

EFEITO DA INFECÇÃO DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA PRESENTE EM INTESTINO DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

(Effect of infection of *Metarhizium anisopliae* on the proteolytic activity present in the intestine of *Rhipicephalus microplus*)

Soraia John da Silva, Cristiane Martins Cardoso, Marta Rafaela dos Santos, Wendell Perinotto, Vânia Bittencourt

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

*Corresponding author: soraiajohndasilva@gmail.com

RESUMO: Este trabalho pretende contribuir para o estudo de formas alternativas de controle de *Rhipicephalus microplus* através do fungo *Metarhizium anisopliae*. Com o objetivo de avaliar o efeito deste fungo sobre a atividade de proteases do carrapato bovino, 80 fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram divididas em grupo controle e grupo de tratamento (48h de tratamento). As fêmeas tratadas foram imersas nas suspensões conidiais e os controles em água destilada estéril acrescida de Tween 80 0,1%. Foi feita a dissecação das fêmeas e os intestinos foram lavados, secos em papel de filtro para a retirada do excesso de líquidos e pesados. Foram então homogeneizados e a concentração protéica foi determinada. A presença da atividade proteolítica em extrato intestinal foi dosada pela hidrólise do substrato protéico hemoglobina e pela quantificação da tirosina. Nos valores de pH 4,0 e 5,0 foi encontrado um aumento da atividade frente o uso do fungo. Nestes valores de pH há presença principalmente de cisteíno e aspártico protease. Ao fazer uso de um inibidor de cisteíno protease (ditiotreitól) houve inibição de 74% e 54% da atividade proteolítica nos grupos tratado e controle, respectivamente. Enquanto isso, o outro inibidor de cisteíno proteases, phenylmethanesulfonyl fluoride, inibiu 86% e 80% da atividade proteolítica em grupos tratado e controle, respectivamente. Foi possível concluir com este estudo que há uma atividade majoritária de cisteíno proteases atuando em intestino de *R. microplus* e que esta atividade pode ser aumentada na presença do fungo entomopatogênico. Este aumento, por sua vez, pode ser decorrente de proteases do fungo ou do mecanismo de defesa do carrapato, o que sugere que *M. anisopliae* pode vir a ser uma forma de controle eficaz para este carrapato.

Palavras chave: controle biológico, fungo entomopatogênico, protease

ABSTRACT: This work aims to contribute to the study of alternative forms of control of *Rhipicephalus microplus* through the fungus *Metarhizium anisopliae*. In order to evaluate the effect of the fungus on bovine tick protease activity, 80 engorged females of *R. microplus* were divided into control and treatment groups (48 hours of treatment). The treated females were immersed in the conidial suspensions and the controls in sterile distilled water plus 0.1% Tween 80. Females were dissected and the intestinal lavages were washed, dried on filter paper for removal of excess liquid and weighed. They were homogenized and a protein concentration determined. The presence of proteolytic activity in the intestinal extract was measured by the hydrolysis of the protein substrate hemoglobin and the quantification of tyrosine. In the values of pH 4.0 and 5.0 were found an increase of the activity against fungus

use. At these pH values there is mainly presence of cysteine and aspartic protease. When using a cysteine protease inhibitor (dithiothreitol), inhibition of 74% and 54% of the proteolytic activity was observed in the treated and control groups, respectively. Meanwhile, the other cysteine protease inhibitor, phenylmethanesulfonyl fluoride, inhibited 86% and 80% of proteolytic activity in treated and control groups, respectively. It was possible to conclude with this study that it has a majority activity of cysteine proteases acting in the intestine of *R. microplus* and that this activity can be increased in the presence of the entomopathogenic fungus. This increase, in turn, can occur by proteases of the fungus or the tick defense mechanism, which suggests that *M. anisopliae* may prove to be a form of effective control for the tick.

KEYWORDS: biological control, entomopathogenic fungus, protease.

INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é responsável pela transmissão de agentes infecciosos como *Anaplasma* sp. e *Babesia* sp., causando grandes perdas econômicas na pecuária brasileira (TRINDADE et al., 2011).

Sua principal forma de controle baseia-se no uso de produtos químicos acaricidas ou carrapaticidas. O uso inadequado destas substâncias tem aumentado a presença de carrapatos apresentando resistência à ação de muitos princípios ativos disponíveis no mercado. Além disso, o uso indiscriminado destes produtos acarreta contaminação de solos, águas e pastagens (PEREIRA et al., 2008).

Nesse contexto, o controle biológico através de uso de inimigos naturais pode vir a ser uma alternativa viável para o combate de *R. microplus*. Dentre os microrganismos patogênicos com aplicação potencial em controle biológico pode-se destacar o fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae*, que é considerado um dos agentes mais promissores no controle de pragas. Melo et al (2006) demonstrou a susceptibilidade de diferentes estágios de *R. microplus* em relação a este fungo.

Vários fatores têm sido apontados como possíveis determinantes da patogenicidade deste fungo e as proteases estão entre eles. *M. anisopliae* secreta proteases, algumas associadas à sua virulência, já que elas facilitam a transposição da barreira da cutícula na penetração, solubilização dos nutrientes, além de permitirem a inibição de peptídeos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro (FREIMOSER et al., 2005)

As proteases são enzimas indispensáveis para a infectividade e a sobrevivência dos parasitos nos

hospedeiros, mas também podem funcionar como forma de defesa frente a alguma infecção pela geração, por exemplo, de peptídeos antimicrobianos. Algumas hemocidinas, peptídeos antimicrobianos derivados da hemoglobina, são gerados na hemoglobinólise com determinadas proteases (CRUZ, 2010).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da infecção do fungo *M. anisopliae* sobre a atividade proteolítica do intestino do carrapato *R. microplus*. Estando as proteases relacionadas tanto à patogenicidade do fungo, quanto à defesa do carrapato contra-ataques externos, o conhecimento deste efeito pode auxiliar significativamente nos estudos para uso de fungos entomopatogênicos no controle eficaz de carrapatos.

MATERIAL E MÉTODOS

A manutenção das larvas e a infestação de três bezerros foram realizadas na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Daniel Martin Neitz (EPPWON). Os experimentos com fungos e carrapatos foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica Veterinária do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da UFRRJ. As dosagens de proteína foram desenvolvidas no Laboratório de Proteína e Peptídeos no Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ. As fêmeas adultas foram coletadas dos bezerros infestados na EPPWON. Após a coleta, as fêmeas foram submetidas à imersão com solução de hipoclorito de sódio 1%, secadas em papel toalha, identificadas e acondicionadas em placas de Petri; em seguida foram colocadas em câmaras climatizadas com temperatura e umidade controladas (27°C e > 80%).

Todos os experimentos com fungos foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médica Veterinária do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da UFRRJ. O fungo *M. anisopliae* foi inoculado em placa de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) enriquecido com Extrato de Levedura a 1%. Após a inoculação, a placa foi vedada lateralmente com fita Parafilm® e armazenada em câmara climatizada na temperatura de 25°C ±1 e umidade relativa ≥80% para o crescimento fúngico e produção de conídios. Após 15 dias a placa de Petri foi armazenada a 4°C.

Foi feita uma raspagem da colônia fúngica para a obtenção dos conídios. Estes últimos foram ressuspensos em água destilada estéril e Tween 80 a 0,01% (LUZ, 1998).

A quantificação dos conídios foi feita através do uso de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico até atingir-se a concentração de 10⁸ conídios/mL segundo Alves (1998).

Oitenta fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foram separadas no grupo controle e no grupo de tratamento com fungo. No caso do grupo de tratamento, as fêmeas ingurgitadas foram imersas nas suspensões conidiais na concentração de 10⁸ conídios/mL. No caso do grupo controle, as fêmeas foram imersas em água destilada estéril acrescida de Tween 80 0,1%. As imersões ocorreram durante três minutos e em seguida todas as fêmeas foram acondicionadas em placas de Petri contendo papel de filtro para absorver o excesso de líquido. Estas placas foram mantidas em câmara climatizada com temperatura a 27°C (variação de 1°C) e umidade relativa do ar maior ou igual a 80%. O tempo de acondicionamento foi de 48 horas.

Após espera do tempo determinado foi feita a dissecação das fêmeas em PBS estéril gelado, onde os

órgãos foram separados. Os intestinos tiveram seu conteúdo retirado através de lavagem com PBS estéril e pipeta. Em seguida, os tecidos foram secos em papel de filtro para a retirada do excesso de líquidos e pesados em balança digital de precisão.

Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados segundo a metodologia proposta por Mendiola (1996), utilizando a proporção 1 grama de tecido para cada 4 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM (PBS) e Triton x-100 0,1%, pH 7,5. Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 g por 5 minutos a 4°C e armazenados em nitrogênio líquido.

A concentração de proteína dos homogeneizados de intestino foram determinadas através do método de Peterson (1977), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

A atividade proteolítica nos intestinos foi determinada pela hidrólise do substrato proteico hemoglobina. Nos tubos reacionais foram adicionados o tampão e um volume de extrato intestinal correspondente a 100 µg de proteína. Obtendo esta solução um volume de 500 µL. Além disso, foram adicionados também 500 µL de substrato protéico (hemoglobina) dissolvido nos respectivos tampões obtendo concentração final de 2%.

Os tampões usados foram acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 e 5,0; tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,5 e tampão Tris/HCl 0,1 M pH 8,5. Os ensaios foram incubados sob agitação a 37°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 250 µL ácido tricloroacético (TCA) em uma concentração final de 4%. Os tubos foram centrifugados a 3.500 g por 10 min. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes foram postos em tubos limpos.

A atividade proteolítica foi determinada pela quantificação da tirosina através do método de Peterson

(1977). A atividade enzimática foi expressa em μg de tirosina por minuto de reação por mg de proteína.

Para determinar a possível classe de protease presente nos intestinos, os seguintes inibidores de proteases foram utilizados em nossos experimentos: phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 1,0 mM e ditioneitol (DTT) 0,1 M.

Na análise feita com os inibidores, utilizou-se da amostra tecidual um volume correspondente a 100 μg de proteína, que adicionado ao tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e à solução do respectivo inibidor completou um volume total de 500 μL . Após isto, prosseguiu-se da mesma forma que nos testes de proteases descritos anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar a atividade proteolítica em intestino do carrapato em pH 4,0 foi encontrado um aumento estatisticamente significativo desta atividade frente o uso do fungo entomopatogênico (como mostra a Figura 1 A). Em pH 6,5, embora tenha ocorrido um ligeiro aumento na atividade, este não foi significativo estatisticamente (Figura 1 B). E, em pH 8,5 a atividade proteolítica no tecido foi nula tanto na presença quanto na ausência do fungo.

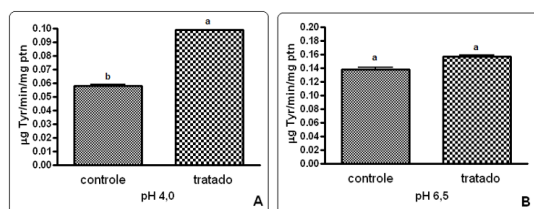


Figura 1- Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a atividade proteolítica em intestino de *Rhipicephalus microplus* contra o substrato hemoglobina. A) Atividade proteolítica em μg Tyr/min/mg ptn em pH 4,0. B) Atividade proteolítica em μg Tyr/min/mg ptn em pH 6,5. Letras minúsculas diferentes acima das colunas indicam que há diferença significativa no teste T de student ($\alpha=0,05$). Letras iguais indicam que não há diferença significativa.

Como as atividades foram mais altas nos valores de pH 4,0 e 6,5 do que no pH 8,5, selecionou-se o valor de pH 5,0 (intermediário entre 4,0 e 6,5) para análise do efeito do fungo sob confirmação da classe proteolítica através do uso de inibidores. A atividade encontrada em tecidos intestinais na ausência do fungo foi mais alta no pH 5,0 (Figura 2 A) do que nos valores analisados anteriormente (Figura 1 A e B). Mendiola et al. (1996) reportaram a presença de aspártico e cisteíno proteases no intestino deste carrapato, bem como Cruz et al. (2010). Sojka et al. (2008) também encontraram atividade de aspártico e cisteíno proteases em intestino de *Ixodes ricinus*. Em pH 5,0 é possível encontrar expressivamente a presença da atividade tanto de cisteíno quanto de aspártico proteases. No presente trabalho foram utilizados dois inibidores de cisteíno proteases: phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) e ditioneitol (DTT). Os resultados encontrados são expressos na figura 2.

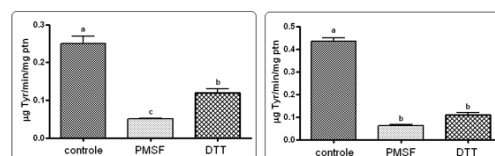


Figura 2- Efeito dos inibidores phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) e ditioneitol (DTT) sobre a atividade proteolítica em intestinos de *Rhipicephalus microplus* contra o substrato hemoglobina. A) Efeito ocorrido em intestinos sem tratamento fúngico. B) Efeito ocorrido em intestinos tratados com *Metarhizium anisopliae*. Letras minúsculas diferentes acima das colunas indicam que há diferença significativa no teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Letras iguais indicam que não há diferença significativa.

O PMSF é um inibidor de serino e cisteíno proteases, enquanto o DTT é inibidor de cisteíno proteases. Com o resultado do teste de inibidores pôde-se observar redução da atividade proteolítica com os dois inibidores utilizados. Entretanto, a redução foi mais acentuada no uso de PMSF, mostrando sua maior eficácia em inibir proteases

de intestino de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. No grupo controle, PMSF inibiu 80% e DTT, 54% da atividade proteásica de intestino podendo indicar a presença majoritária de cisteíno protease neste tecido. O grupo tratado teve o mesmo perfil de inibição com 86% para PMSF e 74% para DTT.

Mendiola et al. (1996) mostraram algumas características da atividade proteolítica em intestino de fêmeas totalmente ingurgitadas. Usando hemoglobina, caseína, albumina e imunoglobulina G, esses autores observaram que a proteólise ocorre no pH ácido (pH abaixo de 6,0), e que aspártico e cisteína endopeptidases são as principais enzimas responsáveis por esta atividade. Portanto, nossos experimentos tiveram resultados semelhantes aos da literatura, visto que a maior atividade mostrada ocorreu no pH 5,0. Além disso, ao utilizarmos inibidores de cisteíno proteases, foi encontrada redução de mais de 50% da atividade proteolítica neste tecido.

O aumento na atividade proteolítica dos intestinos tratados com *M. anisopliae* em pH 4,0 (Figura 1 A) e confirmado no pH 5,0 (Figura 2 A e B) pode ser decorrente da presença de proteases de *M. anisopliae*, já que este fungo é capaz de secretar proteases associadas à sua virulência (FREIMOSER et al., 2005).

Este aumento na atividade proteolítica também pode ser decorrente da defesa do próprio carrapato em questão, uma vez que as proteases podem contribuir na geração de peptídeos antimicrobianos (CRUZ, 2010). Os mecanismos de defesa do carrapato provavelmente são acionados pelo fato do fungo se apresentar como um agente nocivo a este parasita, o que sugere que esta forma de controle pode vir a ser eficaz. Segundo Camargo et al. (2016), acredita-se que a associação entre óleo mineral e um produto a base de *M. anisopliae* pode ser efetiva no

controle deste carrapato a nível de campo. São necessários ainda mais estudos com este fungo para avaliar sua eficácia no controle de *R. microplus*.

CONCLUSÃO

Cisteíno proteases têm grande participação na atividade proteolítica presente em intestino do carrapato *R. microplus*, tanto na ausência quanto na presença do fungo *M. anisopliae*. Ao infectar de forma *in vitro* estes carrapatos, o fungo entomopatogênico estudado é capaz de acarretar aumento da atividade proteolítica do intestino deste aracnídeo. São necessários novos estudos para avaliar se este aumento é consequência de proteases do fungo, como forma de aumentar a patogenicidade deste, ou se este aumento é decorrente de proteases do carrapato por necessidade de maior defesa, ou ainda, se este aumento da atividade proteolítica ocorre por ambos os motivos. Embora haja a necessidade de mais estudos, foi possível concluir com este trabalho que *M. anisopliae* parece se apresentar como um “perigo” para o carrapato, ampliando as expectativas para o uso deste fungo no controle biológico de *R. microplus*.

REFERENCIAS

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba. FEALQ, 1998. 1163p.

CAMARGO, M.G.; NOGUEIRA, M.R.; MARCIANO, A.F. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v.223, p.38-42, 2016.

CRUZ, C.E.; FOGAÇA, A.C.; NAKAYASU, E.S. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

involved in the generation of antimicrobial peptides. **Parasites e Vectors**, v.3, n.63, 2010.

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

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G. Seleção de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 6, p. 839-846, 1998.

MELO, D.R.; REIS, R.C.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.4, p.157-162, 2006.

MENDIOLA, J., ALONSO, M., MARQUETTI, M. C., FINLAY, C. *Boophilus microplus*: Multiple proteolytic activities in the midgut. **Experimental Parasitology**, v.82, p 27-33, 1996.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABO, M. P.; KLAKFE, G. M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus Biologia, controle e resistência**. 1 ed. São Paulo. Med Vet, 2008.

PETERSON, G. L. et al. A simplification method of the protein method of Lowry which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v.83, p.346-356, 1977.

SOJKA, D.; FRANTA, Z.; HORN, M. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an

evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. **Parasites e Vectors**, v.1, n.7, 2008.

TRINDADE, H. I. D.; ALMEIDA, K. D. S.; FREITAS, F. L. D. C. Tristeza Parasitária Bovina – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 16, 2011.