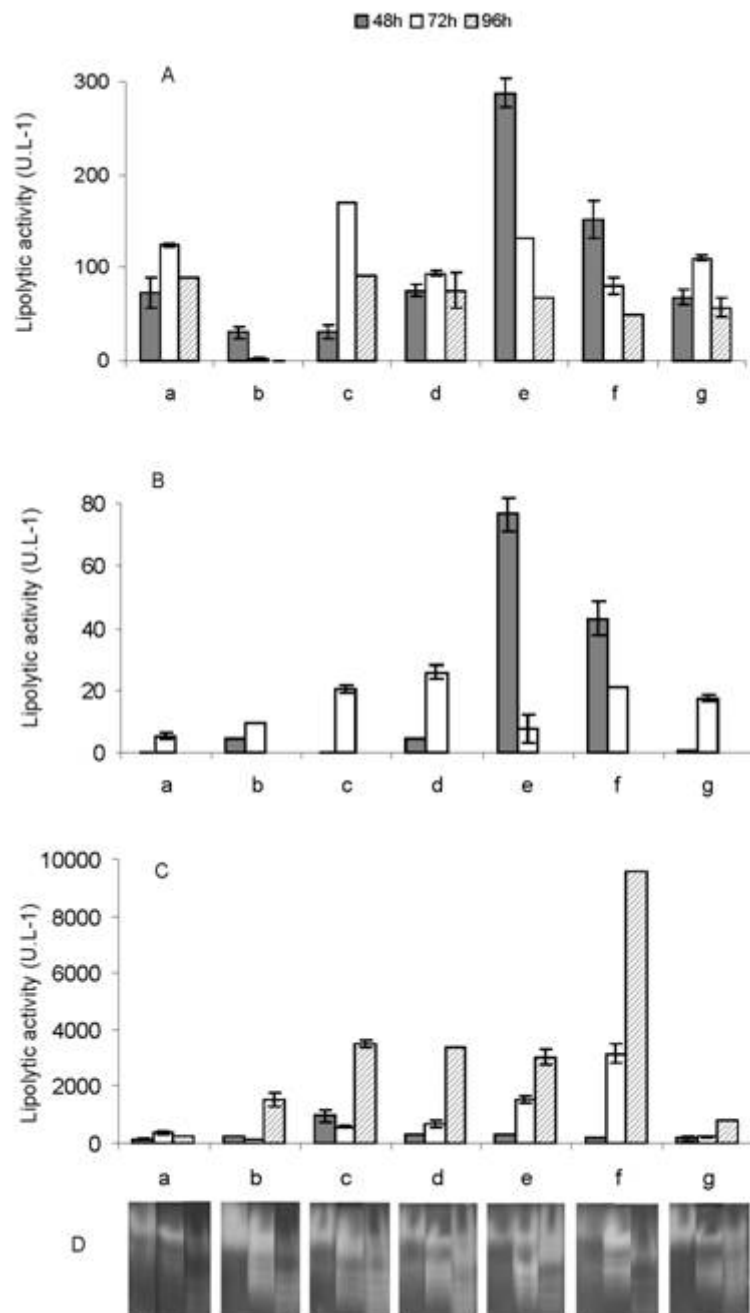
Specific activity (U/mg protein)	A	B	C	D	E	F	G
<b>48 h</b>							
ρNP-palmitate	240 ± 9 <sup>c</sup>	160 ± 6 <sup>b</sup>	70 ± 2 <sup>a</sup>	220 ± 7 <sup>c</sup>	980 ± 6 <sup>e</sup>	160 ± 1 <sup>b</sup>	870 ± 20 <sup>d</sup>
ρNP-myristate	-	10 ± 2 <sup>a</sup>	-	10 ± 1 <sup>a</sup>	270 ± 10 <sup>c</sup>	50 ± 3 <sup>b</sup>	10 ± 1 <sup>a</sup>
ρNP-butyrate	400 ± 3 <sup>b</sup>	1100 ± 4 <sup>d</sup>	1800 ± 8 <sup>e</sup>	900 ± 1.1 <sup>c</sup>	1100 ± 8 <sup>d</sup>	200 ± 15 <sup>a</sup>	2200 ± 10 <sup>f</sup>
Protease	-	-	-	-	4 ± 0.2	0.2 ± 0	-
<b>72 h</b>							
ρNP-palmitate	300 ± 7 <sup>c</sup>	10 ± 0.2 <sup>a</sup>	310 ± 2 <sup>c</sup>	290 ± 5 <sup>c</sup>	450 ± 28 <sup>d</sup>	200 ± 4 <sup>b</sup>	660 ± 4 <sup>e</sup>
ρNP-myristate	10 ± 0.2 <sup>a</sup>	40 ± 0.5 <sup>c</sup>	40 ± 1 <sup>c</sup>	80 ± 2 <sup>d</sup>	30 ± 1 <sup>b</sup>	50 ± 2 <sup>c</sup>	110 ± 2 <sup>e</sup>
ρNP-butyrate	900 ± 3 <sup>b</sup>	500 ± 5 <sup>a</sup>	1200 ± 13 <sup>c</sup>	2100 ± 5 <sup>e</sup>	6500 ± 11 <sup>f</sup>	7300 ± 15 <sup>g</sup>	1400 ± 25 <sup>d</sup>
Protease	3.5 ± 0.4	2.8 ± 0.1	2.2 ± 0.3	12.5 ± 0.8	136 ± 2.1	58 ± 2	17.9 ± 0.5
<b>96 h</b>							
ρNP-palmitate	190 ± 4 <sup>b</sup>	-	190 ± 3 <sup>b</sup>	280 ± 2 <sup>d</sup>	210 ± 6 <sup>c</sup>	70 ± 2 <sup>a</sup>	380 ± 2 <sup>e</sup>
ρNP-myristate	-	-	-	-	-	-	-
ρNP-butyrate	700 ± 3 <sup>a</sup>	6700 ± 7 <sup>d</sup>	6200 ± 3 <sup>c</sup>	14100 ± 5 <sup>f</sup>	12000 ± 16 <sup>e</sup>	20800 ± 14 <sup>g</sup>	6000 ± 28 <sup>b</sup>
Protease	17 ± 0	39.8 ± 1.1	19.6 ± 0.5	76.5 ± 0.7	84.8 ± 0	98 ± 2.4	40.5 ± 3.4

±: Standard deviation (based on three replicates).

a,b,c,d,e: Means followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's test ( $\alpha=0.05$ ) within the same line.

(A) glucose 1%, (B) glucose 0.2% + olive oil 1%, (C) glucose 1% + olive oil 1%, (D) glucose 1% + cholesteryl stearate 1%, (E) cholesteryl stearate 1% + chitin 0.8%, (F) cholesteryl stearate 1% + chitin 0.8% + glucose 1% (G) cholesteryl stearate 1%.

**Fig. 1.** Lipolytic activity with different  $\rho$ NP substrates and zymograms of culture supernatants of *M. anisopliae* grown in different carbon sources at different times. (A)  $\rho$ NP-palmitate; (B)  $\rho$ NP-myristate; (C)  $\rho$ NP-butyrate; (D) zymograms using MUF-butyrate as substrate. (a) glucose 1%, (b) glucose 0.2% + olive oil 1%, (c) glucose 1% + olive oil 1%, (d) glucose 1% + cholesteryl stearate 1%, (e) cholesteryl stearate 1% + chitin 0.8%, (f) cholesteryl stearate 1% + chitin 0.8% + glucose 1% (g) cholesteryl stearate 1%. At the bottom the gels corresponding to each graphic bar are presented. Gels were loaded with 10 $\mu$ g of protein per well.



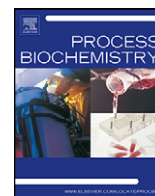
### 3.3. Capítulo 3

Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*

Manuscrito publicado no periódico Process Biochemistry

Neste capítulo apresentamos a purificação e caracterização de uma lipase de superfície de esporo de *M. anisopliae*. Esta enzima fortemente associada ao esporo apresenta características interessantes que a candidatam como potencial alvo de estudo relacionado ao mecanismo de infecção do fungo. Pela primeira vez uma enzima lipolítica de *M. anisopliae* foi isolada e caracterizada, etapa fundamental para o entendimento do papel destas enzimas no processo de infecção do hospedeiro.





## Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*

Walter O.B. Silva<sup>a</sup>, Lucélia Santi<sup>a</sup>, Markus Berger<sup>a</sup>, Antonio F.M. Pinto<sup>a,c</sup>, Jorge A. Guimarães<sup>a</sup>, Augusto Schrank<sup>a,b</sup>, Marilene H. Vainstein<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Department of Microbiology, University of Virginia, P.O. Box 800734, Charlottesville, VA 22908-0734, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 December 2008

Received in revised form 5 March 2009

Accepted 27 March 2009

#### Keywords:

*Metarhizium anisopliae*

Insect fungus

Spore surface lipase

Substrate specificity

Enzyme characteristics

### ABSTRACT

A *Metarhizium anisopliae* spore surface lipase (MASSL) strongly bound to the fungal spore surface has been purified by ion exchange chromatography on DEAE sepharose followed by ultrafiltration and hydrophobic interaction chromatography on phenyl sepharose. Electrophoretic analyses showed that the molecular weight of this lipase is ~66 kDa and pI is 5.6. Protein sequencing revealed that identified peptides in MASSL shared identity with several lipases or lipase-related sequences. The enzyme was able to hydrolyze triolein, the animal lipid cholesteryl stearate and all pNP ester substrates tested with some preference for esters with a short acyl chain. The values of  $K_m$  and  $V_{max}$  for the substrates pNP palmitate and pNP laurate were respectively 0.474 mM and 1.093 mMol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> and 0.712 mM and 5.696 mMol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>. The optimum temperature of the purified lipase was 30 °C and the enzyme was most stable within the most acid pH range (pH 3–6). Triton X-100 increased and SDS reduced enzyme lipolytic activity. MASSL activity was stimulated by Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> and inhibited by Mn<sup>2+</sup>. The inhibitory effect on activity exerted by EDTA and EGTA was limited, while the lipase inhibitor Ebelactone B completely inhibited MASSL activity as well as PMSF. Methanol 0.5% apparently did not affect MASSL activity while β-mercaptoethanol activated the enzyme.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are versatile serine hydrolases which catalyze several reactions. The versatility of these enzymes has raised great interest, due to their applications in different industrial segments, like dairy products and food manufacture, leather and detergent industries, production of cosmetics and pharmaceuticals, and organic synthesis reactions, especially in non-aqueous media [1]. Microbial lipases represent the major commercial source of this enzyme. Current research on lipases, mainly of microbial origin, has increased in volume because of their great and superior commercial potentiality.

The filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is an important agent used for the biological control of many arthropod plagues [2,3]. The host infection process begins with conidial adhesion to host surface followed by cuticle penetration [4]. In order to penetrate the host cuticle, *M. anisopliae* utilizes a synergistic

strategy of secretion of hydrolytic enzymes, such as proteases, chitinases and possibly lipases, associated with mechanical mechanisms to transverse the arthropod's cuticle. The first barrier formed mainly by lipids in the cuticle is the epicuticle, and it is a potential target for the action of specific lipases, a group of important enzymes present in infection systems of pathogenic microorganisms. Microbial lipases secreted by pathogenic microorganisms seem to play an important role as virulence factors [5]. In fact, their primary action during host infection by bacteria and fungi has been well documented [5–7].

Although the biotechnological potential of lipases produced by *M. anisopliae* has previously been reported [8], the role of these enzymes in fungi infection has not been completely established. Similarly, associated components of conidia, the infective unit of *M. anisopliae*, such as its lipases and other enzyme constituents that could be involved in the initiation of the infection process have not yet been fully characterized. Apart from this, their possible roles in the infective process as well as the mechanism of action are even less understood. In this work, we present the purification and biochemical characterization of one of these components, an *M. anisopliae* spore surface lipase (MASSL).

\* Corresponding author. Tel.: +55 051 3308 6060; fax: +55 051 3308 7309.

E-mail address: [mhv@cbiot.ufrgs.br](mailto:mhv@cbiot.ufrgs.br) (M.H. Vainstein).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism, spore production and enzyme extraction

*M. anisopliae* var. *anisopliae* E6, originally isolated from insects [9] was kept as previously described [10]. Fungus cultivation for spore production was performed using 100 g of rice added to 30 mL of a 0.5% peptone solution in polypropylene bags. In each sterilized bag,  $10^6$  spores were inoculated and the fungus was grown at 28 °C for 14 days. Sporulated fungus were mechanically desorbed from rice grains by gently shaking using a plastic spatula and then sieved to collect conidia. The spores obtained were suspended in an extraction buffer (Tris–HCl 50 mM pH 8.0 containing 0.25% Triton X-100) in a proportion of 1:2.5 (w/v). The suspension was strongly shaken for 5 min and the resulting supernatant was filtered in a 0.2- $\mu$ m filter (Millipore, USA), which was named “spore extract”, and used as source of enzyme.

### 2.2. Enzyme purification

For enzyme purification, 20 mL of spore extract were loaded into a column containing 3 mL of anion-exchange resin DEAE sepharose (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) pre-equilibrated with 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0). A linear gradient of 1 M NaCl in the same buffer was used to elute the proteins at a flow rate of 0.5 mL/min in 2-mL fractions. Fractions containing lipolytic activity were pooled and filtered with a 50-kDa Amicon Ultra device (Millipore, USA). The filtered sample was equilibrated with 1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) and loaded into a phenyl sepharose column (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) pre-equilibrated with the same buffer. A decreasing linear gradient of 1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  was used to elute the proteins in a FPLC purification system (Pharmacia, Uppsala, Sweden) at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions containing purified lipase were pooled, named MASSL (*M. anisopliae* spore surface lipase), and used in this study.

### 2.3. Lipolytic activity, substrate specificity of the purified enzyme and kinetic parameters

Lipolytic activity of all fractions obtained in the purification steps was assayed using *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA). Samples (10  $\mu$ L) were mixed with 90  $\mu$ L of substrate solution under pH 8.0 [8]. After 30 min of incubation at 37 °C, absorbance was measured at 410 nm against an enzyme-free control using a plate spectrophotometer Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). The enzymatic activity was calculated with reference to a calibration curve of standard solution of 4-nitrophenol (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA). One lipase unit (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1.0  $\mu$ mol *p*-nitrophenol/min. For enzyme substrate specificity, pNPP and other *p*-nitrophenyl (pNP) ester substrates (all from Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) were used as described above. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values for the hydrolysis of two esters by MASSL were determined using pNPP and *p*-nitrophenyl laurate (pNPL) as substrates at different concentrations. The kinetic values were calculated using GraphPad Prism 3 software. Lipolytic activity of purified lipase was tested also using natural substrates. This lipase assay by titration of fatty acids was carried out in 125-mL Erlenmeyer flasks containing 500  $\mu$ L of MASSL, 500  $\mu$ L of triolein or 0.5 g of the animal lipid cholesteryl stearate (Acros organics, New Jersey, USA) as substrate, 1 mL of polyvinyl alcohol and 1.25 mL of the 0.02 M Tris–HCl buffer (pH 8.0) incubated at 30 °C and agitated at 150 rpm for 30 min. The reaction was stopped with 5 mL of an acetone/ethanol solution (1:1) (v/v) and lipase activity was calculated by titration of fatty acids released with 0.05 M NaOH in 500  $\mu$ L of thymol blue (0.1% in methanol). Control was made using water instead of enzyme. One lipase unit (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1  $\mu$ mol of fatty acids in the assay conditions described above.

### 2.4. Protein analysis

Protein measurements were carried out according to the method of bicinchoninic acid (BCA protein assay - Pierce), using bovine serum albumin as standard [11]. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using the method developed by Laemmli [12]. For 2D-electrophoresis, protein samples were solubilized in isoelectric focusing buffer (IEF buffer) containing 7 M urea, 2 M thio-urea, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) dithiothreitol (DTT) and 0.2% (v/v) ampholytes (pH 3–10) (Bio-Rad). The 7-cm immobilized pH gradient (IPG) strips (pH 3–10, Bio-Rad) were passively rehydrated for 16 h with 150  $\mu$ g of protein. Isoelectric focusing was performed in a Protean IEF cell system

(Bio-Rad) with up to 10,000 Vh at a maximum voltage of 4000 V. Strips were equilibrated for 15 min in equilibration buffer I (30%, v/v, glycerol, 6 M urea, 1% DTT, a trace of bromophenol blue) and for 15 min in equilibration buffer II (equilibration solution I with DTT replaced by 4% iodoacetamide). In the second dimension, IPG strips were run vertically on SDS-PAGE 12% gels using PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad). Gels were subsequently stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (Bio-Rad). The stained gels were scanned with an Image Scanner (Amersham Biosciences) and analyzed with the PDQuest Basic-8.0 software (Bio-Rad), followed by additional visual analysis.

### 2.5. Enzyme characterization

All enzymatic characterization assays were performed using pNPP as substrate, as described above. The optimal temperature for enzymatic activity was determined as the interval 25–45 °C. The pH stability of the enzyme was determined by pre-incubating the purified enzyme solution before assaying at 37 °C for 30 min under different pH values (from 3.0 to 10.0, using 25 mM buffers: citric acid/sodium phosphate, pH 3.0–7.0; Tris–HCl, pH 7.0–9.0 and sodium carbonate/sodium bicarbonate, pH 10.0). The effect of metal ions was determined with chloride cobalt salts, magnesium, zinc, manganese and calcium at 5 mM. Triton X-100 (Sigma), Tween 80 (Sigma) and SDS were used to study the effects of detergents on the activity of MASSL. The effect of other chemical agents, such as methanol (Merck),  $\beta$ -mercaptoethanol, the chelating agents EDTA and EGTA (all Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) and some inhibitors upon enzyme activity was determined. The serine hydrolase inhibitor phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and the specific lipase inhibitor Ebelactone B (all Sigma Chem. Co., St. Louis, USA) were also tested.

### 2.6. Protein sequencing

In order to analyze protein fragments, proteins separated by SDS-PAGE and 2D-electrophoresis were stained with Coomassie Brilliant Blue and the protein band or protein spot of interest cut out of the gel. The proteins were digested in gel with trypsin as described previously, with minor modifications [13]. Mass spectrometric analysis of peptides was performed on a LTQ XL instrument from Thermo Electron Corporation (Waltham, MA). Data were collected in a top 10 mode, meaning one MS scan taken and followed by MS/MS fragmentation spectra of the top 10 intensity ions collected. After MS/MS fragmentation, the *m/z* of particular parent ion was placed in an exclusion list. The repeat count for the exclusion list was 1, repeat duration was 30 s and exclusion duration was 120 s. The electrospray voltage was set to 2.5 kV, capillary temperature was 230 °C and flow rate was 500 nL/min.

The mass spectra were extracted and analyzed utilizing Bioworks Sequest 3.11. A database containing 29348 lipase sequences was used. Spectra were searched using 1.5-Da parent tolerances and 1-Da fragment tolerance. All hits were required to be fully tryptic.

## 3. Results

### 3.1. Protein purification

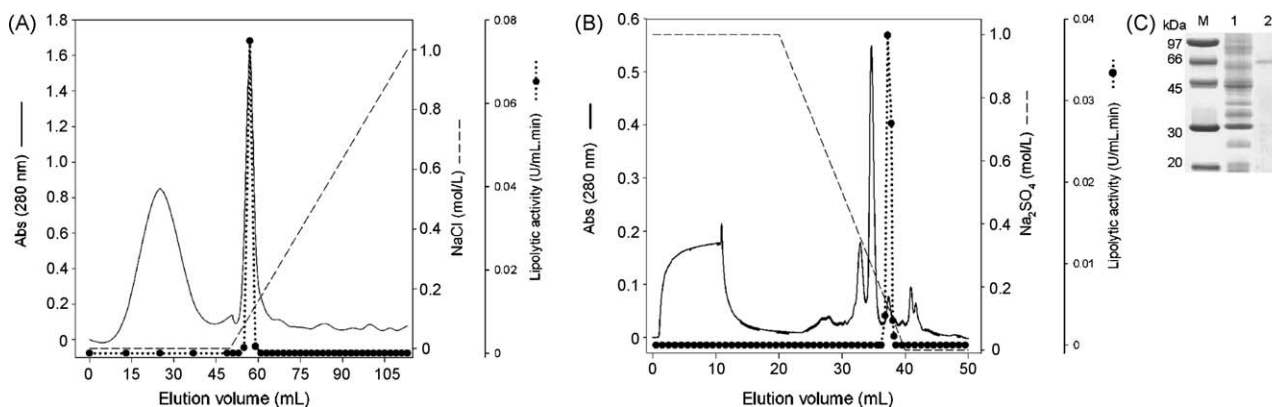
The lipolytic activity in crude spore extract was 0.01 U/mL min and the whole activity was released from the conidia with extraction buffer containing 0.25% Triton X-100. This extract was used as starting material for the purification of MASSL following the protocol summarized in Table 1. The enzyme was purified with 3 purification steps and an 86-fold purification was achieved, with overall yield of 25.23%. Analysis by SDS-PAGE (Fig. 1C) showed only one band for the purified protein with molecular weight of 66 kDa. Using 2D-electrophoresis, the enzyme pI value was estimated as 5.6 and the same technique also confirmed molecular mass of MASSL.

### 3.2. Protein sequencing and identification

According to the Sequest search engine, the peptides found in other lipase sequences were also found in MASSL. As shown in

**Table 1**  
Purification of MASSL from spore extract.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (mU)	Specific activity (mU/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Spore extract	82	210	2	1	100
DEAE sepharose	6	167	28	14	80
Ultrafiltration	1.4	155	111	55	74
Phenyl sepharose	0.31	53	172	86	25



**Fig. 1.** Chromatographic profiles and SDS-PAGE of MASSL purification. (A) Chromatography on DEAE sepharose. (B) Chromatography on phenyl sepharose. Lipolytic activity of all fractions of chromatography steps was assayed using pNP palmitate as substrate. (C) SDS-PAGE of purified MASSL stained with Coomassie blue. Lane M: molecular weight marker; lane 1: 150 µg of spore extract; lane 2: 10 µg of MASSL.

Table 2, the identified peptides were analyzed using NCBI BLAST and revealed 100% of identity with other microbial lipase sequences deposited in the NCBI protein database. Furthermore, the identified MASSL peptides also share similarity with other lipolytic enzymes or lipase-related sequences, as observed in the NCBI BLAST result.

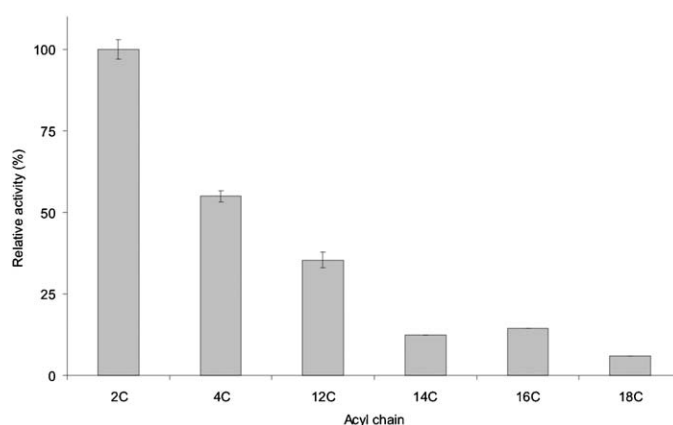
### 3.3. Substrate specificity

The catalytic specificity of MASSL for hydrolysis of different pNP ester substrates is presented in Fig. 2. MASSL was able to hydrolyze all substrates tested with marked preference for esters with a short acyl chain. The highest activity was detected with pNP acetate (0.023 U), which contains 2 carbon atoms in the fat acid chain, followed by pNP butyrate and pNP myristate. Differently from substrates with long acyl chains (14, 16 and 18 carbons) a linear decrease in activity was not detected and the highest activity was reached with pNP palmitate. Comparatively, the kinetic parameters  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $K_{cat}$  for the hydrolysis of pNP palmitate were 0.474 mM, 1.093 mMol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> and 1.2 mMol s<sup>-1</sup>, while for pNP laurate the values were 0.712 mM, 5.696 mMol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> and 6.26 mMol s<sup>-1</sup>, in that order. These data allowed the estimation of catalytic efficiencies ( $K_{cat}/K_m$ ) of 2.5 Mol s<sup>-1</sup> with pNP palmitate and 8.8 Mol s<sup>-1</sup> with pNP laurate, indicating a marked preference for the enzyme for the second substrate.

Lipase activity using natural lipids as substrates was also quantified. For the specific lipase substrate triolein the activity value reached was 25 ± 5 U. Using the animal lipid cholesterol stearate the activity reached was 33.5 ± 7 U.

### 3.4. Effect of temperature and pH stability

Lipase activity was determined from 25 to 45 °C. The optimum temperature of the purified lipase was 30 °C. The activity was maintained around 100% also at 37 °C (94% of activity) and 45 °C (85% of activity) (Fig. 3). As shown in Fig. 4, the enzyme was most



**Fig. 2.** Effect of acyl chain length on the activity of MASSL with different pNP ester substrates. pNP acetate (2C), pNP butyrate (4C), pNP laurate (12C), pNP myristate (14C), pNP palmitate (16C), and pNP stearate (18C). Results are the means of three activity determinations and are expressed relative to the maximal activity. Error bars represent standard deviation.

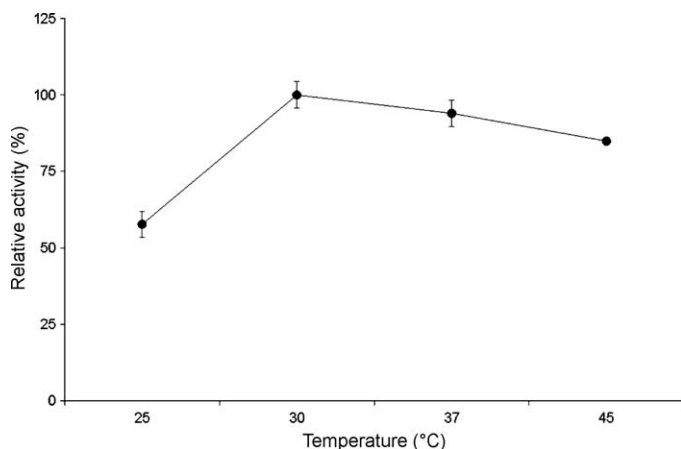
stable within the most acid pH range (pH 3–6) with an increase of around 20% in activity under pH 3. It sustained its activity in the range of 60% under pH 7.0 to 9.0, being clearly less stable under more alkaline pH with a significant decrease in MASSL activity with pH values above 9.0 (Fig. 4).

### 3.5. Effect of detergents, metals, inhibitors and selected chemicals

The effects of detergents, metals, inhibitors and other selected reagents on the lipolytic activity of purified enzyme upon pNPP are shown in Table 3. Tween 80 affected the activity only slightly, while Triton X-100 increased lipolytic activity after incubation by 27.27% and SDS reduced it by 18.19%. The effect of divalent cations on MASSL activity was determined at concentration of 5 mM for

**Table 2**  
MASSL sequencing and identification.

Peptide sequence	Identity (%)	Accession number of the correspondent protein in NCBI database	Correspondent Protein name in NCBI database
K.KSYPNVPMYILGHSMSGSAIILISVK.Y	100	YP_001497005	Monoglyceride lipase [Tanapox virus].
K.IYEKIDPMLAIDGSK.Y	100	YP_300432	Putative esterase [ <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305]
KASPFEDFVIR	100	XP_001728136	Hypothetical protein NCU11352 [ <i>Neurospora crassa</i> OR74A].

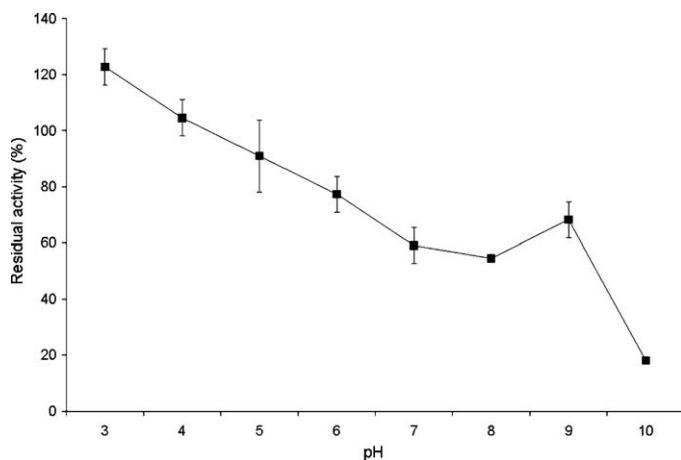


**Fig. 3.** Effect of temperature on MASSL activity. The hydrolytic activity upon  $\rho$ NPP was determined at indicated temperatures in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) and is expressed relative to the maximal activity. All measurements were repeated three times and error bars represent standard deviation.

each cation. The lipolytic activity of MASSL was significantly enhanced by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  and to a similar level of stimulatory effect by a factor of 1.68, 1.45 and 1.59, respectively. Conversely,  $\text{Mn}^{2+}$  at the same concentration produced an expressive inhibitory effect (64%) of enzyme activity. The metal chelating agents EDTA and EGTA partially inhibited lipase activity. On the other hand, PMSF and Ebelactone B at 1 mM concentration, completely blocked MASSL activity. Methanol 0.5% apparently did not affect MASSL activity, and a stimulatory effect (1.23 times higher) on the enzyme activity was also shown upon its incubation with 2 mM of  $\beta$ -mercaptoethanol.

#### 4. Discussion

The number of available lipases (triacylglycerol hydrolases; EC 3.1.1.3) has increased considerably in last decades, side by side with the demand for these biocatalysts. The characterization of new lipolytic enzymes, the development of new purification procedures and the increased number of studies on the subject—mainly in lipases of microbial origin—are all factors that contribute to the new biotechnological applications of these enzymes.



**Fig. 4.** Effect of pH on stability of MASSL. The enzyme was pre-incubated at 37 °C for 30 min in various buffers under different pH values. The buffers (all at 25 mM final concentration) used were: citric acid/sodium phosphate (pH 3.0–7.0), Tris–HCl (pH 7.0–9.0) and sodium carbonate/sodium bicarbonate (pH 10.0). Activities are expressed as residual activity relative to a control made with fresh enzyme sample using distilled water instead buffer. All measurements were repeated three times and error bars represent standard deviation.

**Table 3**

Effect of selected chemicals on MASSL activity.

Compounds	Concentration	Residual activity (%)
Control	0	100
$\text{Ca}^{2+}$	5 mM	168.15 ± 19.28
$\text{Co}^{2+}$	5 mM	145.45 ± 0
$\text{Mn}^{2+}$	5 mM	36.36 ± 0
$\text{Mg}^{2+}$	5 mM	159.09 ± 32.14
EDTA	5 mM	68.18 ± 6.42
EGTA	5 mM	77.27 ± 6.42
PMSF	1 mM	0
Ebelactone B	1 mM	0
Triton X-100	0.5%	127.27 ± 12.85
SDS	0.5%	81.81 ± 12.85
Tween 80	0.5%	95.45 ± 9.43
Methanol	0.5%	95.45 ± 19.28
$\beta$ -Mercaptoethanol	2 mM	122.72 ± 6.42

Activities are expressed as residual activity compared to a control made with fresh enzyme sample using distilled water instead of chemical compound. The enzyme was pre-incubated at 37 °C for 30 min with selected chemical compound. All measurements were repeated three times.

Lipolytic enzymes also have great physiologic and ecologic importance. These enzymes have been described as virulence factors in several microbial pathogens [5]. Spores are the infective unit of several pathogenic fungi, and the occurrence of a lipase with a crucial role in infection in spores of other fungus, *Alternaria brassicicola*, has been reported [14]. Although the great relevance of lipolytic enzymes in several microbial infection systems, this is the first report describing the purification and characterization of a lipolytic enzyme in *M. anisopliae*, a pathogenic fungus that infects arthropods and that is used as biocontrol agent.

Lipolytic activity of *M. anisopliae* has been proved to strongly interact with the fungal mycelium [8], and now also with the spore surface. As in the mycelium [8], the extraction procedure of lipases in spore was made with extraction buffer containing detergent, Triton X-100 0.25%. The enzyme was found to be very hydrophobic, interacting strongly with phenyl sepharose resin used in purification procedures. This strong hydrophobicity is characteristic of these enzymes, and purifications strategies based on hydrophobic interaction chromatography are common [15].

SDS-PAGE and 2D-electrophoresis have shown that MASSL has a molecular mass of approximately 66 kDa, similar to those of other fungal lipases like the 60-kDa lipase B of *Rhizopus delemar* [16], 67-kDa lipase from *Rhizopus arrhizus* [17] and 60-kDa lipase from *Botrytis cinerea* [18], among others. Results from protein sequencing revealed that the peptides identified shared identity with several lipases or lipase-related sequences. All the three different protein sequences that showed 100% of identity with peptides found in MASSL have a conserved domain of esterase/lipase super-family present in other lipases (including fungal lipases), as seen in the NCBI BLAST analyses.

Regarding substrate specificity, the lipase described here seems to differ from others lipolytic enzymes, like lipase from *Streptomyces rimosus* [19] and the recently described lipases Lip2 from *Yarrowia lipolytica* [20] and from grey mullet (*Mugil cephalus*) [21]. MASSL hydrolyzed all tested substrates, an interesting characteristic for some biotechnological purposes. However, MASSL showed preference for short chain fatty acid substrates, differently from other previously described lipases [19–21]. Although in long acyl chain substrates tested the highest activity was reached with  $\rho$ NP palmitate, comparing the kinetic parameters with the substrate  $\rho$ NP laurate the enzyme was 3.5 times more efficient to hydrolyze this second substrate as seen in values of catalytic efficiencies. MASSL was also able to hydrolyze triolein, the standard substrate for true lipases [1,22]. This ability to hydrolyze this triglyceride and substrates with long acyl chains is what differentiates MASSL of

esterases and is essential to classify MASSL as a true lipase, as discussed in several lipase reviews [1,5,22,23]. Besides the interfacial activation of the enzyme and structural characteristic of the lid covering the active site, the lipases are simply defined as carboxylesterases that catalyze the hydrolysis (and synthesis) of long-chain acylglycerols (acyl chain length  $\geq 10$  carbon atoms), with being triolein the standard substrate [22]. The preference for substrates with short acyl chains, also esterase substrates, is a specific characteristic of MASSL. It should be emphasized that most lipases are perfectly capable of hydrolyzing esterase substrates [22,24].

Lipids were recently related with pre-penetration growth of *M. anisopliae* on the host cuticle [25]. These molecules are present in the epicuticle, the first barrier against arthropod pathogenic microorganism, reinforcing the importance of lipolytic enzymes in initial infection stages. Among lipids in the cuticle, the major components are acids and alcohols largely combined as esters [26], and thus form the substrate for the action of lipases. MASSL was also able to hydrolyze the lipid cholesteryl stearate. This is a lipid present in animal cells and in arthropod cuticle. There is growing evidence that extracellular lipases may be important microbial virulence factors [5]. Besides, the ability of MASSL to degrade a variety of substrates could be an important adaptive mechanism by which new host environments with different compositions could be conquered by the pathogen, as suggested for a vast repertoire of *Candida albicans* lipolytic enzymes [27].

The optimum temperature of MASSL activity of between 30 and 37 °C is in accordance with the environmental conditions of application of *M. anisopliae* as a biocontrol agent, mainly in tropical regions. The MASSL showed a good stability at acidic pH range as well as lipase Lip2 from *Y. lipolytica* [20] and differently from those found for other lipases described, like a fish lipase [21] and microbial lipases [19,28,29].

The addition of surfactants could facilitate the contact between enzyme and substrate and consequently increase lipase activity. Similarly to our results, Nawani et al. [30] also found an enhanced lipase activity in the presence of Triton X-100 but total loss of activity in the presence of SDS—contrarily to what was found for MASSL.

The chelating agents EDTA and EGTA had only a partial inhibitory effect on activity, suggesting that this lipase is not a metalloenzyme. The specific lipase inhibitor Ebelactone B completely inhibited MASSL activity. The total inhibition by PMSF is in accordance with results found before [21,31] and with the lipase characteristic as a serine hydrolase. The positive effect of  $\text{Ca}^{2+}$  is very usual in lipases [20,31] and could be explained by the removal of fatty acids as insoluble  $\text{Ca}^{2+}$  salts or simply by enzyme stabilization. Kambourava et al. [31] reported the inhibitory effect of  $\text{Mn}^{2+}$  on *Bacillus stearothermophilus* MC 7 lipase as detected in this work, but  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  exerted a positive effect on MASSL activity—contrarily to what was found for MC 7 lipase. As recently reported for *M. cephalus* lipase [21],  $\beta$ -mercaptoethanol activated MASSL and methanol apparently did not affect activity, as also reported for lipase from *Y. lipolytica* [20].

## 5. Conclusion

The results obtained in this work showed, for the first time, the characterization of a lipolytic enzyme from *M. anisopliae*. Besides the interesting characteristics of MASSL for biotechnological purposes, this enzyme could be involved in host infection process of this important biocontrol agent. Purification and characterization of a lipase from *M. anisopliae* are important steps to reveal the role played by lipases in its infection system and could be helpful to optimize the biocontrol process performed by this fungus of great biotechnology relevance.

## Acknowledgements

We thank Dr. Jay W. Fox and Dr. Nicholas E. Sherman from Microbiology Department, University of Virginia for their assistance with the mass spectrometric analyses. This work was supported by grants and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and CAPES.

## References

- [1] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:390–7.
- [2] de Melo DR, Fernandes EK, da Costa GL, Scott FB, Bittencourt VR. Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to *Ctenocephalides felis felis*. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1149:388–90.
- [3] Moraes AP, Angelo Ida C, Fernandes EK, Bittencourt VR, Bittencourt AJ. Virulence of *Metarhizium anisopliae* to eggs and immature stages of *Stomoxys calcitrans*. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1149:384–7.
- [4] Askary H, Benhamou N, Brodeur J. Ultrastructural and chytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *J Invertebr Pathol* 1999;74:1–13.
- [5] Stehr F, Kretschmar M, Kroger C, Hube B, Schafer W. Microbial lipases as virulence factors. *J Mol Catal B Enzym* 2003;22:347–55.
- [6] Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* 2007;44:1336–41.
- [7] Smoot DT. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms. *Gastroenterology* 1997;113:S31–4.
- [8] Silva WOB, Mitidieri S, Schrank A, Vainstein MH. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Proc Biochem* 2005;40:321–6.
- [9] Rosato YB, Messias CL, Azevedo JL. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 1981;38:1–3.
- [10] Pinto AS, Barreto CC, Schrank A, Ulhoa CJ, Vainstein MH. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Can J Microbiol* 1997;43:322–7.
- [11] Smith PK, Krohn RI, Hermanson JT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1985;150:76–85.
- [12] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [13] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850–8.
- [14] Berto P, Comménil P, Belingheri L, Dehorter B. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiol Lett* 1999;180:183–9.
- [15] Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Davidson WS. Purification strategies for microbial lipases. *J Microb Met* 2003;52:1–18.
- [16] Tahoun MK, Ali HA. Specificity and glyceride synthesis by mycelial lipases of *Rhizopus delemar*. *Enzyme Microb Technol* 1986;8:429–32.
- [17] Chattopadhyay M, Banik AK, Raychaudhuri S. Production and purification of lipase by a mutant strain of *Rhizopus arrhizus*. *Folia Microbiol* 1999;44:37–40.
- [18] Comménil P, Belingheri L, Sancholle M, Dehorter B. Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids* 1995;30:356–7.
- [19] Abramié M, Leseié I, Korica T, Vitale L, Saenger W, Pigac J. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme Microb Technol* 1999;25:522–9.
- [20] Yu M, Qin S, Tan T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Proc Biochem* 2007;42:384–91.
- [21] Aryee ANA, Simpson BK, Villalonga GT. Lipase fraction from the viscera of grey mullet (*Mugil cephalus*). Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme Microb Technol* 2007;20:394–402.
- [22] Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 1999;53:315–51.
- [23] Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 2001;19:627–62.
- [24] Nini L, Sarda L, Comeau LC, Boitard E, Dubès JP, Chahinian H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochim Biophys Acta* 2001;1534:34–44.
- [25] Jarrold SL, Moore D, Potter U, Charnley AK. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycol Res* 2007;111:240–9.
- [26] Hackman RH, Filshie BK. The tick cuticle. In: Obenchain FD, Galun R, editors. *Physiology of ticks—current themes in tropical science*, vol. 1. New York: Pergamon Press; 1982. p. 35.
- [27] Stehr F, Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, Mähnb B, Neuber K, et al. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res* 2004;4:401–8.
- [28] Choo DW, Kurihara T, Suzuki T, Soda K, Esaki N. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: gene cloning and

- enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol* 1998;64: 486–91.
- [29] Nthangeni MB, Patterton HG, Tonder AV, Vergeer WP, Litthauer D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme Microb Technol* 2001;28:705–12.
- [30] Nawani N, Dosanjh NS, Kaur J. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnol Lett* 1998;20:997–1000.
- [31] Kambouruva M, Kirilova N, Mandeva R, Derekova A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *J Mol Catal B Enzym* 2003;22:307–13.

### 3.4. Capítulo 4

Antibodies production against spore surface lipase from *Metarhizium anisopliae*

Neste capítulo apresentamos a produção de anticorpos policlonais contra a lipase purificada de esporo de *M. anisopliae*. A produção de anticorpos aqui apresentada não foi satisfatória em quantidade. Porém, ocorreu o reconhecimento da lipase purificada e de possivelmente outra lipase do esporo em *western blot* com os anticorpos produzidos. Além disso, a partir destes resultados poderemos traçar novas estratégias para melhorar a produção de anticorpos, como aumento da quantidade de antígeno nas imunizações e o uso de outros modelos animais.

**Antibodies production against spore surface lipase from *Metarhizium anisopliae***

Walter O. B. Silva<sup>a</sup>, Lucélia Santi<sup>a</sup>, Augusto Schrank<sup>a,b</sup>; Marilene H. Vainstein<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biotecnologia, <sup>b</sup> Departamento de Biologia Molecular e

Biotecnologia,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, CEP 91501-970,

Porto Alegre, RS, Brazil



## **Abstract**

The fungus *Metarhizium anisopliae* is a broad host-range arthropod pathogen applied in biological control. Studies on the participation of proteases and chitinases during host infection have been reported but little is known about lipases in this fungus. In a previous work, a 66-kDa lipase from *M. anisopliae* spore surface was purified, and in the present work antibodies against this enzyme were produced to investigate its possible role in infection. Western blot analysis suggests that the purified antibody was lipase specific, with two weak bands in spore surface proteins corresponding to the 66-kDa lipase (strongest band), and other with approximately 45 kDa, which is probably another lipase, according to previous purification results. Antibodies production was low and no inhibition of lipase activity occurred using these antibodies at any of the concentrations tested. Similarly, no influence in the infection of arthropod models inoculated with spores plus antibodies was observed. In the future, other strategies with higher concentrations of lipase protein and the use of other animals for antibody production will be used to help in the investigation of the actual role this enzyme plays in the infection system.

## Introduction

Microbial lipases secreted by microbial pathogens may play a role as virulence factors, and have been described in host infection processes of bacteria and fungi (Stehr et al. 2003). In fact, their primary action during host infection by bacteria and fungi has been well documented (Stehr et al. 2003; Gribbon et al. 1993; Smoot 1997). These enzymes are essential to degrade barriers in host environment containing lipids. Lipases of many pathogenic microorganisms described so far play different roles in the infection process, and their synthesis is regulated during this process (Schofield et al. 2005; Stehr et al. 2004). Some of such roles could be the enhancement of the adhesion to the host cuticle or tissue penetration.

The filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is an pathogenic arthropod microorganism used in biological control strategies against several plagues (Frazzon et al. 2000; Gillespie et al. 1998). The *M. anisopliae* host infection process begins with conidial adhesion to host surface and integument penetration by a synergistic strategy of mechanical pathways and secretion of hydrolytic enzymes, such as proteases (Dutra et al. 2004; Freimoser et al. 2005; Gillespie et al. 1998) chitinases (Silva et al. 2005; St Leger et al. 1996) and possibly lipases, to transverse the first host barrier to infection. In a previous work, we optimized culture conditions to the production and extraction of lipases in *M. anisopliae* (Silva et al. 2005). Due to the fact that arthropod cuticle architecture contains the epicuticle, a primary barrier formed mainly by lipids, lipases are possibly very important to transverse this and to trigger whole

infection process.

Associated components of conidia, the infective unit of *M. anisopliae*, such as its lipases or other enzyme constituents that could be involved in the initiation of the infection process have not yet been fully characterized. In this scenario, their possible role in the infective process as well as the action mechanism are even less understood. A 66-kDa *M. anisopliae* spore surface lipase (MASSL) was previously purified and characterized (Silva, unpublished data). In this work, we produced anti-MASSL antibodies and evaluated the effect of these antibodies in spores of *M. anisopliae* to control arachnid hosts.

## **Materials and Methods**

### **Microorganism**

*M. anisopliae* var. *anisopliae* isolate E6 was originally isolated from insects (Rosato et al. 1981) and kept as previously described (Bogo et al. 1998). Fungus cultivation for conidia production was performed using 100 g of rice added to 30 mL 0.5% peptone solution. The culture media was autoclaved in polypropylene bags for 30 min. In each bag,  $10^6$  spores were inoculated and the fungus was grown at 28°C for 14 days. For conidial suspension production, 100 mL of sterile distilled water were added to a polypropylene bag containing grown and sporulated fungus. The material was manually shaken and the resulting suspension was collected. Prior to use, the concentration of conidia was determined by direct count using a Neubauer hemocytometer and diluted in sterile distilled water to the concentration desired.

## **Antibody production and immunoblotting**

Antiserum against MASSL was raised in a 2-month-old New Zealand white rabbit. Purified MASSL bands from SDS-PAGE electrophoresis excised and emulsified with Freund's incomplete adjuvant were injected subcutaneously, at 10-day intervals (total of 9 injections, 5 injections with 100 µg followed by 4 injections with 150 µg of MASSL). Serum collected after the third injection was titrated by western blot. Serum was collected prior to immunization and used as control. For western blot analysis, proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes. The blotted membranes were blocked with 5% (w/v) nonfat dried milk in Tris buffered saline (TBS-T, 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6) for 120 min at room temperature. After blocking, the membranes were exposed to primary antibodies (250 µg in 10 ml buffer) raised against MASSL overnight at 4 °C in TBS-T. The membranes were then washed with TBS-T three times, for 10 min each wash, and then incubated for a further 1 h in a second antibody solution of anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated at a 1:2000 dilution, washed and revealed according to the instructions provided by the ECL kit (GE, USA).

## **Extraction of spore surface proteins (SSP)**

*M. anispliae* spores produced as described above were suspended in an extraction buffer (Tris HCl 50 mM pH 8.0 containing 0.25% Triton X-100, 1:2.5 w/v) (Silva et al. 2005). The suspension was vigorously shaken for 5 min and the resulting supernatant was filtered in a 0.2-µm filter (Millipore, USA). The

supernatant thus obtained was named spore surface proteins (SSP) and used as source for enzymatic assays.

### **Quantification of lipolytic activity and protein**

Lipolytic activity was assayed using *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA). Samples (10  $\mu$ L) were mixed with 90  $\mu$ L of substrate solution at pH 8.0 (Silva et al. 2005). After 30 to 60 min of incubation at 37 °C, the absorbance was measured spectrophotometrically at 410 nm using a plate spectrophotometer Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA), and an enzyme-free control. To study the effect of anti-MASSL antibodies on the *in vitro* lipase activity of the SSP sample or purified lipase (Silva, unpublished data), each sample was assayed with different concentrations of anti-MASSL antibodies incubated with each enzymatic solution in 50 mM Tris-HCl buffer at pH 8.0 for 30 min. Activity was expressed as percent of control value (100%) recorded in experiments with no antibodies. Protein measurements were carried out according to the bicinchoninic acid method (BCA protein assay - Pierce), using bovine serum albumin as standard (Smith et al. 1985).

### **Gel electrophoresis**

SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970), using a 4.5% (w/v) stacking gel and a 12% (w/v) running gel in a Mini-Protean II electrophoresis cell (Bio-Rad). The run was carried out at 200 V constant voltage. Proteins were detected in gels using coomassie G and respective

molecular masses were determined by the mobility of known molecular mass standards (Sigma).

## **Bioassays**

For the bioassays, fully engorged *R. microplus* females or adults of *Loxosceles* sp. individuals were externally disinfected with hypochlorite 2.5% for 2 s and washed first with sterile saline and then with sterile distilled water. For exposure, ticks or recently fed spiders were totally immersed in a suspension of  $10^8$  *M. anisopliae* conidia.mL<sup>-1</sup> for approximately 15 s. For the bioassays with anti-MASSL antibodies, we used a spore suspension mixed and previously incubated with 2 mg.mL<sup>-1</sup> of anti-MASSL for 30 min. After treatments, ticks were sorted into groups of 9 individuals in Petri dishes and 6 spiders were individually placed in 50-mL plastic tubes (Labconco, USA) without lid and covered with screen tissues for each experiment. All animals had free access to sterile water and were maintained in a humid chamber (>90% relative humidity) at 28 °C. As control, ticks and spiders were treated exactly in the same way, except for the immersion in sterile water instead of the conidia suspension.

## **Results and Discussion**

A partially purified and electrophoretically homogeneous lipase was prepared from a spore extract from *M. anisopliae* and used to produce polyclonal antibodies against a 66-kDa lipase. The antibodies produced were purified by Protein G affinity chromatography. Spore extract from *M. anisopliae*

was separated by SDS-PAGE and the gel was used to test the specificity of antibodies for the lipase. Western blot analysis showed two weak bands corresponding to the 66-kDa lipase (strongest band), and another lipase, with approximately 45 kDa. This 45-kDa band is probably another lipase, according to previous purification results (data not shown), suggesting that the purified antibody was lipase specific (Fig. 1). We used also purified lipase that was recognized in western blot analyses as a single weak band. Although the antibody produced has recognized lipase in western blot analyses, the enzymatic activity was not inhibited by the antibody solution at any concentration tested, for lipases extracted from spore surface or purified lipase. This fact occurs probably and mainly due to the low concentration of antibody produced (dilution of 1:10 for a positive result in western blot). Besides, the success in inhibition of enzymatic activity by specific antibodies is related with the fact that the region of active site of the lipase is involved in the specific antibody-antigen interaction (Comménil et al., 1998). The inhibition of activity was reached in previous works (Comménil et al., 1998; Berto et al. 1999), which also characterized lipase in microbial infection systems. Comménil et al. (1998) reported that  $5.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  of specific antibodies reduced lipase activity of *Botrytis cinerea* by 70%, while higher concentrations almost completely inhibited all activity. Using the same antibodies for the lipase of *Alternaria brassicicola*,  $192 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  was necessary to produce an inhibition of almost 90% (Berto et al. 1999). Although a similar procedure for antibody production had previously been applied (Silva et al. 2005) with lower protein concentrations in immunizations,

the immunogenic properties exhibited by *M. anisopliae* lipase could be rather, which would result in low antibody concentration.

We also tested the effect of antibodies produced in spores used for infection of arachnid hosts. As seen in Fig. 2, the previous treatment of spore has no influence in infection development and consequently in spider or tick control. Contrarily to these results, Comménil (1998) and Berto (1999) showed that anti-lipase antibodies prevent infection of host or drastically reduced the lesions and symptoms caused by infection by around 90%, but also inhibited lipase activity, as discussed before.

The relevance of lipase activity in microbial infections was previously reported (Sther et al. 2003). The lipase from *M. anisopliae* spore surface could be related with pathogenesis, and strategies using antibodies to investigate the actual role this enzyme plays in infection have been reported (Comménil et al. 1998; Berto et al. 1999). In the future, strategies that use higher concentrations of lipase protein and animals such as mice for antibody production will be employed to investigate the actual role this enzyme plays in infection systems.

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and CAPES.



## References

- Frazzon APG, Da Silva Vaz Junior I, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 2000;94:117-125.
- Gillespie JP, Bateman R, Charnley AK. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J Invert Pathol* 1998;71:128-137.
- Freimoser FM, Hu G, St Leger RJ, 2005. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. *Microbiology* **151**: 361-371.
- St Leger RJ, Joshi L, Bidochka RJ, Rizzo NW, Roberts DW, 1996. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1257-1264.
- Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Schrank IS, Vainstein MH, 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. *Res Microbiol* 2004;155:245-251.
- Silva MV, Santi L, Staats CC, Costa AM, Colodel EM, Driemeier D, Vainstein A, Schrank A. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Res Microbiol* 2005;156:382-392.

Stehr F, Kretschmar M, Kroger C, Hube B, Schafer W. Microbial lipases as virulence factors. *J Mol Catal B: Enzymatic* 2003;22:347-355.

Gribbon EM, Cunliffe WJ, Holland KT. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. *J Gen Microbiol* 1993;139:1745-1751.

Smoot DT. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct Mechanisms. *Gastroenterology* 1997;113:S31-S34.

Silva WOB, Mitidieri S, Schrank A, Vainstein MH. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Proc Biochem* 2005;40:321-326.

Rosato YB, Messias CL, Azevedo JL. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 1981;38:1-3.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, *et al.* Measurement of the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.

Stehr F, Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, MhnB B, Neuber K, Hube B, Schafer W. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res* 2004;4:401-408.

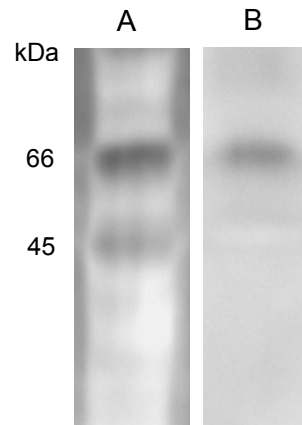
Schofield DA, Westwater C, Warner T, Balish E, 2005. A differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiology Letters* **244**: 359-365.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

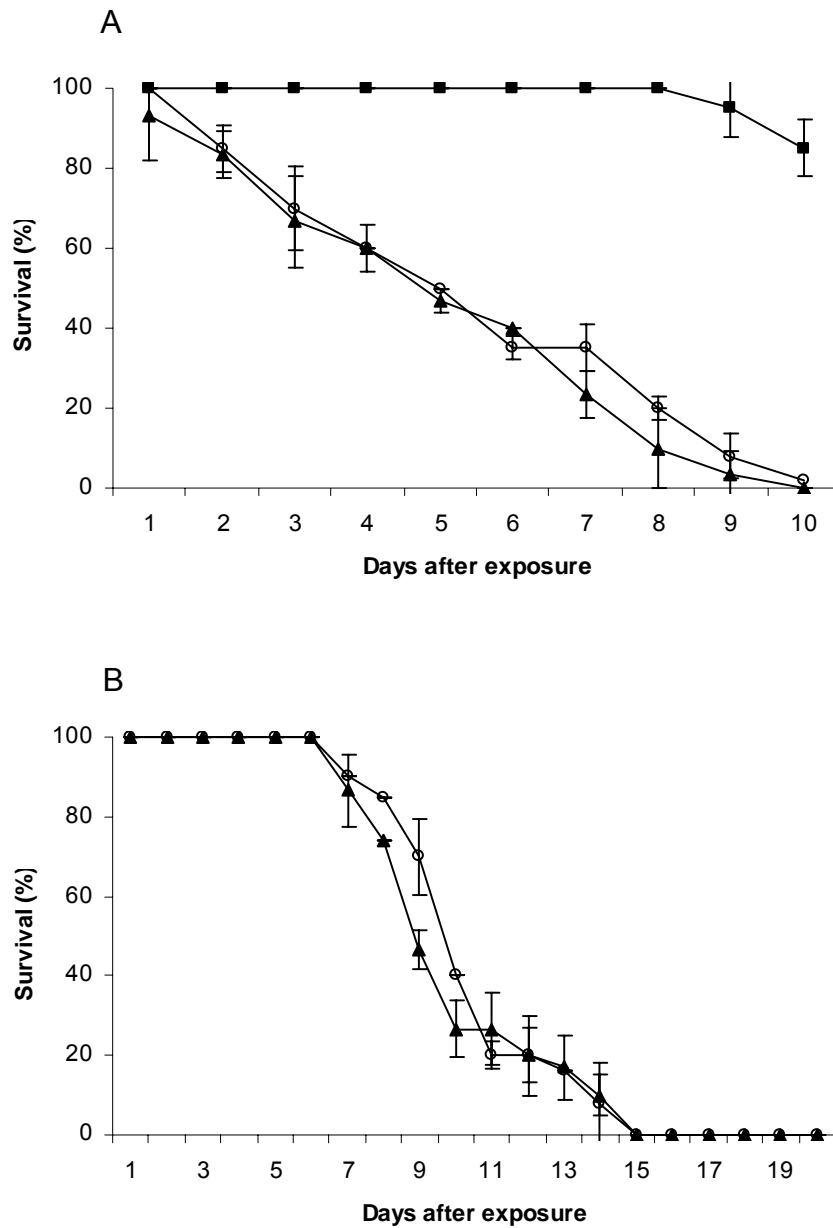
Comménil P, Belingheri L, Dehorter B, 1998. Anti-lipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 1-14.

Berto P, Comménil P, Belingheri L, Dehorter B, 1999. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiology Letters* **180**: 183-189.

**Fig. 1.** Western blots of spore surface proteins (SSP) (lane A) and purified spore surface lipase (lane B) from *M. anisopliae*. The proteins were subjected to SDS-PAGE (12% acrylamide) and immunoblots were performed with purified antibodies raised against lipase from spore surface of *M. anisopliae*.



**Fig. 2.** Mortality of *R. microplus* and *Loxosceles* sp. exposed to *M. anisopliae* conidia suspension ( $10^8$  conidia.mL<sup>-1</sup>) with different treatments. (A) Mortality of *R. microplus*: (■) control (without conidia); (○) conidia suspension plus anti-lipase antibodies; (▲) conidia suspension. (B) Mortality of *Loxosceles* sp.: (○) conidia suspension plus anti-lipase antibodies; (▲) conidia suspension. Bars represent standard error.



### 3.5. Capítulo 5

*Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus* infection

Manuscrito submetido ao periódico Mycological Research

Neste capítulo apresentamos o efeito da inibição da atividade lipolítica na infecção do carrapato bovino *R. microplus* por *M. anisopliae* através da utilização de um inibidor específico. A inibição desta atividade previniu a colonização e a morte do hospedeiro. Comprovamos, desta maneira e pela primeira vez, a importância das enzimas lipolíticas no processo de infecção do hospedeiro de *M. anisopliae*.

Mycological Research

Ref: MYCRES-D-09-00085

Title: *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus microplus* infection

Authors: Walter Orlando B Silva, MsC; Lucélia Santi, MsC; Augusto Schrank, PhD; Marilene Henning Vainstein, PhD Article Type: Original Research

Dear Marilene,

Your submission entitled "*Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus microplus* infection" has been assigned the following manuscript number: MYCRES-D-09-00085. You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/mycres/>.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Kate Partner

Journal Manager

Mycological Research

***Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* infection**

Walter O. B. SILVA<sup>1</sup>, Lucélia SANTI<sup>1</sup>, Augusto SCHRANK<sup>1</sup>, Marilene H. VAINSTEIN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, 91501-070, Porto Alegre RS, Brazil

W.O.B.Silva. [walterbeys@cbiot.ufrgs.br](mailto:walterbeys@cbiot.ufrgs.br)

L.Santi. [lsanti@cbiot.ufrgs.br](mailto:lsanti@cbiot.ufrgs.br)

A.Schrank. [aschrank@cbiot.ufrgs.br](mailto:aschrank@cbiot.ufrgs.br)

\*Corresponding author. Tel +55 (051) 3308-6060 and Fax +55 (051) 3308-7309.

e-mail address. [mhv@cbiot.ufrgs.br](mailto:mhv@cbiot.ufrgs.br).

Short summary

Lipases secreted by *Metarhizium anisopliae*, an important biological control agent, could potentially be involved in the host infection process. Here, we present the activity profile during the host infection process and the effect of lipase activity inhibitor ebelactone B on infection. The previous treatment of spores with lipase activity inhibitor, ebelactone B, completely inhibited lipolytic activity and prevented the infection of the *R. microplus* host. The results herein presented prove, for the first time, the importance of lipase activity in *M. anisopliae* host infection process.



## ABSTRACT

The filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* is one of the most important and studied biological agents for the control of several arthropod pests, including the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Lipases secreted by *M. anisopliae* could potentially be involved in the host infection process. This work presents the activity profile during the host infection process and the effect of lipase activity inhibitor ebelactone B on infection. During the course of tick exposure to spores (6 to 120 h) lipase activity increased from  $0.03 \pm 0.00$  U to  $0.312 \pm 0.068$  U using  $\rho$ NP palmitate as substrate. In zymograms, bands of lipase activity were detected in ticks treated with spores without inhibitor. The previous treatment of spores with lipase activity inhibitor, ebelactone B, completely inhibited lipolytic activity, at all times specified, and prevented the infection of the *R. microplus* host. Spores treated with the inhibitor did not germinate on the tick, although this effect was not observed in the culture medium. The results herein presented prove, for the first time, the importance of lipase activity in *M. anisopliae* host infection process.

**Keywords:** Ebelactone B, Host infection process, Lipase, *Metarhizium anisopliae*,  $\rho$ -nitrophenyl palmitate ( $\rho$ NPP), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Tick.

## Introduction

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are serine hydrolases of considerable physiological significance and industrial potential that catalyze the hydrolysis and synthesis of ester bonds formed from glycerol and long-chain fatty acids. These enzymes are extremely versatile because they catalyze several different reactions and offer a wide array of industrial applications such as observed in dairy and food industries, leather and detergent industries, among others (Jaeger & Eggert 2002; Sharma *et al.* 2001).

Apart from these industrial applications, lipases secreted by pathogenic microorganisms may play a role as virulence factors (Stehr *et al.* 2003), and are involved in some infection systems among bacteria and fungi (Berto *et al.* 1999; Comménil *et al.* 1998; Gribbon *et al.* 1993). In order to determine the significance of lipases in the host infection process by the insect- and mite-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, known as a good lipase producer (Silva *et al.* 2005), this study developed a strategy for *in situ* determination of lipases.

The filamentous fungus *M. anisopliae* is one of the most important and studied biological agents for the control of many arthropod pests, including the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Frazzon *et al.* 2000). Conidial adhesion to host surface and integument penetration are the first events of the infection process (Arruda *et al.* 2005; Askary *et al.* 1999). Conidia attachment to the cuticle is thought to involve non-specific adhesion mechanisms mediated by the hydrophobicity of the conidial cell wall (Boucias *et al.* 1988; Boucias *et al.* 1991). The participation of proteases and chitinases in the infection process has been demonstrated in previous research (Dutra *et*

*al.* 2004; Freimoser *et al.* 2005; Gillepsie *et al.* 1998; da Silva *et al.* 2005; St Leger *et al.* 1996). However, only a few studies that detected the lipolytic activity of *M. anisopliae* in synthetic culture medium have been published (Robert & Messing-Al-Aidroos 1985; Rosato *et al.* 1981; Silva *et al.* 2005; St Leger *et al.* 1986).

The aim of this work was to analyze the lipolytic activity profile and the effect of lipase activity inhibition using ebelactone B during the infection by *M. anisopliae* of cattle tick, *R. microplus*.

## **Materials and methods**

### **Microorganism and *in vivo* assays**

*M. anisopliae* var. *anisopliae* isolate E6 was originally isolated from insects (Rosato *et al.* 1981) and kept as previously described (Bogo *et al.* 1998). Conidia were collected from fungi grown on Cove's medium (MC) agar plates (Pinto *et al.* 1997) in 0.01% Tween 80 solution and washed in sterile distilled water. Prior to use, the concentration of fresh conidial suspensions were determined by direct counts using a Neubauer hemocytometer, and suspensions were diluted in sterile distilled water to a final concentration of  $1 \times 10^8$  conidia.mL<sup>-1</sup>.

For the *in vivo* assays, fully engorged *R. microplus* females from infested bovines were externally disinfected with hypochlorite 2.5% for 2 s and washed first with sterile saline and then with sterile distilled water. For exposure, ticks were totally immersed in a suspension of  $10^8$  *M. anisopliae* conidia.mL<sup>-1</sup> for approximately 15 s. For the inhibition assays we used a spore suspension previously incubated with 2 mM of lipase

inhibitor ebelactone B dissolved in ethanol 99.3% for 15 min. Ethanol controls were prepared with a conidial suspension supplemented with an equivalent volume of ethanol. After treatments, ticks were sorted into groups of 9 individuals in Petri dishes, maintained in a humid chamber (>90% relative humidity) at 28 °C and collected at different times for analyses. As control, ticks were treated exactly in the same way but were immersed in sterile water instead of the conidial suspension.

### **Lipase quantification during the *in vivo* assays**

The lipase activity was assayed using *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP - Sigma) as the substrate followed by established procedures (Winkler & Stuckmann 1979). Ticks from the different *in vivo* assays treatments described above and pre-selected according to weight and size were totally immersed in 0.9 mL of substrate solution (3 mg of *p*NPP dissolved in propanol-2-ol (1):(9) 50 mM Tris-HCl pH 8.0 / 40 mg Triton X-100 / 10 mg gum arabic) each in a 1-mL cuvette (Fig 1). After a 30-min incubation period at 37 °C, ticks were removed, and the absorbance of the solution was measured spectrophotometrically (LKB Ultraspec III, Pharmacia) at 410 nm. The controls consisted of ticks treated exactly in the same way, except for the immersion in sterile water instead of the conidial suspension. One lipase unit (U) was defined as the amount of enzyme that released 1  $\mu$ mol *p*-nitrophenol per min in the assay conditions described above.

Protein quantification was performed according to the bicinchoninic acid method (BCA protein assay - Pierce), using bovine serum albumin as standard (Smith *et al.* 1985).

### **Crude lipase extracts and zymograms**

For lipase extraction, 200  $\mu$ L of 50 mM Tris-HCl pH 8.0 / 0.25% (v/v) of SDS (Sigma) (Silva *et al.* 2005) per tick was added, and the mixture was vigorously mixed in vortex for 2 min. Ticks were removed, and the solution was centrifuged for 10 min at 10.000 rpm. The supernatant was collected, concentrated by lyophilization and used for zymograms.

The detection of the lipase activity in 10% polyacrilamide native gels was performed using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl (MUF)-butyrate. After electrophoresis gels were immersed in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 / 2% Triton X-100 / 10  $\mu$ M of MUF-butyrate at 37 °C, under light agitation for 10 min. Upon UV illumination (UV-B lamp Sankyo Denki G15T8E, Japan), lipase activity bands were revealed by fluorescence and recorded (Diaz *et al.* 1999).

### **Scanning electron microscopy (SEM)**

For SEM analysis, ticks from different treatments and times described in *in vivo* assays were fixed for 4 days at 4 °C in 2% (v/v) glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde with 0.1 M sodium cacodylate buffer at a pH of 7.2. After four days, the specimens were rinsed in buffer, dehydrated in a series of 30 to 100% acetone solutions, dried at critical point in CO<sub>2</sub> (CPD 030 BALTEC), and coated with gold using a sputter-coater (SCD 050 BALTEC). Ticks were examined in a Jeol JSM 6060 scanning electron microscope at the Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(CME/UFRGS, Porto Alegre/RS).

## Results

Table 1 show the lipase activity quantified using the *in vivo* assay developed in this work, where *M. anisopliae* treated ticks were totally immersed in the substrate solution (Fig 1). Lipase activity was constant during the first 48 h of treatment of ticks with *M. anisopliae* spores without lipase inhibitor ebelactone B, and had values of around 0.03 U for total activity per tick. Within 72 h, lipase activity began to increase sharply, both with the ethanol suspension and with the spore suspension. Within 96 h, activity reached levels of around 0.2 U per tick, and the highest activity peak was observed at 120 h, with roughly 0.3 U (Table 1). In 120 h we also observed a 50% tick death rate (Fig 2) and total colonization of the host cuticle by *M. anisopliae* (Fig 3) for both treatments with spores without lipase inhibitor. In both treatments, activity levels were very similar for all times analyzed. In the treatment with lipase inhibitor ebelactone B no lipase activity was observed in any of the times specified (Table 1). Similarly, no germination of spores treated with inhibitor was detected on ticks (Fig 3). Germination of spores on the culture medium was not affected by 2 mM ebelactone B (data not shown). Moreover, the survival curve constructed for the bioassays with the treatment with ebelactone B was very similarly shaped to that of the control curve (water only), and no host death after up to 7 days was recorded.

The zymograms of the treatments conducted with lipase inhibitor or with the control without spores no lipase activity bands were observed. Extracts prepared from conidia-treated ticks without lipase inhibitor produced at least 3 lipase activity bands

(Fig 4). Lipolytic activity bands were detected for all times analyzed from ticks exposed to spores and showed a pattern with bands differing mainly in relation to intensity.

## Discussion

There is growing evidence that extracellular lipases may be important microbial virulence factors (Stehr *et al.* 2003). Lipolytic enzymes of many pathogenic microorganisms described so far play different roles in the infection process, and their synthesis is regulated during this process (Schofield *et al.* 2005; Stehr *et al.* 2004). One such role, the enhancement of the adhesion to the host cuticle, is experimentally supported by the detection of lipase activity in the very first 6 h of tick exposure to conidia (Table 1 and Fig 4). As described by Göttlich *et al.* (1995), lipolytic activity increases the hydrophobic interactions by releasing free fatty acids that favor adhesion to the host. The early detection of lipolytic activity could also be related to the possible presence of lipolytic enzymes on the *M. anisopliae* conidial surface, as observed for plant pathogenic fungi for which an important role in successful infection is suggested (Berto *et al.* 1999). In contrast to what was previously reported by Freimoser *et al.* (2005) and St Leger *et al.* (1986), we found that lipases are probably not the last class of depolymerases to be secreted onto the host cuticle since they could be detected as early as 6 h of host exposure to spores and at all initial times analyzed in the bioassay. Fully engorged females of *R. microplus* exhibit an increase of 215% in the total lipid content at this stage, from 20 to 63  $\mu\text{g}$  per tick (Hackman & Filshie 1982). Further, since lipids are the first barrier against arthropod pathogenic microorganism, the importance of lipases in initial infection stages is reinforced. Among lipids in the cuticle, the major

components are acids and alcohols largely combined as esters (Hackman & Filshie 1982), thus forming substrate for the action of lipases.

The effective control of the host as well as the secretion of lipases during the process, were negatively affected by the spore treatment with the specific lipase activity inhibitor ebelactone B. The inhibition of lipolytic enzymes that cause a decrease or even the total absence of host infection has been reported, and characterized mainly for phytopathogens. Comménil *et al.* (1998) observed the need for lipase activity at the first stages of the infection of the host of fungus *B. cinerea*, and revealed that anti-lipase antibodies prevented the infection of tomato leaves. By using the same strategy of blocking the lipase activity of *Alternaria brassicicola* spores, Berto *et al.* (1999) showed that the lipase produced by this fungus plays a crucial role in the infection of cauliflower leaves, and thus proposed that these enzymes may be related to the adhesion and/or penetration of the fungal propagules during early stages of host-parasite interactions. In *M. anisopliae*, the inhibition of lipase activity using ebelactone B may have also caused the absence of infection (Fig 3), possibly due to the compromised ability to degrade this top most lipid layer of the tick cuticle, thus preventing the triggering of the whole infection process. The results obtained with ebelactone B indicate that lipases are closely involved in the fungal infection and pathogenesis with *M. anisopliae*. Strategies that use inhibitors of the ebelactone group have been widely adopted in the study of fungal infection systems, as recently reported for *Candida parapsilosis*, in which the prevention of lipase activity reduced the destruction of epidermal and epithelial human tissues (Gácsér *et al.* 2007). The ebelactone treatment strategy has been used mainly with phytopathogenic fungi in which lipolytic enzymes have been proved to be very important (Davies *et al.*, 2000; Francis *et al.* 1996; Köller *et al.* 1990; Voigt *et al.* 2005).



Apart from this, the structure of plant hosts is very similar to that of arthropods that play the role of hosts to *M. anisopliae* in possessing a lipid barrier that works as the first layer exposed to fungal attack. In both systems, the pathogen initially needs to traverse this lipid barrier on the host's cuticle and usually does so by secreting lipolytic enzymes. In spite of this similarity and of the proven importance of these enzymes to other infection systems, apart from those of phytopathogens (Sther *et al.* 2003), this is the first study to demonstrate the importance of lipases in the infection of arthropod hosts.

Zymograms of extracts from spores non-treated ticks and spores plus ebelactone B treated ticks showed no lipolytic activity bands. On the other hand, we detected lipase activity bands in ticks exposed to this fungus without lipase inhibitor at post-exposure that we analyzed. At least 3 different lipolytic activity bands were detected during the experiment. The different bands could be involved in different stages and roles during infection process as for instance fungal nutrition, as reported for higher amounts of lipase activity in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and to support colonization as lipolytic activity of *Malassezia furfur* (Stehr *et al.* 2003).

Differences in lipase activity profiles of zymograms, when compared to enzymatic assays during the host infection process, may be explained by the nature of the substrates used in the analysis. The pNPP used for the enzymatic assays is a specific lipase substrate, while MUF-butyrate may also be degraded by lipolytic enzymes other than lipases (e.g., esterases; Jaeger & Eggert 2002). Another important difference between these substrates, besides the fact that pNPP is a chromogenic while MUF-butyrate is a fluorogenic substrate, is that the number of carbon atoms in the fatty acid chain might influence the preferential action of the lipases enzymes. The combination of

these different substrates in the present strategy is very important, since it allows detecting different lipolytic enzymes.

In addition, an interesting characteristic of the strategy presented here was the use of live hosts to detect lipase activity *in situ* during host infection. Studies on this subject are usually based on the detection of proteins by specific antibodies or by assessing the effect of activity inhibition. In this work, besides assessing the effect of inhibition, we also were successful in quantifying lipase activity during the whole process and also in visualizing different activity bands extracted at different times during the bioassay. The simple and rapid method for lipase activity detection applied to the *M. anisopliae*/tick model could be helpful in elucidating the participation and the possible role of lipases in other pathogen / host systems. Here we showed a reproducible pattern of lipase activities detected even at the first stages of the infection process. The results presented here prove for the first time the importance of lipase activity in the infection process of the tick *R. microplus*. Future work will deal with the isolation of these lipases and the characterization of the differing roles these enzymes play during the host infection process.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and CAPES.

## References

- Arruda W, Lubeck I, Schrank A, Vainstein MH, 2005. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration in *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* **37**: 231-244.
- Askary H, Benhamou N, Brodeur J, 1999. Ultrastructural and chytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* **74**: 1-13.
- Berto P, Comménil P, Belingheri L, Dehorter B, 1999. Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiology Letters* **180**: 183-189.
- Bogo MR, Rota CA, Pinto Jr H, Ocampos M, Correa CT, Vainstein MH, Schrank A, 1998. A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology* **37**: 221-225.
- Boucias DG, Pendlant JC, Latgé JP, 1988. Nonespecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1795-1805.
- Boucias DG, Pendlant JC, Latgé JP, 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod hosts. In: Cole GT, Hoch HC (Eds), *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, New York, pp. 101-108.
- Comménil P, Belingheri L, Dehorter B, 1998. Anti-lipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 1-14.

- da Silva MV, Santi L, Staats CC, Costa AM, Colodel EM, Driemeier D, Vainstein MH, Schrank A, 2005. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology* **156**: 382-392.
- Davies KA, De Lorono I, Foster SJ, Li D, Johnstone K, Ashby AM, 2000. Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**: 63-75.
- Diaz P, Prim N, Javier Pastor FI, 1999. Direct fluorescence based lipase activity assay. *Biotechniques* **27**: 696-700.
- Dutra V, Nakazato L, Broetto L, Schrank IS, Vainstein MH, Schrank A, 2004. 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* **155**: 245-251.
- Francis SA, Dewey FM, Gurr SJ, 1996. The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49**: 201-211.
- Frazzon APG, Da Silva Vaz Junior I, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH, 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* **94**: 117-125.
- Freimoser FM, Hu G, St Leger RJ, 2005. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. *Microbiology* **151**: 361-371.

- Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD, 2007. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 1336-1341.
- Gillepsie JP, Bateman R, Charnley AK, 1998. Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* **71**: 128-137.
- Göttlich E, de Hong GS, Yoshida S, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M, 1995. Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. *Mycoses* **38**: 489-494.
- Gribbon EM, Cunliffe WJ, Holland KT, 1993. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. *Journal of Genetics Microbiology* **139**: 1745-1751.
- Hackman RH, Filshie BK, 1982. The tick cuticle. In: Obenchain FD, Galun R (Eds), *Physiology of ticks – Current themes in tropical science*. vol. I. Pergamon Press, New York, pp. 35.
- Jaeger KE, Eggert T, 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 390-397.
- Köller W, Trail F, Parker DM, 1990. Ebelactones inhibit cutinases produced by fungal plant pathogens. *The Journal of Antibiotics* **43**: 734-735.
- Pinto AS, Barreto CC, Schrank A, Ulhoa CJ, Vainstein MH, 1997. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology* **43**: 322-327.
- Robert A, Messing-Al-Aidros K, 1985. Acid production by *Metarhizium anisopliae*: Effects on virulence against mosquitoes and on detection of in vitro amylase, protease, and lipase activity. *Journal of Invertebrate Pathology* **45**: 9-15.

- Rosato YB, Messias CL, Azevedo JL, 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **38**: 1-3.
- Schofield DA, Westwater C, Warner T, Balish E, 2005. A differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiology Letters* **244**: 359-365.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC, 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* **16**: 627-662.
- Silva WOB, Mitidieri S, Schrank A, Vainstein MH, 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* **40**: 321-326.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, 1985. Measurement of the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **150**: 76-85.
- St Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM, 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* **48**: 85-95.
- St Leger RJ, Joshi L, Bidochka RJ, Rizzo NW, Roberts DW, 1996. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1257-1264.
- Stehr F, Kretschmar M, Kroger C, Hube B, Schafer W, 2003. Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **22**: 347-355.

- Stehr F, Felk A, Gácsér A, Kretschmar M, Mahn B, Neuber K, Hube B, Schäfer W, 2004. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Research* **4**: 401-408.
- Voigt CA, Schäfer W, Salomon S, 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal* **42**: 364-375.
- Winkler UK, Stuckmann M, 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* **138**: 663-670.

Table 1- Lipase activity from *M. anisopliae* during infection in *R. microplus*.

<b>Lipase activity (U/tick) *</b>			
<b>Conidia exposure</b>	<b>Ss**</b>	<b>Ss** +</b>	<b>Ss** +</b>
<b>time (h)</b>		<b>ethanol</b>	<b>ebe lactone B***</b>
6	0.030 ± 0	0.032 ± 0.002	0
12	0.033 ± 0.007	0.035 ± 0.004	0
24	0.031 ± 0.002	0.033 ± 0.009	0
48	0.036 ± 0	0.038 ± 0.021	0
72	0.042 ± 0.011	0.043 ± 0.009	0
96	0.207 ± 0.021	0,215 ± 0.015	0
120	0.312 ± 0.068	0.305 ± 0.088	0

\* Lipase activity was assayed using p-nitrophenyl palmitate as substrate during 30 min of reaction and incubation at 37 °C. Absorbance was measured spectrophotometrically at 410 nm against a control consisting of a non-infected tick.

\*\* Spore suspension 10<sup>8</sup> spores.mL<sup>-1</sup>.

± Standard deviation (based on five replicates).

\*\*\* 2mM



## Figure legends

Fig. 1- Lipase activity produced by *M. anisopliae* infection on *R. microplus*. Lipase activity was measured with p-NP palmitate after 30 min of reaction. A- Non-exposed tick (control); B- tick exposed to *M. anisopliae* conidia (after 96 h of incubation). Lipase activity was expressed as the amount of paranitrophenol released and that produced the yellow color observed in “B”.



Fig. 2- Mortality of *R. microplus* exposed to *M. anisopliae* conidial suspension ( $10^8$  conidia.mL<sup>-1</sup>) with different treatments: (□) control (without conidia); (■) conidial suspension plus ethanol; (▲) conidial suspension; (○) conidial suspension plus ebelactone B 2 mM. Bars represent standard error.

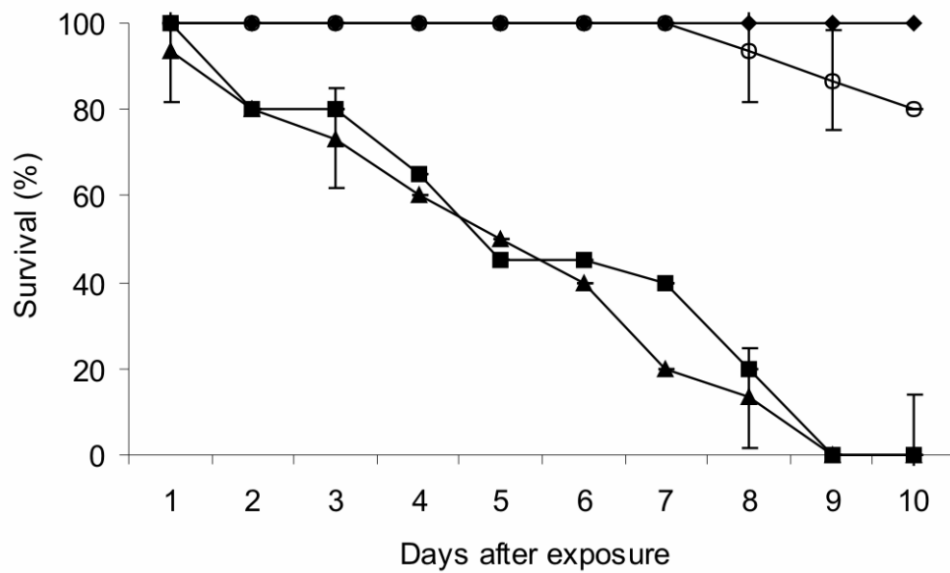


Fig. 3- Scanning electron microscopy (SEM) of *R. microplus* exposed to *M. anisopliae* conidia with different previous treatments. Ss – spore suspension. Ss + ethanol – spore suspension incubated with ethanol. Ss + ebelactone B – spore suspension incubated with ebelactone B at concentration of 2mM.

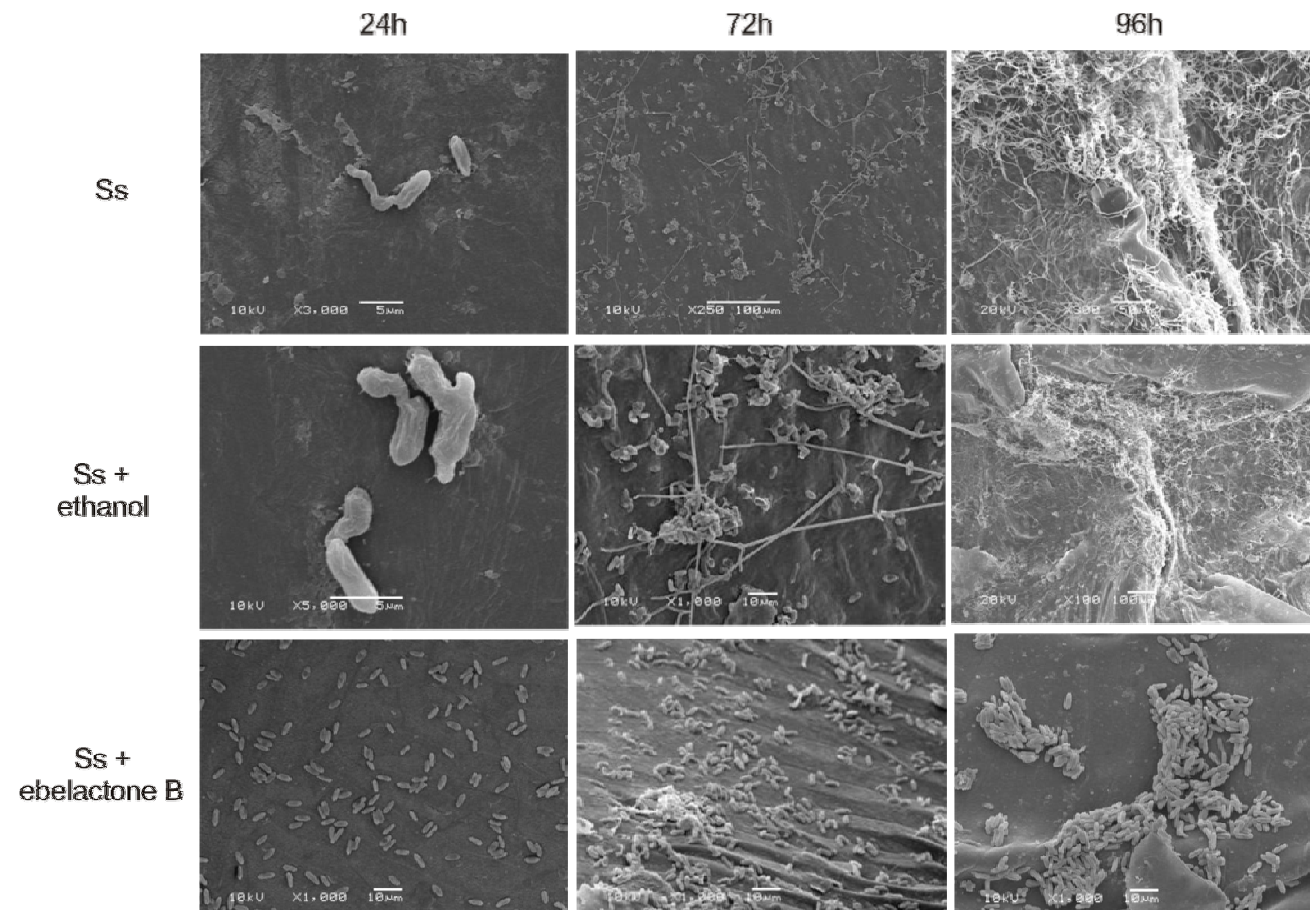
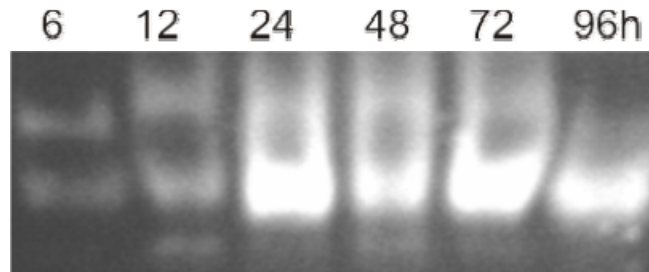


Fig. 4- Lipase activity zymograms of extracts from *R. microplus* exposed to *M. anisopliae* conidia. Activity was revealed by MUF-butyrate after native electrophoresis.

Gels were loaded with 10  $\mu$ g of protein.



#### 4. DISCUSSÃO

Os fungos patogênicos constituem um importante grupo de microrganismos com muitos e diferentes fatores de virulência e estratégias para exercer sua patogenicidade. Considerando a aplicação de fungos patogênicos de artrópodes, a elucidação de seus determinantes de patogenicidade, fatores de virulência e mecanismos infecciosos é um passo importante para melhorar sua eficiência. Além disso, a descoberta de novas pragas suscetíveis à infecção é de extrema relevância para o crescimento do controle biológico como prática e também em futuros estudos do mecanismo de ação dos agentes biocontroladores.

A aranha marrom *Loxosceles* sp. é uma praga urbana de grande impacto na saúde pública mundial (SILVA et al. 2004). Como agente causador do loxoscelismo tem impacto mundial e áreas críticas de incidência com milhares de acidentes por ano, como descrito para a cidade de Curitiba, estado do Paraná (MALAQUE et al. 2002). Neste trabalho, comprovamos a eficiência de *M. anisopliae* no controle de indivíduos juvenis e adultos de aranha marrom. Atualmente, as poucas alternativas químicas para o controle de aranhas não são específicas. O alcance e a possibilidades de um biocontrolador têm grande potencial em futuras políticas sanitárias públicas, visando a diminuição populacional desta praga e, conseqüentemente, do loxoscelismo em regiões urbanas. Além da importância de inserir este fungo como potencial biocontrolador desta praga surge, a partir deste trabalho, um novo modelo aracnídeo para o estudo de *M. anisopliae* e seu sistema de infecção.

Diversos estudos têm ratificado a importância de quitinases e proteases durante o processo de infecção de *M. anisopliae* (DUTRA et al. 2004; FREIMOSER et al. 2005; SILVA et al. 2005; BARATTO et al. 2006; QAZI & KHACHATOURIANS, 2007). Porém, lipases são muito pouco investigadas neste sistema de infecção, apesar de estudos atuais demonstrarem cada vez mais a importância destas enzimas em outros sistemas de diversos patógenos microbianos (ETZ et al. 2002; STEHR et al. 2003; VOIGT et al. 2005; BRADY et al. 2006; COENYE et al. 2007; GACSER et al. 2007a; MULLEN et al. 2007; CÔTES et al. 2008). Contrariamente ao que foi relatado anteriormente por ST LEGER et al. (1986a) e FREIMOSER et al. (2005), as lipases não são a última classe de depolimerases secretadas na cutícula do hospedeiro, sendo detectada sua atividade já em 6 horas de infecção e até mesmo na superfície do esporo. Esta atividade lipolítica presente na superfície do esporo pode estar relacionada com o desencadeamento de todo o processo de infecção, como já foi relatado em outros fungos filamentosos, fitopatogênicos, com um sistema infectivo evolutivamente próximo ao sistema de infecção de *M. anisopliae* (COMMENIL et al. 1998; BERTO et al. 1999).

Em microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, a secreção de enzimas é uma estratégia utilizada para degradação de substratos complexos não assimiláveis, liberando moléculas mais simples utilizadas nutricionalmente e importantes para o desenvolvimento e disseminação das células microbianas. Enzimas secretadas no meio extracelular podem desempenhar diversas funções relacionadas com a degradação de macromoléculas que podem liberar nutrientes metabolizáveis,

auxiliar na penetração da cutícula do hospedeiro em processos patogênicos (ST LEGER et al. 1991b) e degradação de compostos tóxicos. Muitos trabalhos vêm apresentando estudos de regulação da secreção de hidrolases em microrganismos e, em *M. anisopliae*, já foram publicados alguns trabalhos relacionados a proteases e quitinases (ST LEGER et al. 1986a, 1986b; KRIEGER DE MORAES et al. 2003; SILVA et al. 2005). O estudo da regulação de lipases é extremamente relevante e permite entender e associar mecanismos de indução e relações ecológicas dos microrganismos tais como interação com o hospedeiro. Visualizamos diferenças de indução entre diversas fontes de carbono na atividade lipolítica frente a diferentes substratos. Com os diferentes substratos pNP-ésteres utilizados, foram detectadas atividades de lipase ou lipase/esterase (pNP-butirato) maiores nos meios contendo os constituintes do tegumento de artrópodes, quitina e estereato de colesteril. Este lipídeo, um éster formado a partir de colesterol e ácido esteárico, é característico de células animais. As maiores induções de atividade lipolítica ocasionadas pelo lipídeo animal, comparativamente a outra fonte lipídica testada, óleo de oliva, inclusive em valores de atividade específica e principalmente quando combinada com quitina, destacam um fácil reconhecimento destes substratos pelo fungo. Além disso, o melhor desenvolvimento de *M. anisopliae* frente a estes compostos específicos reforça esta idéia, de fácil reconhecimento e metabolização destes compostos presentes no tegumento de seus hospedeiros. Como descrito em muitos trabalhos, o óleo de oliva é uma fonte lipídica usualmente aplicada na indução de altos níveis de atividade lipolítica em fungos (SHIRAZI et al. 1998; MAIA et al. 1999; LEE et al. 2009), o que reforça nossa hipótese de

relevância da especificidade que *M. anisopliae* possa ter por este lipídeo específico, o estereato de colesteril. A glicose parece não ter exercido influência significativa na indução ou repressão da atividade de lipase ao contrário do que é visto para quitinases (KRIEGER DE MORAES et al. 2003; BARRETO et al. 2004).

O sinergismo das enzimas envolvidas na infecção para degradar a cutícula do hospedeiro reportado para proteases e quitinases (ST LEGER et al. 1987, 1993, 1996b, 1998) pode agora, de acordo com este trabalho, ser complementado com as lipases. A atividade de protease foi significativamente maior também nos meios onde se encontravam os dois constituintes específicos do tegumento dos hospedeiros de *M. anisopliae*. O vasto repertório de enzimas lipolíticas evidenciado nos zimogramas podem direcionar a especificidade por determinados hospedeiros e facilitar a degradação de diferentes compostos lipídicos. Assim como postulado para a levedura patogênica *C. albicans*, que também possui um extenso repertório de enzimas lipolíticas, o número significativo destas enzimas reflete a flexibilidade de adaptação do patógeno a mudanças ambientais (STEHR et al. 2004) e o habilita para conquistar diferentes ambientes do hospedeiro com diversas constituições, podendo ser um mecanismo adaptativo para colonização (STEHR et al. 2003).

As lipases são enzimas muito particulares pela sua importância fisiológica, potencial biotecnológico e industrial, e também por suas características diferenciais como substratos sobre as quais agem, características estruturais, especificidade, entre outras (JAEGER & EGGERT, 2002; JOSEPH et al. 2008; REIS et al. 2009). Além disso, estas enzimas



variam muito em suas propriedades e de acordo com o microrganismo de origem (SHARMA et al. 2001). Por todas essas particularidades, inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas para purificar lipases (SHARMA et al. 2001). Este trabalho é o primeiro a isolar uma enzima lipolítica de *M. anisopliae*, apesar da importância que estas enzimas têm nos sistemas de infecção microbianos (STEHR et al. 2003). A caracterização desta lipase de esporo indica possíveis características adaptativas às condições ambientais enfrentadas pelo fungo e possivelmente em condições de infecção como temperatura ótima, estabilidade a diferentes pHs e especificidade de substratos. Além disso, lipases associadas à parede de células microbianas em microrganismos patogênicos vêm sendo descobertas e estudadas (BERTO et al. 1999; COMMENIL et al. 1998; SAKINC et al 2007; LUN & BISHAI, 2007) com implicações importantes nos respectivos sistemas de infecção. Uma das grandes perspectivas deste trabalho será produzir anticorpos policlonais contra esta enzima purificada da superfície do esporo de *M. anisopliae* a fim de caracterizar satisfatoriamente sua possível participação na infecção. Diversas análises e experimentos poderão ser desenvolvidos através do uso destes anticorpos como relatado em outros trabalhos (COMMENIL et al. 1998; BERTO et al. 1999; SILVA et al. 2005). A produção não satisfatória de anticorpos pode ter ocorrido por uma possível baixa imunogenicidade desta lipase que necessitaria de doses maiores de antígeno a serem inoculadas nos animais para provocar a resposta esperada. Apesar do reconhecimento da lipase nos *westerns blots*, os outros experimentos realizados com os anticorpos podem ter sido comprometidos devido à baixa concentração dos mesmos. Alternativas para produção de

anticorpos podem ser realizadas através de doses maiores de antígeno a serem inoculadas e a produção em outros modelos animais como camundongos.

Enzimas lipolíticas de diversos microrganismos patogênicos atuam de inúmeras maneiras na infecção e têm sua síntese regulada durante este processo (STEHR et al. 2004; SCHOFIELD et al. 2005). Como lipídeos formam a camada mais externa e protetora da epicutícula dos artrópodes, um papel imputado para enzimas lipolíticas é o aumento da adesão à superfície do hospedeiro no estágio inicial da infecção (STEHR et al. 2003), como descrito por GÖTTLICH et al. (1995) para a levedura *Hortaea werneckii*, fato este que pode também estar ocorrendo no sistema de infecção de *M. anisopliae*, sendo suportado pela atividade de lipase presente na superfície do esporo e também em estágios iniciais da exposição dos carrapatos aos conídios.

Embora a expressiva importância das lipases já tenha sido descrita para diversos microrganismos patogênicos (STEHR et al. 2003), este é o primeiro relato de que a inibição da atividade lipolítica tenha prevenido a infecção de um hospedeiro artrópode por um fungo patogênico. Na exposição de *R. microplus* aos esporos de *M. anisopliae*, mostramos a detecção de atividade lipolítica já em 6 h e acompanhamos o aumento desta atividade com o progresso da colonização do hospedeiro, o que reforça a importância destas enzimas neste sistema de infecção. Além disso, visualizamos diferentes bandas de atividade durante este processo. O tratamento dos esporos com o inibidor específico de lipase ebelactona B, não só inibiu completamente a atividade lipolítica durante todo o bioensaio, como também

preveni a colonização do hospedeiro e o efetivo controle. Este resultado é extremamente relevante e está de acordo com vários relatos em outros sistemas de infecção, onde este tipo de atividade é importante e, às vezes, fundamental (KOLLER et al. 1990; FRANCIS et al. 1996; COMMENIL et al. 1998; BERTO et al. 1999; DAVIES et al. 2000; VOIGT et al. 2005; GACSER et al. 2007b).

Uma das grandes dificuldades de se estudar a participação de lipases nos sistemas de infecção em artrópodes é a ausência de trabalhos nesta área. Outros sistemas vêm sendo muito bem estudados (BERTO et al. 1999; STEHR et al. 2003; VOIGT et al. 2005; GACSER et al. 2007b). Porém, não existem muitas técnicas ou metodologias disponíveis para detecção de atividade lipolítica durante o processo de infecção como aplicado neste trabalho. Além disso, apesar da potencial importância destas enzimas no processo de infecção de artrópodes e obviamente em *M. anisopliae*, o primeiro trabalho específico sobre estas enzimas foi publicado por nosso grupo (SILVA et al. 2005). Anteriormente, somente detecções pontuais em meios de cultura e inferências sobre estas enzimas haviam sido relatadas. Neste trabalho, apresentamos o efeito da inibição da atividade de lipase na infecção do carrapato e, desta maneira, comprovamos, pela primeira vez, a real importância desta atividade. Também purificamos e caracterizamos uma lipase de *M. anisopliae*, algo inédito até então. Avanços nesta área são de extrema relevância para o entendimento da participação destas enzimas já comprovada em outros sistemas de infecção e que podem contribuir, no futuro, para a otimização de processos que utilizam microrganismos para o controle biológico de artrópodes.

Por tudo isso, este trabalho visa contribuir na elucidação da participação das lipases no processo de infecção, pouco estudadas em *M. anisopliae*, apesar de estarem já bem caracterizadas em muitos outros sistemas microbianos. A negligência no estudo de lipases e enzimas lipolíticas em fungos (STEHR et al. 2003) ressalta a importância de estudos deste tipo. Nossos resultados ratificam a importância das lipases no processo de infecção e podem contribuir no estudo destas enzimas em outros sistemas ou em estudos futuros, visando seu melhor entendimento em *M. anisopliae*.

## 5. CONCLUSÕES

- *M. anisopliae* é eficiente no controle da aranha marrom *Loxosceles* sp.;
- O constituinte lipídico de células animais, estereato de colesterol, induziu a produção de maiores níveis de atividade lipolítica por *M. anisopliae*, comparado com óleo de oliva;
- A combinação de constituintes do tegumento de artrópodes, como estereato de colesterol e quitina, induziu níveis altos de atividade lipolítica secretadas por *M. anisopliae*;
- O crescimento do fungo foi maior nos meios suplementados com constituintes da cutícula dos hospedeiros de *M. anisopliae*;
- *M. anisopliae* secreta diversas enzimas lipolíticas em cultura líquida;
- A glicose parece não regular a secreção de lipases;
- *M. anisopliae* possui uma lipase de ~66 kDa e pI 5,6 associada à superfície do esporo (MASSL);
- MASSL hidrolisa diversos substratos com cadeias acil curtas e longas e possui certa preferência por substratos com cadeia de ácidos graxos curta;
- MASSL tem maior estabilidade em pHs mais ácidos;
- MASSL tem sua atividade aumentada na presença dos metais  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  e na presença do detergente Triton X-100 e do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol;
- MASSL tem inibição parcial da sua atividade na presença de SDS,  $\text{Mn}^{2+}$ , EDTA e EGTA e total na presença dos inibidores ebelactona B e PMSF e parece não ser afetada por metanol e Tween 80;

- *M. anisopliae* secreta lipases durante o processo de infecção de *R. microplus*, desde os períodos iniciais deste processo até a total colonização do hospedeiro;
- A inibição da atividade lipolítica previne a infecção e efetivo controle do carrapato bovino *R. microplus*;

## 6. PERSPECTIVAS

Otimizar a produção de anticorpos policlonais contra a lipase de superfície de esporo de *M. anisopliae* e realizar experimentos com estes anticorpos a fim de elucidar o papel desta enzima no processo de infecção do hospedeiro.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAYBIO (2009). <http://ajaybio.in/prodbiostop.htm>. 11 de março.
- AKDENIZ S, GREEN JA, STOECKER WV, GOMEZ HF, KEKLIKCI SU. (2007). Diagnosis of loxoscelism in two Turkish patients confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and non-invasive tissue sampling. *Dermatology Online Journal*. 13: 11.
- ALVES SB. (1998). Controle microbiano de insetos. Ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2ª ed., Piracicaba.
- ANDRADE RMG, LOURENÇO WR, TAMBOURGI DV. (2000). Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders. *Journal of Arachnology*. 28: 245-247.
- ANDRADE RMG, OLIVEIRA KC, GIUSTI AL, SILVA WD, TAMBOURGI DV. (1999). Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*. 37: 627-632.
- ANGUS BM. (1996). The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *International Journal of Parasitology*, 26: 1341-1355.
- ARRUDA W, LUBECK I, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* structures during the penetration events leading to the infection of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*. 37: 231-244.
- ARRUDA W. (2005). Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. Tese de Doutorado. Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BAGGA S, HU G, SCREEN SE, ST LEGER RJ. (2004). Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 324:159-169.
- BARATTO CM. (2005). Clonagem, regulação e transformação de genes de quitinases do entomopatógeno e acaricida *Metarhizium anisopliae*. Tese de



- Doutorado. Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BARATTO CM, DUTRA V, BOLDO JT, LEIRIA LB, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. (2006). Isolation, characterization and transcriptional analysis of the chitinase *chi2* gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Current Microbiology*, 53: 217-221.
- BARRETO CC, STAATS CC, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2004). Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. *Current Microbiology* 48: 102-107.
- BENOIT JB, LOPEZ-MARTINEZ G, MICHAUD MR, ELNITSKY MA, LEE Jr RE, DENLINGER DL. (2007). Mechanisms to reduce dehydration stress in larvae of the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Journal of Insect Physiology*. 53: 656-667.
- BERTO P, COMMÉNIL P, BELINGHERI L, DEHORTER B. (1999). Occurrence of a lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiology Letters*. 180: 183-189.
- BIDOCHKA MJ, KHACHATOURIANS GG. (1990). Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56: 362-370.
- BIDOCHKA MJ, ST LEGER RJ, ROBERTS WD. (1997). Mechanisms of Deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memoirs of Entomological Society of Canada*. 171: 213-224.
- BIOTROPIC. (2009). <http://www.biotropic.com.mx/productos.htm#>. 11 de março.
- BITTENCOURT VREP, MASSARD CL, LIMA AF. (1994). Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural- Série Ciência da Vida*. 16: 32-38.
- BITTENCOURT SET. (1998). Purificação, caracterização parcial e localização de cobre zinco superóxido dismutase (CnZnSOD) do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Brasília, UnB.
- BITTENCOURT VREP, MASCARENHAS AG, FACCINI JLH. (1999). Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Revista Ciência Rural*. 29: 351-354.

- BITTENCOURT VR. (2000). Trials to control South American ticks with entomopathogenic fungi. *Annals of the New York Academy of Science*. 916: 555-558.
- BITTENCOURT SET, CASTRO LA, FARIAS SE, BAO SN, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2004). Purification and ultrastructural localization of a copper–zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae*. *Research in Microbiology*. 155: 681-687.
- BOGO MR, ROTA CA, PINTO H, OCAMPOS M, CORREA CT, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. (1998). A chitinase encoding gene (chit1 gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology*. 37: 221-225.
- BORNSCHEUER UT, BESSLER C, SRIVINAS R, KRISHNA SH. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*. 20: 433-437.
- BRADY RA, LEID JG, CAMPER AK, COSTERTON JW, SHIFTLIFF ME. (2006). Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. *Infection and Immunity*. 74: 3415-3426.
- BUCZEK A. (1999). Physiology of ticks (Ixodida) in non-parasitic phase of life cycle. *Wiad Parazytology*. 45: 151-159.
- CASTRO ABA, BITTENCOURT VREP, DAEMON E, et al. (1997). Eficácia *in vivo* do fungo *Metarhizium anisopliae* (isolado 959) sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Revista Universidade Rural*. 19: 73-82.
- CLARKSON JM, CHARNLEY AK. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*. 4: 197-204.
- COENYE T, PEETERS E, NELIS HJ. (2007). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Research in Microbiology*. 158: 386-392.
- COLE SCJ, CHARNLEY AK, COOPER RM. (1993). Purification and partial characterisation of a novel trypsin-like cysteine proteinase from *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 113: 189-196.

- COMMENIL P, BELINGHERI L, DEHORTER B. (1998). Anti-lipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 52: 1-14.
- CONTROL BIOLÓGICO (2009). <http://www.controlbiologico.com/productos.htm>. 11 de março.
- CORREIA ACB, FIORIN AC, MONTEIRO AC, VERÍSSIMO CJ. (1998). Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71: 189-191.
- COSTA M, SARQUIS MIM, BITTENCOURT VREP. (2002). Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro state, Brazil. *Mycopathologia*. 154: 207-209.
- CÔTES K, BAKALA N'GOMA JC, DHOUIB R, DOUCHET I, MAURIN D, CARRIERE F, CANAAN S. (2008). Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78: 741-749.
- DAVIES KA, DE LORONO I, FOSTER SJ, LI D, JOHNSTONE K, ASHBY AM. (2000). Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57: 63-75.
- de LA CRUZ J, HIDALGO-GALLEGO A, MLORA J, BENITEZ T, PINTOR-TORO JA, LLOBELL A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry*. 206: 859-867.
- DONG C, ZHANG J, HUANG H, CHEN W, HU Y. (2007). Pathogenicity of a new China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) to subterranean termite *Odontotermes formosanus*. *Microbiological Research*, 162: 53-61.
- DRIVER F, MILNER RJ, TRUEMAN JWH. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*. 104: 134-150.
- DUTRA V, NAKAZATO L, BROETTO L, SCHRANK IS, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. (2004). Application of representational difference analysis to identify sequence tags expressed by *Metarhizium anisopliae* during the

- infection of the tick *Boophilus microplus* cuticle. Research in Microbiology. 155: 245-251.
- ESTRADA-PEÑA A, GARCÍA Z, SÁNCHEZ HF. (2006). The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. Experimental and Applied Acarology, 38: 307-316.
- ETZ H, MINH DB, HENICS T, DRYLA A, WINKLER B, TRISKA C, BOYD AP, SOLLNER J, SCHMIDT W, von AHSEN et al. (2002). Identification of *in vivo* expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. PNAS. 99: 6573–6578.
- EVANS DE, MARTINS JR, GUGLIELMONE AA. (2000). A review of the ticks (Acari: Ixodidae) of Brazil, their hosts and geographic distribution: the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95: 453-470.
- FANG W, LENG B, XIAO Y, JIN K, MA J, FAN Y, FENG J, YANG X, ZHANG Y, PEI P. (2005). Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bchit1* and its application to improve fungal strain virulence. Applied and Environmental Microbiology. 71: 363-370.
- FANG W, PEI Y, BIDOCHKA MJ. (2007). 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, 153: 1017-1025.
- FARENHORST M, FARINA D, SCHOLTE EJ, TAKKEN W, HUNT RH, COETZEE M, KNOLS BG. (2008). African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles funestus*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 78: 910-916.
- FARIA MR, WRAIGHT SP. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control. 43: 237-256.
- FERNANDES EK, COSTA GL, MORAES AM, BITTENCOURT VR. (2004). Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Basic Microbiology. 44: 270-274.

- FERNANDEZ FB. (2000). The employment of biological and non-chemical alternatives for insect plague control in sugarcane crops in Costa Rica. *International Sugar Journal*. 102: 482-490.
- FISHER ML. (1996). *Biologia e ecologia de Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão, 1934) (Aranae: Sicariidae) no município de Curitiba, Paraná. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Zoologia, setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná (Curitiba).
- FRANCETIC O, BADAUT C, RIMSKY S, PUGSLEY AP. (2000). The ChiA (YheB) protein of *Escherichia coli* K-12 is an endochitinase whose gene is negatively controlled by the nucleoid-structuring protein H-NS. *Molecular Microbiology*. 35: 1506-1517.
- FRANCIS SA, DEWEY FM, GURR SJ. (1996). The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 49: 201-211.
- FRAZZON APG, VAZ Jr. IVS, MASUDA A, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2000). *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 93: 117-125.
- FREIMOSER FM, SCREEN S, BAGGA S, HU G, ST LEGER RJ. (2003). Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*. 149: 239-247.
- FREIMOSER FM, HU G, ST LEGER RJ. (2005). Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation *in vitro*. *Microbiology*. 151: 361-371.
- FURBEE RB, KAO LW, IBRAHIM D. (2006). Brown recluse spider envenomation. *Clinical Laboratory Medicine*. 26: 211-226.
- FURLONG J, CHAGAS ACS, NASCIMENTO CB. (2002). Comportamento e ecologia de larvas do carrapato *B. microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, 39: 213-217.
- FUTRELL J. (1992). Loxoscelism. *American Journal of Medical Science*. 304: 261-267.

- GACSER A, STEHR F, KROGER C, KREDICS L, SCHAFER W, NOSANCHUK JD. (2007a). Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*. 75: 4710-4718.
- GACSER A, SCHÄFER W, NOSANCHUK JS, SALOMON S, NOSANCHUK JD. (2007b). Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genetics and Biology*. 44: 1336-1341.
- GILFILLAN GD, SULLIVAN DJ, HAYNES K, PARKINSON T, COLEMAN DC, GOW NA. (1998). *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology*. 144: 829-838.
- GILLESPIE JP, BATERMAN R, CHANRLEY K. (1998). Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium anisopliae* spp. For the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71: 128-137.
- GIMÉNEZ-PECCI MP, BOGO MR, SANTI L, MORAES CK, CORRÊA CT, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. (2002). Characterization of mycoviruses and analyses of chitinases secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*. 45: 334-339.
- GONZALEZ-ACUÑA D, GUGLIELMONE AA. (2005). Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae: Ixodidae) of Chile. *Experimental and Applied Acarology*, 35: 147-163.
- GÖTTLICH E, HOOG GS, YOSHIDA S, TAKEO K, NISHIMURA K, MIYAJI M. (1995). Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. *Mycosis*. 38: 489-494.
- GRISI L, MASSARD C, MOYA BORJA GE, PEREIRA JB. (2002). Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, 21: 8-10.
- GRONVOLD J, HENRIKSEN SA, LARSEN M, NANSEN P, WOLSTRUP, J. (1996). Biological control. Aspects of biological control – with special reference to arthropods, protozoans and helminthes of domesticated animals. *Veterinary Parasitology*. 64: 47-64.
- HACKMAN RH, FILSHIE BK. (1982). The tick cuticle. In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Ed.). *Physiology of ticks – Current themes in tropical science*, vol. I. Pergamon Press, New York.

- HASSAN A, CHARNLEY AK. (1989). Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through dimilin-affected cuticle of *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 54: 117-124.
- HOGAN CJ, BARBARO KC, WINKEL K. (2004). Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Annals of Emergency Medicine*. 44: 608-624.
- HOOGSTRAAL H. (1985). Argasid and nuttallid ticks as parasites and vectors. *Advance Parasitology*, 1: 135-238.
- HOWART FG. (1996). Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review in Entomology*. 36: 485-509.
- HSIAO YM, KO JL. (2001). Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. *Toxicon*. 39: 837-841.
- HU G, ST LEGER RJ. (2004). A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *Journal of Evolutionary Biology*. 17: 1204-1214.
- HUXHAM IM, SAMUELS KDL, HEALE JB, McCORKINDALE NJ. (1989). *In vivo* and *in vitro* assays for pathogenicity of wild-type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae* for three insect species. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53: 143-151.
- JAEGER KE, DIJKSTRA BW, REETZ MT. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications. *Annual Review of Microbiology*. 53: 315-351.
- JAEGER KE, EGGERT T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 390-397.
- JAPPE U. (2003). Pathological mechanisms of acne with special emphasis on *Propionibacterium acnes* and related therapy. *Acta Dermatato-Venereologica*. 83: 241-248.
- JOSEPH B, RAMTEKE PW, THOMAS G. (2008). Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*. 26: 457-470.
- JOSHI L, ST LEGER RJ, ROBERTS DW. (1997). Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using differential display-RT-PCR. *Gene*. 197: 1-8.

- JOSHI L, ST LEGER RJ. (1999). Cloning, expression, and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 9803-9811.
- JUAREZ MP, CRESPO R., FERNANDEZ GC, LEUCONA R, CAFFERATA LF. (2000) Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a chagas disease vector. *Journal of Invertebrate Pathology*. 76: 198-207.
- KAAYA GP, MUNYINI DM. (1995). Biocontrol potential of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology*. 66: 237-241.
- KAAYA GP, MWANGI EN, OUNA EA. (1996). Prospects for biological control of liverstock tick *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 67: 15-20.
- KANG SC, PARK S, LEE DG. (1998). Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 165: 267-271.
- KANGA LH, JONES WA, JAMES RR. (2003). Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*. 96: 1091-9.
- KERSHAW MJ, MOORHOUSE ER, BATEMAN R, REYNOLDS SE, CHARNLEY AK. (1999). The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74: 213-223.
- KISHMOTO K, NISHIZAWA Y, Tabei Y, HIBI T, NAKAJIMA M, AKUTSU K. (2002). Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Science*. 162: 655-662.
- KÖLLER W, TRAIL F, PARKER DM. (1990). Ebelactones inhibit cutinases produced by fungal plant pathogens. *The Journal of Antibiotics*. 43: 734-735.



- KÖNIG B, JAEGER KE, SAGE AE, VASIL ML, KÖNIG W. (1996). Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infection and Immunity*. 64: 3252-3258.
- KRIEGER DE MORAES C, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2003). Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*. 46: 205-210.
- KUCERA M. (1980). Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* for *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 35: 304-310.
- LAZZARINI GMJ, ROCHA LFN, LUZ C. (2006). Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycological Research*. 110: 485-492.
- LEAL AT, FREITAS DRJ, VAZ JR IS. (2003). Perspectivas para o controle do carrapato bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, 31: 1-11.
- LEE JH, KWON CH, KANG JW, PARK C, TAE B, KIM SW. (2009). Biodiesel production from various oils under supercritical fluid conditions by *Candida antartica* lipase B using a stepwise reaction method. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. DOI 10.1007/s12010-008-8488-5.
- LIU ZY, LIANG ZQ, WHALLEY AJ, YAO YJ, LIU AY. (2001). *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78: 178-182.
- LIU H, SKINNER M, PARKER BL, BROWNBRIDGE M. (2002). Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*. 95: 675-681.
- LONGSHAW CM, FARRELL AM, WRIGHT JD, HOLLAND KT. (2000). Identification of a second lipase gene, *gehD*, in *Staphylococcus epidermidis*: comparison of sequence with those of other staphylococcal lipases. *Microbiology*. 146: 1419-1427.
- LORD JC, HOWARD RW. (2004). A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia*, 158: 211-217.

- LUBECK I, ARRUDA W, SOUZA BK, STANISÇUASKI F, CARLINI CR, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2008). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* *Dysdercus peruvianus*. Fungal Ecology 1: 78-88.
- LUN S, BISHAI WR. (2007). Characterization of a novel cell wall-anchored protein with carboxylesterase activity required for virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Biological Chemistry. 282: 18348-18356.
- MAIA MMD, MORAIS MMC, MORAIS Jr MA, MELO EHM, LIMA FILHO JL. (1999). Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. Revista de Microbiologia. 30: 304-309.
- MALAUQUE CMS, CASTRO-VALENCIA JE, CARDOSO JLC, FRANÇA FOS, BARBARO KC, FAN HW. (2002). Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 44: 139-143.
- MARANINNO P, SANTIAGO-ÁLVAREZ C, LILLO E, QUESADA-MORAGA E. (2006) A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). Journal of Invertebrate Pathology. 93: 210-213.
- MARQUES EJ, VILLAS-BOAS AM, PEREIRA CEF. (1981). Orientações técnicas para a produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Em laboratórios setoriais. PLANALSUCAR, Boletim técnico n.3. 5-23.
- MARQUES DA SILVA E, FISHER ML. (2005). Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Aranae: Sicariidae) no estado do Paraná. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 38: 331-335.
- MELO IS, AZEVEDO JL. (1998). Controle Biológico, volume I. Ed. EMBRAPA, 262p.
- MILNER RJ. (2000). Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. Biocontrol. 21: 47-50.
- MISKIN JE, FARREL AM, CONLIFFE WJ, HOLLAND KT. (1997). *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. Microbiology. 143: 1745-1755.

- MONTEIRO FA, COSTA J, SOLE-CAVA AM. (1998). Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petrochii* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 92: 897-900.
- MULLEN T, MARKEY K, MURPHY P, McCLEAN S, GALLAGHAN M. (2007). Role of lipase in *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) invasion of lung epithelial cells. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease*. 26: 869-877.
- NAHAR P, GHORMADE V, DESHPANDE MV. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85: 80-88.
- NATURAL RURAL (2009). <http://www.naturalrural.com.br/#>. 11 de março.
- ONOFRE SB, MINIUK CM, BARROS NM, AZEVEDO JL. (2001). Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *American Journal of Veterinary Research*. 62: 1478-1480.
- PAL S, ST LEGER RJ, WU LP. (2007). Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 8969-8977.
- PAPAVASSILIS C, MACH KK, MAYSER PA. (1999). Medium-chain triglycerides inhibit growth of *Malassezia*: implications for prevention of systemic infection. *Critical Care Medicine* 27: 1781-1786.
- PEDRINI N, CRESPO R, JUAREZ MP. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part C, 146: 124-137.
- PINTO AS, BARRETO CC, SCHRANK A, ULHOA CJ, VAINSTEIN MH. (1997). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 322-327.
- QAZI SS, KHACHATOURIANS GG. (2007). Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 48-59.
- QUESADA-MORAGA E, SANTOS-QUIRÓS R, VALVERDE-GARCÍA P, SANTIAGO-ÁLVAREZ C. (2004). Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on

- the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 87: 51-58.
- RECK Jr J, BERGER M, TERRA RMS, MARKS FS, DA SILVA VAZ Jr I, GUIMARAES JA, TERMIGNONI C. (2009). Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Research in Veterinary Science*. 86: 56-62.
- REETZ MT. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6:145-150.
- REINA-PINTO JJ, YEPHREMOV. (2009). Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry*. In press
- REIS P, HOLMBERG K, WATZKE H, LESER ME, MILLER R. (2009). Lipases at interfaces: a review. *Advances in Colloidal and Interface Science*. 147-148: 237-250.
- ROBERT A, AL AIDROOS KM. (1985). Acid production by *Metarhizium anisopliae*: Effects on virulence against mosquitoes and on detection of in vitro amylase, protease, and lipase activity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 45: 9-15.
- ROLLOF J, HEDSTROM SA, NILSSON-EHLE P. (1987). Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* strain from disseminated and localized infections. *Acta Pathologica et Microbiologica Immunologica Scandinavica section B*. 95: 109-113.
- ROLLOF J, BRACONIER JH, SODERSTROM C, NILSSON-EHLE P. (1988). Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *European Journal of Clinical Microbiological and Infection Disease*. 7: 505-510.
- RYDING U, RENNEBERG J, ROLLOF J, CHRISTENSSON B. (1992). Antibody response to *Staphylococcus aureus* whole cell, lipase and staphylolysin in patients with *S. aureus* infections. *FEMS Microbiology and Immunology*. 4: 105-110.
- SAKINC T, KLEINE B, GATERMANN SG. (2007). Biochemical characterization of the surface-associated lipase of *Staphylococcus saprophyticus*. *FEMS Microbiology Letters*. 274: 335-341.
- SANDIDGE JS. (2003). Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. *Nature*. 426: 30.

- SASAKI SD, LIMA CA, LOVATO DV, JULIANO MA, TORQUATO RJS, TANAKA AS. (2008). BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from *Boophilus microplus*, with activity toward Pr1 proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Parasitology*, 118: 214-220.
- SAXENA RK, GHOSH PK, GUPTA R, DAVIDSON WS, BRADDOO S, GULATI R. (1999). Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*. 77: 101-115.
- SCHOFIELD DA, WESTWATER C, WARNER T, BALISH E. (2005). A differential *Candida albicans* lipase gene expression during alimentary tract colonization and infection. *FEMS Microbiology Letters*. 244: 359-365.
- SCHOLTE E, NJIRU BN, SMALLEGANGE RC, TAKKEN W, KNOLS BGJ. (2005). Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*. 2: 1-8.
- SCHOLTE EJ, TAKKEN W, KNOLS BGJ. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102: 151-158.
- SCHRANK A, BASSANESI MC, PINTO Jr H, COSTA SV, BOGO M, SILVA MSN. (1993). Superoxide dismutases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Ciência e Cultura*. 45: 200-205.
- SCREEN SE, HU G, ST LEGER RJ. (2001). Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acridum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78: 260-266.
- SEZERINO UM, ZANNIN M, COELHO LK, GONÇALVES J, GRANDO M, MATTOSINHO SG, CARDOSO JLC, EICKSTEDT VR, FRANÇA FOS, BARBARO KC, FAN HW. (1998). A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 92: 546-548.
- SHAH PA, PELL JK. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 413-423.
- SHAH J. (2005). Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 229-260.

- SHAPIRO-ILAN DI, FUXA JR, LACEY LA, ONSTAD DW, KAYA HK. (2005). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88: 1-7.
- SHARMA R, CHISTI Y, BANERJEE UC. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 19: 627-662.
- SHERLOCK IA, GUITTON N. (1982). Observações sobre a ação do fungo *Metarhizium anisopliae* Metsch. sobre algumas espécies de Triatomidae (Hemiptera, Reduviidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 24: 234-39.
- SHIRAZI SH, RAHMAN SR, RAHMAN MM. (1998). Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 595-597.
- SILVA EM. (2002). Loxoscelismo no Estado do Paraná: Análise Epidemiológica dos Acidentes Causados por *Loxosceles* Heinecken & Lowe, 1832 no período de 1993 a 2000. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Ciências – saúde pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.
- SILVA JC, MESSIAS CL. (1986). Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48: 368-74.
- SILVA MV, SANTI L, STAATS CC, COSTA AM, COLODEL EM, DRIEMEIER D, VAINSTEIN MH, SCHRANK A. (2005). Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the chi3 gene. *Research in Microbiology*. 156: 382-392.
- SILVA PH, SILVEIRA RB, APPEL MH, MANGILI OC, GREMSKI W, VEIGA SS. (2004). Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*. 44: 683-709.
- SILVA WOB, MITIDIERI S, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. 40: 321-326.
- SILVA WOB. (2005). Lipases de *Metarhizium anisopliae*: purificação parcial, regulação e secreção durante o processo de infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- SMITHSON SL, PATERSON IC, BAILEY AM, SCREEN SE, HUNT BA, COBB BD, COOPER RM, CHARNLEY AK, CLARKSON JM. (1995). Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 166: 161-165.
- STEHR F, KRETSCHMAR M, KROGER C, HUBE B, SCHAFFER W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme*. 22: 347-355.
- STEHR F, FELK A, GÁCSER A, KRETSCHMAR M, MAHN B, NEUBER K, HUBE B, SCHAFFER W. (2004). Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Research*. 4: 401-408.
- ST LEGER RJ, COOPER RM, CHARNLEY AK. (1986a). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48: 85-95.
- ST LEGER RJ, COOPER RM, CHARNLEY AK. (1986b). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology*. 132: 1509-1517.
- ST LEGER RJ, CHARNLEY AK, COOPER RM. (1987). Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 253: 221-232.
- ST LEGER RJ, BUTT TM, STAPLES RC, ROBERTS DW. (1990). Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of General Microbiology*. 136: 1779-1789.
- ST LEGER RJ, COOPER RM, CHARNLEY AK. (1991a). Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58: 415-426.
- ST LEGER RJ, GOETTEL MS, ROBERTS DW, STAPLES RC. (1991b). Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58: 168-179.
- ST LEGER RJ, STAPLES RC, ROBERTS DW. (1992). Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 120: 119-124.

- ST LEGER RJ, COOPER RM, CHARNLEY AK. (1993). Analysis of aminopeptidase and dipeptidylpeptidase IV from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of General Microbiology*. 139: 237-243.
- ST LEGER RJ, BIDOCHKA MJ, ROBERTS DW. (1994a). Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 313: 1-7.
- ST LEGER RJ, BIDOCHKA MJ, ROBERTS DW. (1994b). Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 314: 392-398.
- ST LEGER RL, JOSHI L, BIDOCHKA MJ, ROBERTS DW. (1996a). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *PNAS*. 93: 6349-6354.
- ST LEGER RL, JOSHI L, BIDOCHKA MJ, RIZZO NW, ROBERTS DW. (1996b). Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1257-1264.
- ST LEGER RJ, JOSHI L, ROBERTS DW. (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 709-713.
- ST LEGER RJ. (2008). Studies on adaptation of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 271-276.
- SWANSON DL, VETTER RS. (2006). *Loxoscelism*. *Clinics in Dermatology*. 24: 213-221.
- TIAGO PV, FUNGARO MH, FARIA MR, FURLANETO MC. (2004). Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on protease activities, conidia production, and virulence. *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 335-339.
- TOLEDO AV, DE REMES LENICOV AM, LOPEZ LASTRA CC. (2007). Pathogenicity of fungal isolates (Ascomycota: Hypocreales) against *Peregrinus maidis*, *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae), and



- Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of corn disease. *Mycopathologia*. 163: 225-232.
- TULLOCH M. (1976). The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*. 66: 407-411.
- UEDA M, TAKAHASHI S, WASHIDA M, SHIRAGA S, TANAKA A. (2002). Expression of *Rhizopus oryzae* lipase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymology*. 17: 113-124.
- ULHOA CJ, PEBERDY JF. (1991). Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*. 137: 2163-2169.
- ULHOA CJ, PEBERDY JF. (1993). Effect of carbon source on chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research*. 97: 45-48.
- UPPENBERG J, PATKAR S, BERGFORS T, JONES TA. (1994a). Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida Antarctica*. *Journal of Molecular Biology*. 235: 790-792.
- UPPENBERG J, HANSEN MT, PATKAR S, JONES TA. (1994b). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*. *Structure*. 2: 293-308.
- VETTER RS, VISSCHER PK. (1998). Bites and stings of medically important venomous arthropods. *International Journal of Dermatology*. 37: 481-496.
- VOET D, VOET JG, PRATT CW. (2000). *Fundamentos de Bioquímica*. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre.
- VOIGT CA, SCHAFER W, SALOMON S. (2005). A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal*. 42: 364-375.
- WANG C, TYPAS MA, BUTT TM. (2002). Detection and characterization of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 213: 251-255.
- WANG C, SKROBEK A, BUTT TM. (2003). Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85: 168-174.
- WANG C, ST LEGER RJ. (2005). Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryotic Cell*, 4: 937-947.

- WANG C, ST LEGER RJ. (2007a). 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*, 6: 808-816.
- WANG C, ST LEGER RJ. (2007b). The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 21110-21115.
- WRIGHT C, BROOKS A, WALL R. (2004). Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Pest Management Science*. 60: 639-44.
- ZHIOUA E, BOWING M, JONHSON PW, GINSESBERG HS, LEBRUM RA. (1997). Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology*. 83: 815-818.

**ANEXO *Curriculum Vitae***

**Walter Orlando Beys da Silva**

Curriculum Vitae

Junho/2009

## Walter Orlando Beys da Silva

Curriculum Vitae

---

### Dados Pessoais

**Nome** Walter Orlando Beys da Silva  
**Filiação** Antônio Orlando da Silva e Rejane Elisa Beys da Silva  
**Nascimento** 28/10/1980 - Porto Alegre/RS - Brasil

---

### Formação Acadêmica/Titulação

- 2009** Pós-Doutorado.  
Laboratório de Bioquímica Farmacológica - Centro de Biotecnologia / UFRGS, UFRGS, Brasil
- 2005 - 2009** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: O complexo lipolítico de *Metarhizium anisopliae* e sua relação com o processo de infecção de hospedeiros artrópodes, Ano de obtenção: 2009  
Orientador: Marilene Henning Vainstein  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2004 - 2005** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: LIPASES DE *Metarhizium anisopliae*: PURIFICAÇÃO PARCIAL, REGULAÇÃO E SECREÇÃO DURANTE O PROCESSO DE INFECÇÃO DO CARRAPATO BOVINO *Boophilus microplus*, Ano de obtenção: 2005  
Orientador: Marilene Henning Vainstein  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1999 - 2003** Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 1999 - 2003** Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas- enf. Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Lipase: a novel *Metarhizium anisopliae* enzyme. Production and solubilization  
Orientador: Marilene Henning Vainstein  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 

### Formação complementar

- 2000 - 2000** Extensão universitária em Biologia molecular aplicada à clínica.  
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil

<b>2001 - 2001</b>	Curso de curta duração em Expressão de Proteínas Recombinantes em E. coli. Red de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Parasitarias del Cono, RTPD NETWORK, Argentina
<b>2002 - 2002</b>	Extensão universitária em Seminário de Atualidades Genéticas. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC RS, Porto Alegre, Brasil
<b>2004 - 2004</b>	Curso de curta duração em Seqüenciamento e análise de genomas II. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
<b>2007 - 2007</b>	Curso de curta duração em Análise proteômica por espectrometria de massas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

---

## Atuação profissional

### 1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

---

#### Vínculo institucional

<b>2009 - Atual</b>	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Pós-doc, Regime: Dedicção Exclusiva
<b>2005 - 2009</b>	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Bolsista de doutorado, Regime: Dedicção Exclusiva
<b>2004 - 2005</b>	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Bolsista de mestrado, Regime: Dedicção Exclusiva
<b>2001 - 2003</b>	Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: bolsista de iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
<b>2000 - 2001</b>	Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: bolsista de iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

---

#### Atividades

##### **08/2000 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia

###### *Linhas de Pesquisa:*

*Produção, purificação e caracterização de queratinases de Bacillus subtilis aplicadas na indústria do couro , Formulação e análise de detergentes enzimáticos , Produção de enzimas hidrolíticas microbianas para formulação de detergentes enzimáticos , Estudo do complexo lipolítico do fungo entomopatogênico e acaricida Metarhizium anisopliae e sua relação com o processo de infecção do hospedeiro , Impacto do complexo Cryptococcus sobre a hemostasia*

## **Linhas de pesquisa**

1. Estudo do complexo lipolítico do fungo entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae* e sua relação com o processo de infecção do hospedeiro

**Objetivos:**

*Palavras-chave: Metarhizium anisopliae, entomopathogenic fungus, lipase*

*Áreas do conhecimento : Bioquímica dos Microorganismos, Microbiologia Aplicada, Biologia Molecular*

2. Formulação e análise de detergentes enzimáticos

**Objetivos:**

*Palavras-chave: Detergentes, detergentes biodegradáveis, commercial enzymes, Protease, lipase*

*Áreas do conhecimento : Enzimologia*

3. Impacto do complexo *Cryptococcus* sobre a hemostasia

**Objetivos:**

4. Produção de enzimas hidrolíticas microbianas para formulação de detergentes enzimáticos

**Objetivos:**

*Palavras-chave: Detergentes, lipase, Protease, Biorreator, Produção de enzimas, Amilase*

5. Produção, purificação e caracterização de queratinases de *Bacillus subtilis* aplicadas na indústria do couro

**Objetivos:**

*Áreas do conhecimento : Bioquímica dos Microorganismos, Enzimologia, Microbiologia Aplicada*

---

## **Revisor de periódico**

1. **Journal of Food Biochemistry -**

---

**Vínculo**

**2008 - Atual**

---

## **Áreas de atuação**

1. Microbiologia
  2. Enzimologia
  3. Bioquímica dos Microorganismos
  4. Microbiologia Aplicada
  5. Biologia Molecular
- 
-

## Idiomas

<b>Inglês</b>	Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem
<b>Espanhol</b>	Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

---

## Prêmios e títulos

<b>2004</b>	3o lugar na IV Maratona do Empreendedorismo 2004, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>2002</b>	Destaque de seção -XIII Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>2002</b>	Destaque do V Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, ENZITEC 2002- V Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática

## Produção em C, T& A

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. SILVA, WOB, SANTI, Lucélia, BERGER, Markus, Pinto, Antonio F.M., Guimarães, Jorge A., SCHRANK, Augusto, Vainstein, Marilene H.  
Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. , v.44, p.829 - 834, 2009.
2. MACEDO, Alexandre José, SILVA, WOB, TERMIGNONI, Carlos  
Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. *Canadian Journal of Microbiology (Online)*. , v.54, p.180 - 188, 2008.
3. Macedo, A. J., SILVA, WOB, GAVA, Renata, DRIEMEIER, David, HENRIQUES, Joao Antonio Pegas, TERMIGNONI, Carlos  
Novel Keratinase from *Bacillus subtilis* S14 Exhibiting Remarkable Dehairing Capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*. , v.71, p.594 - 596, 2005.
4. SILVA, WOB, MITIDIARI, Sydnei, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry (Cessou em 1990. Cont. c/ outro título e ISSN. Cessou novamente e voltou a ter o título anterior [Process Biochemistry])*. , v.40, p.321 - 326, 2005.

## Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, WOB, SANTI, Lucélia, BERGER, Markus, PINTO, Antônio, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Characterization of spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* In: X Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2008, Porto Alegre.  
**X Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2008. p.27 -
2. SANTI, Lucélia, SILVA, WOB, BERGER, Markus, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Detecção de diferentes atividades enzimáticas de proteínas da superfície do esporo do fungo entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae* In: VIII ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2008, Rio de Janeiro.  
**VIII ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática.** , 2008. p.151 -
3. SANTI, Lucélia, SILVA, WOB, BERGER, Markus, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Enzymatic profile of spore surface proteins from *Metarhizium anisopliae* In: X Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2008, Porto Alegre.  
**X Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2008. p.24 -
4. SILVA, WOB, SANTI, Lucélia, BERGER, Markus, PINTO, Antônio, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Purificação e caracterização de uma lipase de superfície de esporo de *Metarhizium anisopliae* In: VIII ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2008, Rio de Janeiro.  
**VIII ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática.** , 2008. p.152 -
5. SANTI, Lucélia, SILVA, WOB, BERGER, Markus, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Enzymatic profile of spore surface proteins from *Metarhizium anisopliae* In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology and 10th IUBMB conference: “Infection diseases: biochemistry of parasites, vectors and hosts”, 2007, Salvador.  
**XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology and 10th IUBMB conference: “Infection diseases: biochemistry of parasites, vectors and hosts”.** , 2007.
6. SILVA, WOB, BERGER, Markus, SANTI, Lucélia, PINTO, Antônio, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Purification of a spore surface lipase from *Metarhizium anisopliae* In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq/ 10th IUBMB conference: “Infection diseases: biochemistry of parasites, vectors and hosts”, 2007, Salvador.  
**XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology – SBBq/ 10th IUBMB conference: “Infection diseases: biochemistry of parasites, vectors and hosts”.** , 2007.
7. SANTI, Lucélia, SILVA, WOB, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Aplicação de preparados pectinolíticos de *Penicillium oxalicum* na extração de sucos de frutas In: VII ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2006, Caxias do Sul.  
**VII ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática.** , 2006. p.103 -



8. SILVA, WOB, SANTI, Lucélia, BERGER, Markus, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Detecção de diferentes atividades enzimáticas de proteínas da superfície do esporo do fungo entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae* In: VII ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2006, Caxias do Sul.  
**VII ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática.** , 2006. p.60 -
9. SILVA, WOB, SANTI, Lucélia, BERGER, Markus, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Detecção de diferentes atividades enzimáticas de proteínas da superfície do esporo do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* In: . VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2006, Porto Alegre.  
. **VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2006. p.111 -
10. SANTI, Lucélia, SILVA, WOB, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Expressão heteróloga da região C-terminal da protease Pr1C de *Metarhizium anisopliae* em *Escherichia coli* In: . VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2006, Porto Alegre.  
. **VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2006. p.100 -
11. SANTI, Lucélia, SILVA, WOB, STANISÇUASKI, F, CARLINI, CR, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
*Metarhizium anisopliae* como alternativa para o controle do inseto manchador do algodão *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2006, Porto Alegre.  
**VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2006. p.102 - 102
12. SILVA, WOB, BERGER, Markus, SANTI, Lucélia, PINTO, Antônio, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Partial purification of a spore surface lipase from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae* In: . VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2006, Porto Alegre.  
. **VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2006. p.112 -
13. SILVA, WOB, SANTI, Lucélia, BERGER, Markus, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Partial purification of spore surface chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2006, Aguas de Lindoia.  
**XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq.** , 2006.
14. SANTI, Lucélia, SILVA, WOB, BERGER, Markus, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Partial purification of spore surface chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2006, Porto Alegre.  
**VIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2006. p.101 -

15. SILVA, WOB, BERGER, Markus, SANTI, Lucélia, PINTO, Antônio, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
 Partial purification of spore surface lipase from the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae* In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2006, Aguas de Lindoia.  
**XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq.** , 2006.
16. SILVA, WOB, SANTI, Lucélia, CORREA, APF, SILVA, LAD, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
 Atividade lipolítica de *Metarhizium anisopliae* durante o processo de infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus* In: VIII SHEB - Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2005, Maringa.  
**VIII SHEB - Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas.** , 2005. p.145 -
17. SANTI, Lucélia, SILVA, WOB, VAINSTEIN, Marilene Henning  
 Produção de pectinases por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais In: VIII SHEB - Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2005, Maringa.  
**VIII SHEB - Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas.** , 2005. p.169 -
18. SILVA, WOB, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
 Produção e extração de lipase de *Metarhizium anisopliae* In: VIII SHEB - Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2005, Maringa.  
**VIII SHEB - Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas.** , 2005. p.144 -
19. SILVA, WOB, BERGER, Markus, SANTI, Lucélia, PINTO, Antônio, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
 Purificação de uma lipase de superfície de esporo do fungo entomopatogênico e acaricida *Metarhizium anisopliae* In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2005, Porto Alegre.  
**VII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.** , 2005. p.08 -
20. SILVA, WOB, SANTI, Lucélia, CORREA, APF, SILVA, LAD, VAINSTEIN, Marilene Henning  
 Atividade lipolítica de *Metarhizium anisopliae* durante o processo de infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus* In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2004, Porto Alegre.  
**VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2004. p.86 - 86
21. MITIDIERI, Sydney, SILVA, WOB, SILVA, LAD, VAINSTEIN, Marilene Henning  
 Produção de enzimas microbianas para formulação de detergentes: da bancada até a obtenção do produto In: VI ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2004, Rio de Janeiro.  
**VI ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática.** , 2004. p.203 -
22. SILVA, LAD, SILVA, WOB, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
 Produção de *Metarhizium anisopliae* para o controle do carrapato bovino *Boophilus microplus* In: XVI Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre.  
**XVI Salão de Iniciação Científica.** , 2004. p.449 - 449
23. SILVA, LAD, SILVA, WOB, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
 Produção de *Metarhizium anisopliae* para o controle do carrapato bovino *Boophilus microplus* In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2004, Porto Alegre.  
**VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2004. p.18 - 18

24. SANTI, Lucélia, SILVA, WOB, CORREA, APF, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção de pectinases por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2004, Porto Alegre.  
**VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2004. p.78 - 78
25. SILVA, WOB, MITIDIARI, Sydney, SILVA, LAD, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção e extração de lipase de *Metarhizium anisopliae* In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2004, Porto Alegre.  
**VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2004. p.85 - 85
26. SILVA, WOB, MITIDIARI, Sydney, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção e extração de uma lipase extracelular de *Metarhizium anisopliae* In: VI ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2004, Rio de Janeiro.  
**VI ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática.** , 2004. p.178 -
27. SILVA, WOB, MITIDIARI, Sydney, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção e solubilização de lipase de *Metarhizium anisopliae* In: XXIV Reunião de Genética de Microrganismos, 2004, Gramado.  
**XXIV Reunião de Genética de Microrganismos.** , 2004. p.74 -
28. SILVA, WOB, MITIDIARI, Sydney, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção e solubilização de lipase de *Metarhizium anisopliae*. In: V Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS, 2003, Porto Alegre.  
**V Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS.** , 2003. p.65 - 65
29. SILVA, WOB, MITIDIARI, Sydney, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção e solubilização de lipase do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* In: XV Salão de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre.  
**XV Salão de Iniciação Científica.** , 2003. p.401 - 401
30. MACEDO, Alexandre José, SILVA, WOB, TERMIGNONI, Carlos  
*Bacillus subtilis* keratinase with depilating activity and its characterization In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002, Caxambú.  
**XXXI Reunião Anual.** , 2002. p.94 - 94
31. MACEDO, Alexandre José, SILVA, WOB, DRIEMEIER, D., TERMIGNONI, Carlos  
*Bacillus subtilis* keratinase with depilating activity: purification and characterization In: Enzitec - 5. Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2002, Brasília.  
**Enzitec 2002.** , 2002. p.88 - 88
32. MITIDIARI, Sydney, SILVA, WOB, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção de celulase para formulação de detergentes biodegradáveis In: V ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2002, Distrito Federal.  
**V ENZITEC – Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática.** , 2002. p.92 -
33. SILVA, WOB, MITIDIARI, Sydney, CAMASSOLA, Siumar, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção de lipase para formulação de detergentes bioativos In: VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB), 2002, Maringá.  
**VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB).** , 2002. p.142 -
34. SILVA, WOB, MITIDIARI, Sydney, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção de lipase para formulação de detergentes biodegradáveis In: Enzitec - 5. Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2002, Brasília.  
**Enzitec 2002.** , 2002. p.92 - 92

35. CAMASSOLA, Siumar, SILVA, WOB, MITIDIERI, Sydney, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção de protease para formulação de detergentes bioativos In: VII SHEB - Seminário de hidrólise enzimática de biomassas, 2002, Maringá.  
**Livro de resumos do VII SHEB.** , 2002. p.141 - 141
36. CAMASSOLA, Siumar, MITIDIERI, Sydney, SILVA, WOB, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Produção de protease para formulação de detergentes bioativos In: VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB), 2002, Maringa.  
**VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas (SHEB).** , 2002. p.141 -
37. SILVA, WOB, MACEDO, Alexandre José, TERMIGNONI, Carlos  
Purificação parcial de uma queratinase de Bacillus subtilis In: XIII Salão de Iniciação Científica, 2002, Porto Alegre.  
**XIII Salão de Iniciação Científica.** , 2002.
38. SILVA, WOB, MACEDO, Alexandre José, TERMIGNONI, Carlos  
Purification and characterization of keratinase from Bacillus subtilis In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002, Caxambú.  
**XXXI Reunião Anual.** , 2002. p.129 - 129
39. SILVA, WOB, STAATS, C. C., SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Subclonagem e expressão da quitinase Chit42 (chit 1) de Metarhizium anisopliae em Pichia pastoris In: XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, 2002, Pirenópolis.  
**XXIII Reunião de Genética de Microrganismos.** , 2002. p.81 - 81
40. SILVA, WOB, STAATS, C. C., SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
Subclonagem e expressão da quitinase CHIT42 (chit1) de Metarhizium anisopliae em Pichia pastoris In: XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, 2002, Pirenópolis.  
**XXIII Reunião de Genética de Microrganismos.** , 2002. p.81 -
41. MACEDO, Alexandre José, SILVA, WOB, TERMIGNONI, Carlos  
Characterization of a keratinase for use in the tannery industry In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001, Caxambú.  
**XXX Reunião Anual.** , 2001. p.88 - 88
42. SILVA, WOB, MACEDO, Alexandre José, TERMIGNONI, Carlos  
Partial purification of a Bacillus subtilis keratinase In: 3. Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2001, Porto alegre.  
**Livro de Resumos da 3. Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.** Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2001. p.77 - 77
43. SILVA, WOB, MACEDO, Alexandre José, TERMIGNONI, Carlos  
Partial purification of keratinase form Bacillus subtilis In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001, Caxambú.  
**XXX Reunião Anual.** , 2001. p.122 - 122

### **Apresentação de Trabalho**

1. MITIDIERI, Sydney, SILVA, WOB, SILVA, LAD, VAINSTEIN, Marilene Henning  
**Produção de enzimas microbianas para formulação de detergentes: da bancada até a obtenção do produto**, 2004. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
2. SILVA, WOB, SANTI, Lucélia, BERGER, Markus, GUIMARÃES, Jorge Almeida, SCHRANK, Augusto, VAINSTEIN, Marilene Henning  
**Deteção de diferentes atividades enzimáticas de proteínas da superfície do esporo do fungo entomopatogênico e acaricida Metarhizium anisopliae**, 2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

## Orientações e Supervisões

### Orientações e Supervisões concluídas

#### Iniciação científica

1. Fernanda Bresciani. **Produção de lipase por Luteibacter sp.**. 2007. Iniciação científica (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### Orientações e Supervisões em andamento

#### Iniciação científica

1. Gabriel Perotoni. **Isolamento e seleção de bactérias ambientais para o controle biológico associado ao fungo Metarhizium anisopliae do inseto manchador do aglodão Dysdercus peruvianus**. 2008. Iniciação científica (Bacharelado em Ciências Biológicas- enf. Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## Eventos

### Organização de evento

1. SILVA, WOB *et al.*  
**VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - Enzitec**, 2006. (Congresso, Organização de evento)

---

## Totais de produção

### Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico.....	4
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	43
Apresentações de Trabalhos (Conferência ou palestra).....	1
Apresentações de Trabalhos (Congresso).....	1

### Orientações

Orientação concluída (iniciação científica).....	1
Orientação em andamento (iniciação científica).....	1

### Eventos

Organização de evento (congresso).....	1
--	---