

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**SECRETOMA DE *Beauveria bassiana* RELACIONADO À
INFECÇÃO NO CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus microplus*.**

Lisete Aparecida Silva Klein

Lajeado, Novembro de 2016

Lisete Aparecida Silva Klein

**SECRETOMA DE *Beauveria bassiana* RELACIONADO À
INFECÇÃO NO CARRAPATO BOVINO *Rhipicephalus microplus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia na área de concentração Biotecnologia na Produção Primária de Alimentos.

Orientador: Dra. Lucélia Santi
Coorientador: Dr. Walter Orlando Beys da Silva
Coorientador: Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto

Lajeado, Novembro de 2016

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Tema	12
1.2 Hipótese	12
1.3 Objetivos	12
1.3.1 Objetivo Geral	12
1.3.2 Objetivos específicos	12
1.4 Justificativa	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 Controle Biológico	14
2.2 O Fungo <i>Beauveria bassiana</i>	17
2.3 O Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	19
2.4 O Processo de Infecção	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Manutenção e cultivo de <i>Beauveria bassiana</i>	25
3.2 Preparação dos extratos proteicos de <i>Beauveria bassiana</i>	25
3.3 Quantificação das proteínas	25
3.4 Preparação da amostra para espectrometria de massas	26
3.5 Espectrometria de massas	26
3.6 Análises de bioinformática	27
4 RESULTADOS	28

5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O fungo <i>Beauveria bassiana</i>	18
Figura 2: O carrapato bovino <i>Rhipicephalus microplus</i>	19
Figura 3: Processo de infecção do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre o carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	21
Figura 4: Constituição básica do tegumento de um artrópode	22
Figura 5: Processo inicial de infecção fúngica.....	23
Figura 6: Distribuição das proteínas do secretoma de <i>Beauveria bassiana</i> quando cultivado em meio contendo cutícula de <i>Rhipicephalus microplus</i> e em glicose	28
Figura 7: Categorização das proteínas diferencialmente reguladas no secretoma da infecção de <i>Beauveria bassiana</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil de proteínas identificadas exclusivamente no secretoma do fungo <i>Beauveria bassiana</i> em condição artificial de infecção sobre o carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	29
Tabela 2: Proteínas diferencialmente expressas identificadas no secretoma de <i>Beauveria bassiana</i> quando cultivado em condição artificial de infecção sobre o carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> (RM), comparado ao controle (glicose = G).	30
Tabela 3: Predição da localização das proteínas diferencialmente expressas no secretoma de <i>Beauveria bassiana</i> quando cultivado em meio contendo cutícula de carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	34
Tabela 4: Proteínas do secretoma de <i>Beauveria bassiana</i> cultivado em meio contendo cutícula de carrapato e seus correspondentes ortólogos.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA – Ácido Bicinconínico.

ESALQ-USP – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo.

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

G – Glicose.

MIP - Manejo Integrado de Pragas.

MudPIT - Multidimensional Protein identification Technology.

NCBI – National Center for Biotechnology Information.

RM - *Rhipicephalus microplus*.

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

O controle biológico é considerado uma ferramenta natural e alternativa ecológica para superar os problemas causados pela utilização de métodos químicos no controle de pragas. Além disso, os biocontroladores apresentam inúmeras vantagens quando comparados aos seus análogos químicos, principalmente quanto ao impacto ambiental, custo, manuseio, especificidade e desenvolvimento de resistência. Entre os diversos microrganismos utilizados no controle biológico, os fungos se destacam e, entre estes, o fungo filamentoso e patógeno de artrópodes *Beauveria bassiana* está entre os mais estudados e aplicados. Neste estudo, utilizando proteômica e ferramentas de bioinformática, foram identificadas um total de 256 proteínas. Proteínas envolvidas em diferentes processos importantes para o biocontrole como degradação da cutícula (proteases, lipases), defesa/antioxidantes (catalases, oxidoredutases) e efetoras (glicosil hidrolases) foram observadas. A maioria destas proteínas parecem ser secretadas, seja por rotas clássicas como não clássicas. A identificação dos mecanismos moleculares de infecção do fungo em pragas específicas possibilita o entendimento mais refinado do biocontrole e, consequentemente, no desenvolvimento de estratégias para otimizar este processo. A identificação de proteínas em um sistema que mimetiza as condições de infecção possibilita a busca orientada de microrganismos mais eficientes com maior virulência e especificidade no controle biológico do artrópode *R. microplus*.

Palavras chave: Controle biológico, *Beauveria bassiana*, *Rhipicephalus microplus*, Proteômica.

ABSTRACT

The biological control is considered a natural and ecological alternative tool to overcome the problems caused by the use of chemical methods in pest control. In addition, the biocontrol presents several advantages when compared to its chemical analogues, regarding to environmental impact, cost, handling, specificity and resistance development. Among microorganisms used in biological control, fungi stand out and, the filamentous fungus and arthropod pathogen *Beauveria bassiana*. This fungus is one of the most studied and applied worldwide. In this study, using proteomics and bioinformatics approaches, a total of 256 proteins were identified. Proteins involved in different important processes for the biocontrolling, including degradation of the cuticle (proteases, lipase), defense/antioxidants (catalases, oxidoreductases) and effectors (glycoside hydrolases) were observed. The identification of the molecular mechanisms involved in the fungal infection on specific pests provides understanding of biocontrol and consequently helping to develop strategies to optimize this process. The identification of proteins in a model that mimics the infection condition enables the oriented search for more efficient micro-organisms with greater virulence and specificity in the biological control of *R. microplus* tick.

Keywords: Biological control, *Beauveria bassiana*, *Rhipicephalus microplus*, Proteomics.

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a busca por produtos orgânicos que utilizam tecnologias limpas e que não acarretam em riscos à saúde humana, animal e ao ambiente, são de extrema importância e alvos de vários estudos no campo da biotecnologia. O aumento da demanda por alimentos orgânicos e pela redução das perdas na produção agrícola ocasionada por pragas reforçam a importância do controle biológico de pragas. Por conta do apelo por uma produção alternativa e ecologicamente viável, o estudo e aplicação do controle biológico de pragas artrópodes vem crescendo anualmente (BUENO, 2009). Os biopesticidas desenvolvidos à base de microrganismos são promissores devido ao baixo impacto que ele causa. O uso preferencial destes organismos ocorre por diversos fatores, tais como a facilidade de produção e manipulação, custo, eficiência, especificidade e não desenvolvimento de resistência pela praga alvo.

A utilização de fungos filamentosos no controle biológico tem grande destaque, uma vez que podem ser aplicados para diversas pragas. Estes biopesticidas, especialmente à base de fungos, poderão substituir parcial ou completamente seus correspondentes químicos que são responsáveis por causar resistência nas pragas-alvo, possível contaminação humana e animal, além de diversos danos ambientais. Entretanto, vários estudos são necessários para viabilizar seu uso comercial, incluindo a otimização do biocontrole de pragas específicas. Neste contexto, o entendimento do processo molecular da interação patógeno-hospedeiro e o mecanismo de biocontrole, *per se*, é fundamental.

Dentre os fungos mais utilizados no controle biológico, especificamente no controle de pragas artrópodes, *Beauveria bassiana* se destaca, inclusive por já constituir produtos para o controle de pragas no mercado nacional e internacional (QIN et al., 2014).

A aplicação deste fungo artropodopatogênico no controle específico do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* vem sendo estudada e mostra-se bastante promissora. Avanços importantes na compreensão do processo de

infecção vem sendo realizados. Porém, muitas lacunas ainda existem para o entendimento global deste processo, especificamente para o carrapato. Assim, a análise do secretoma relacionado com a infecção de *R. microplus* representa um importante passo para compreensão geral da infecção e identificação de proteínas específicas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro.

1.1 Tema

Controle biológico do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*.

1.2 Hipótese

A secreção de proteínas de *Beauveria bassiana* induzidas pela presença da cutícula do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* está relacionada com a infecção do mesmo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar o secretoma relacionado à infecção de *Beauveria bassiana* no carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar as proteínas diferencialmente expressas em condições de infecção *in vitro* comparadas com uma condição controle;
- Caracterizar, através de ferramentas de bioinformática, o secretoma da infecção de *B. bassiana*.

1.4 Justificativa

O controle biológico é considerado uma alternativa promissora no controle de pragas por acarretar inúmeras vantagens quando comparado ao uso de pesticidas químicos. Neste contexto, o uso de fungos no controle biológico de

artrópodes é de grande interesse por sua eficiência e atestado sucesso para diversas pragas, especialmente de importância agropecuária e de saúde pública (FARIA & WRIGHT, 2007; FERNANDES et al., 2008; STAFFORD & ALLAN, 2010; GRELL et al., 2011; BITTENCOURT et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016). Porém, é de suma importância entender o processo de infecção e todos os mecanismos envolvidos para sua otimização. O grande entrave para consolidação do controle biológico é que este, na maioria das vezes, demanda mais tempo que os seus correspondentes químicos para controlar a população alvo. Para contornar esta situação, estudos utilizando diferentes técnicas vem sendo realizados para entender o processo molecular de infecção do hospedeiro. Especificamente para carrapatos, avanços consideráveis vêm sendo realizados em relação ao seu biocontrole utilizando fungos filamentosos como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.

O termo secretoma refere-se às proteínas secretadas em um determinado momento em uma determinada situação. No caso do fungo *M. anisopliae*, trabalhos avaliando secretomas já foram publicados, contribuindo muito para a identificação de proteínas que controlam e participam da infecção (MANALIL et al., 2010; BEYS-DA-SILVA et al., 2014; RUSTIGUEL et al., 2016). Entretanto, nenhum secretoma relacionado à infecção foi realizado para *B. bassiana* até o momento. Infelizmente, apesar dos avanços já alcançados, o processo de infecção não esta totalmente elucidado e, talvez por isso, a aplicação comercial de fungos no controle de pragas ainda é muito inferior ao seu potencial, especialmente para carrapatos.

O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* é considerado um dos ectoparasitas de maior impacto na agropecuária, afetando a produção de couro, carne e leite no Brasil. Além disso, no RS, já existem cepas de carrapato bovino resistentes a todos acaricidas químicos disponíveis comercialmente (KLAFKE et al., 2016). Assim, o controle biológico desta praga deixa de ser uma alternativa promissora e ecologicamente interessante, passando a ser, talvez, a única alternativa possível. Por tudo isso, este trabalho apresenta a identificação e a caracterização do secretoma de *B. bassiana* relacionado à infecção do carrapato bovino *R. microplus*. Os resultados apresentados aqui contribuirão para o entendimento molecular da infecção e, conseqüentemente, do biocontrole.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Controle Biológico

A utilização de microrganismos para o controle biológico de pragas e vetores de doenças foi proposta pela primeira vez na metade do século XIX (SCHRANK & VAINSTEIN, 2011). Entretanto, um grande aumento nos estudos de organismos patogênicos relacionados ao controle de pragas e o aumento do potencial biocontrole, começou a ser explorado comercialmente nas últimas décadas (BUENO, 2009).. Muitos fatores ainda dificultam uma utilização mais diversificada das estratégias de controle biológico, como a dificuldade em isolar e identificar potenciais agentes no controle e no desenvolvimento de fórmulas adequadas para maximizar a eficiência destes produtos (SCHRANK & VAINSTEIN, 2011; BEYS-DA-SILVA et al., 2012).

O uso de pesticidas químicos sintéticos está cada vez mais sendo discutido devido às legislações ambientais recentes serem mais rigorosas, ao apelo da sociedade por métodos alternativos, além do fato de estes químicos levarem ao desenvolvimento de resistência por parte das pragas. Assim, a busca por biopesticidas microbianos ou contendo produtos naturais em sua composição vem aumentando (CHANDLER et al., 2011). Os problemas inerentes à utilização de pesticidas podem ser minimizados através de um sistema de gestão do manejo integrado de pragas (MIP) e ou através do uso de agentes de controle biológico (MARTINS, 2014). O uso massivo de pesticidas químicos acarreta em diversos malefícios e danos ambientais imensuráveis, como risco à saúde humana e animal, contaminação do solo e reservas de água e desenvolvimento de resistência, tornando, assim, o controle biológico cada vez mais atraente e necessário (SAMISH et al, 2004; POSADAS & LECUONA, 2009; SILVA, 2009).

O biocontrole prevê o uso racional de organismos vivos (fungos, bactérias, vírus, predadores e parasitoides), visando a redução das populações de pragas, sem interferir na população de inimigos naturais, sendo empregado

como alternativa para diminuir ou evitar a utilização de inseticidas químicos convencionais (FERREIRA et al., 2005; RYAN et al. 2008; ANAND et al., 2009; BEYS-DA-SILVA et al., 2012). Entre os microrganismos utilizados com este fim, os fungos ganham destaque no uso e desenvolvimento de programas para controle de pragas (SAFAVI, 2012). Isto ocorre por inúmeras características, tais como apresentar a capacidade de atacar pragas em todos os estágios de desenvolvimento (FERREIRA et al., 2005; ANAND et al., 2009), facilidade de manuseio e aplicação, custo e conhecimento do processo de produção, além da eficiência apresentada por algumas espécies que já estão sendo utilizadas para essa finalidade (SHAH & PELL, 2003).

Fungos artropodopatogênicos são capazes de controlar várias espécies artrópodes, como insetos, ácaros e carrapatos, incluindo pragas importantes na agricultura, ambientes urbanos, florestas, pecuária e ambientes aquáticos (FARIA & WRAIGHT, 2007; XIE et al., 2012). Estes fungos apresentam uma alta variabilidade, considerada uma característica importante no que diz respeito ao controle de artrópodes, pois com técnicas adequadas, é possível selecionar isolados específicos e com as características desejáveis, além de obter uma maior eficiência nas técnicas de controle (FERNANDES et al., 2012).

De acordo com Ryan et al. (2008), o biocontrole considera que a diversidade de microrganismos e suas relações antagônicas surgem como importantes ferramentas para o controle biológico aplicado, facilitando o entendimento entre a ecologia e os mecanismos de ação destas interações. Para que um microrganismo seja utilizado para o controle biológico, algumas premissas devem ser levadas em consideração, tais como: não toxicidade, especificidade, fácil manuseio, produção de propágulos infecciosos em substratos simples e de baixo custo e estabilidade sob condições ambientais (SANTI, 2009; SILVA, 2009), ressaltando que o desenvolvimento de formulações eficazes também é fundamental para a gestão a campo do controle biológico (SANTI, 2009; BEYS-DA-SILVA et al., 2012).

Existem aproximadamente 1.000 espécies de fungos relatados capazes de matar insetos, aranhas ou ácaros (XIAO et al., 2012). Porém, poucas são utilizadas para estudos de controle biológico destes artrópodes, sendo que em torno de 20 espécies foram associadas para o controle do carrapato (SAMISH et al., 2004). Faria & Wraight (2007) relataram um número substancial de

micoínseticidas e micoacaricidas desenvolvidos em todo o mundo desde 1960: 12 espécies ou subespécies (variedades) de fungos foram empregadas como compostos ativos destes produtos. Entre os 171 produtos apresentados no estudo, 33,9% continham *B. bassiana* na formulação, 33,9% *M. anisopliae*, 5,8% *Isaria fumosorosea* e 4,1% *Beauveria brongniartii*. Destes, 28 produtos são direcionados para controlar ácaros e carrapatos. Samish et al (2004), reportou ingredientes ativos comerciais ou tipos de formulação baseados em microrganismos, onde 33 eram bactérias, 36 fungos e 8 nematoides entomopatogênicos de uma lista de 96 ingredientes ativos comerciais com base em microrganismos.

Os fungos filamentosos são os microrganismos de maior destaque no controle biológico devido a sua capacidade em se desenvolver diretamente sobre o tegumento do hospedeiro, não necessitando que seja ingerido para que possam efetivar o controle (SILVA, 2009; XIAO et al., 2012). Além disso, constituem um importante grupo de microrganismos com muitos e diferentes fatores de virulência e estratégias para exercer sua patogenicidade (SILVA, 2005). Os primeiros patógenos a serem utilizados para o controle biológico destacadamente são os dos gêneros *Archersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticillium* (SHAH & PELL, 2003).

Ao longo do século XX houve muitas tentativas de explorar o fungo *B. bassiana* e algumas outras espécies de fungos patogênicos para controle de pragas. Alguns isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* se restringem a insetos hospedeiros específicos, enquanto outras espécies de fungos são mais generalistas e tem uma ampla gama de hospedeiros (CLARKSON & CHARNLEY, 1996). Estes fungos, devido ao seu uso e pesquisas, podem ser considerados os mais promissores no controle biológico disponíveis comercialmente, sendo utilizados como biopesticidas para o controle de uma variedade de pragas (SAMISH et al., 2004; BUENO, 2009; XIE et al., 2012; MASCARIN, 2015).

No contexto do controle de pragas, sabe-se que o uso de fungos tem algumas desvantagens, como a necessidade de condições ambientais favoráveis (SILVA, 2009). Estes organismos precisam de alta umidade, são suscetíveis à radiação UV, e algumas cepas podem afetar potencialmente

artrópodes não alvos (GINSBERG, 2002; SAMISH et al., 2004). Além disso, o tempo necessário entre a aplicação e a morte dos hospedeiros, em relação ao controle químico, muitas vezes é maior (SANTI, 2009). Isto se deve ao fato de que o mecanismo de infecção do fungo é um processo relativamente lento em causar a morte do hospedeiro, o que tem impedido uma ampla aplicação e utilização destes agentes de biocontrole (KIM et al., 2013).

A interação do fungo com artrópodes é uma abordagem relativamente nova (STAFFORD & ALLAN, 2010) e um sistema modelo emergente se faz necessário para examinar aspectos únicos do desenvolvimento, patogênese, e a diversidade de estilos de vida fúngicas (ZHANG, 2011). Para tanto, estudos dos aspectos moleculares específicos para espécies e diferentes isolados são necessários.

2.2 O Fungo *Beauveria bassiana*

O gênero *Beauveria* compreende fungos entomopatogênicos bem conhecidos que podem ser utilizados como potenciais alternativas para diminuir o uso de pesticidas químicos para o controle de insetos-praga, especialmente onde a umidade é alta (QIN et al., 2014; KORDI, 2015).

Beauveria bassiana (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (1912) (Ascomycota: Cordycipitaceae) (Figura 1) é um fungo patogênico para várias pragas artrópodes (ZHANG et al., 2011; SAFAVI, 2012), possuindo destaque por ser uma espécie cosmopolita (BITTENCOURT et al., 1996; ALVES, 1998; SHANG et al., 2012; KOCACEVIK, 2015; COUTINHO et al., 2016). Este fungo infecta não só um amplo espectro de insetos, mas também outras pragas agrícolas, como os ácaros e os carrapatos (BITTENCOURT et al., 1996; XIE et al., 2012; KORDI et al., 2015; COUTINHO et al., 2016). Este fungo foi relatado pela primeira vez sobre as espécies de carrapatos *Ixodes ricinus* (SOUZA et al., 2011).



Figura 1: O fungo *Beauveria bassiana*, cultivado em meio sólido para produção de conídios.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2015.

Atualmente, *B. bassiana* pode ser encontrado comercialmente no Brasil através do biopesticida Boveril®, primeiro micoinseticida registrado no país para o controle de algumas pragas. Este produto foi desenvolvido a partir de uma interação entre a ESALQ-USP e as empresas ITAFORTE (<http://www.itaforte.com/>) e KOPPERT (<http://www.koppert.com.br>). Alguns isolados deste fungo encontram-se comercialmente registrados em outros países, incluindo o Reino Unido e os Estados Unidos, para o controle de pulgões e outras pragas (KIM et al., 2013).

Na natureza, os conídios disseminados no ambiente constituem a forma infectiva. O ciclo de infecção se inicia pelo contato e fixação dos conídios na superfície de um hospedeiro susceptível. Esta fixação pode ser influenciada por condições ambientais favoráveis, sendo temperatura e umidade relativa do ar, primordiais para o desencadear dos processos mecânicos e enzimáticos associados (GOETTEL et al., 2005; KIM et al., 2013). Nesse contexto, a resistência ao estresse, persistência e viabilidade são características importantes que definem a eficiência da infecção de cada isolado (QIN et al, 2014). Entre os vários componentes dos fungos relacionados à patogênese, os conídios, as hifas, enzimas e outras proteínas e os metabólitos produzidos contribuem para a morte dos insetos de várias maneiras (KIM et al., 2010).

2.3 O Carrapato *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Arachnida: Acarina) (Figura 2), é um ectoparasita hematófago do gado de corte que provoca graves perdas econômicas em rebanhos em áreas tropicais e subtropicais devido ao parasitismo e transmissão da doença, tornando-se um dos principais alvos de programas de controle e erradicação em rebanhos comerciais em todo o mundo (FURLONG, 2004; 2006; SANTI, 2009; SILVA, 2009; BEYS-DA-SILVA et al., 2012, MONTEIRO et al., 2014). As perdas causadas por este carrapato no Brasil são estimadas em mais de US\$3,24 bilhões de dólares por ano, conforme relatado por GRISI et al. (2014).

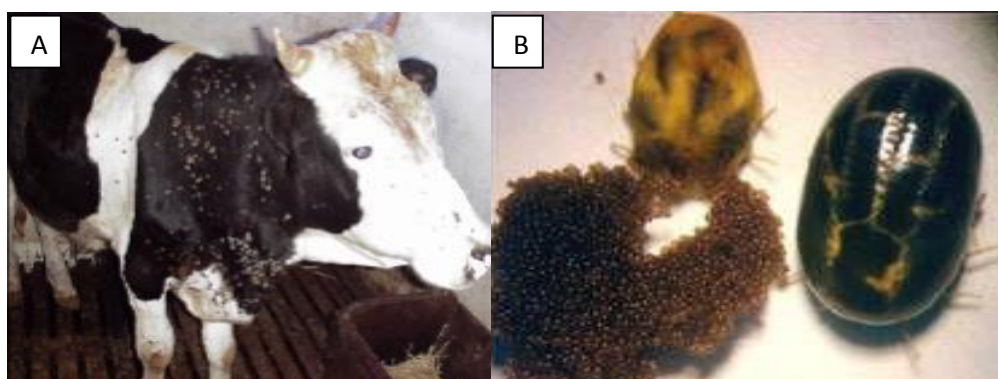


Figura 2: O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. (A) bovino com infestação de carrapatos; (B) Fêmea de *R. microplus* em processo de oviposição (esquerda), evidenciando o grande número de ovos liberados, com considerável diminuição de tamanho em relação à fêmea ingurgitada (direita);. Fonte: Santi, 2009.

O carrapato é um parasita monoxeno, que usa um único hospedeiro em todo seu ciclo de vida parasitária. O hospedeiro natural de *R. microplus* é o gado de corte, embora possa ser encontrado em outros mamíferos, especialmente outros ruminantes, animais domésticos, selvagens, e seres humanos como hospedeiros (GRISI et al., 2014; GONÇALVES et al., 2016).

Durante a fase parasitária, o carrapato é capaz de absorver grandes quantidades de sangue a partir do seu hospedeiro, levando à diminuição na produção de leite, carne, baixa conversão alimentar, prejuízo na produção de

couro e transmissão de patógenos (MELO et al., 2006; GRISI et al., 2014; GONÇALVES et al., 2016).

O controle de carrapatos é realizado atualmente com produtos acaricidas químicos (SANTI, 2009; PERINOTTO et al., 2012; BEYS-DA-SILVA et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014). Devido à resistência de muitas cepas de *R. microplus* a diversas categorias de acaricidas químicos (SANTI, 2009; BEYS-DA-SILVA et al., 2012; PERINOTTO et al., 2012), técnicas de controle biológico são alternativas promissoras (SAMISH et al., 2004; WEBSTER et al., 2015). Beys-da-Silva et al. (2012) relataram que, nos últimos 10 anos, foram realizadas pesquisas *in vitro* e a campo para controlar carrapatos bovinos. Estudos mostraram que *B. bassiana* tem ação patogênica sobre *R. microplus* (BITTENCOURT et al., 1996; FERNANDES et al., 2006; PERINOTTO et al., 2012; ANGELO et al., 2015), incentivando a investigação para o seu uso no controle biológico do carrapato. Além disso, a preocupação e o aumento da preferência do consumidor por produtos orgânicos, que não contenham resíduos químicos (como carne e leite), vem ao encontro com a proposta do controle biológico (SOUZA et al., 2011; BEYS-DA-SILVA et al., 2012).

A busca por cepas de fungos mais eficientes e novas formulações para o uso em larga escala, assim como elaborar estratégias de produção e aplicação, poderão viabilizar uma forma econômica e ambientalmente mais segura de controle do carrapato (SAMISH et al., 2004; BEYS-DA-SILVA et al., 2012).

2.4 O Processo de Infecção

A patogênese dos fungos é definida como um processo bioquímico, fisiológico e genético, resultando em morte do hospedeiro alvo, devido à infecção e estabelecimento da doença. A habilidade que os fungos artropodopatogênicos tem em infectar seus hospedeiros é um processo complexo que envolve a expressão diferencial de numerosos genes, alguns dos quais são altamente regulados quando o fungo está em contato ou exposto a componentes das cutículas dos insetos (CHANTASINGH et al., 2013).

Estudos avaliando a capacidade de fungos artropodopatogênicos para penetrar a cutícula, a capacidade de um determinado isolado de matar uma praga e a virulência relativamente específica de um isolado a um pequeno

grupo de pragas estão associados aos principais fatores para a escolha de candidatos como agentes de biocontrole (GINSBERG, 2002; SAMISH et al., 2004). De acordo com este cenário, o uso de fungos, incluindo *B. bassiana*, para o biocontrole de carrapatos é uma ferramenta eficiente, importante e pouco explorada (BEYS-DA-SILVA et al., 2012). Assim, estratégias bem-sucedidas de controle biológico utilizando fungos artropodopatogênicos, exigem uma compreensão bem detalhada da dinâmica da interação patógeno/hospedeiro e dos efeitos que as condições ambientais têm sobre essa interação, como forma de prevenir e controlar a prevalência do dano causado (FERNANDES et al., 2012). Os agentes fúngicos devem ser bem adaptados à espécie alvo e ao meio ambiente de aplicação para que sua ação seja bem-sucedida.

Beys-da-Silva et al. (2014) descreve o processo de infecção de fungos filamentosos, resumidamente, em três fases: (1) adesão da cutícula, (2) penetração da cutícula, e (3) colonização dos tecidos internos (Figura 3).

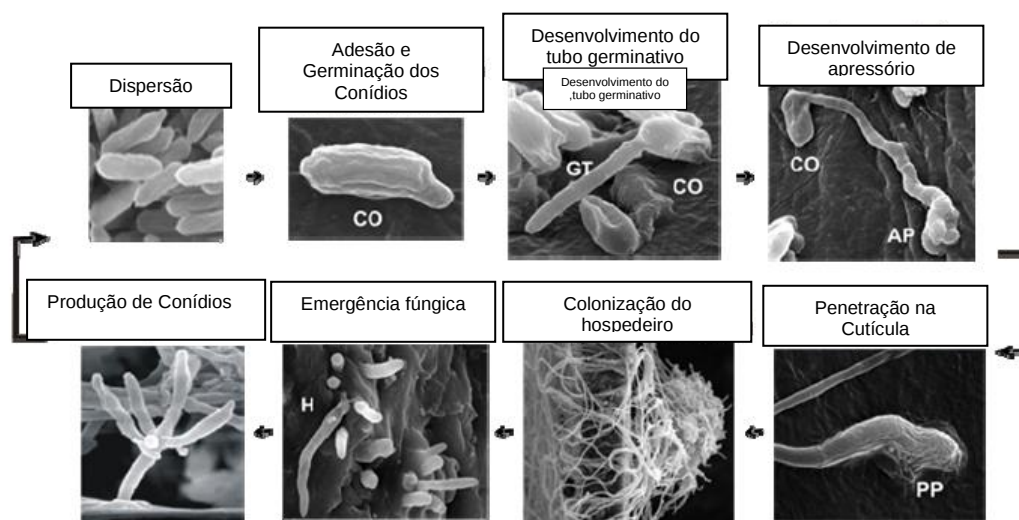


Figura 3: Processo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus*. Microscopia eletrônica de varredura mostrando o ciclo de infecção, que começa com a adesão e a germinação de esporos, terminando com a morte do hospedeiro, emergência fúngica e dispersão de conídios no meio ambiente. CO – conídio; GT – Tubo germinativo; AP – apressório; PP – penetração; H – hifa.

Fonte: Beys-da-Silva et al., 2012.

O contato do conídio com a superfície do hospedeiro é o primeiro passo para o sucesso da infecção (SANTI et al, 2010; ZHANG, 2011). 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 (CLARKSON & CHANRLEY, 1996; SOUZA et al., 2012; KORDI et al., 2015) (Figura 4).

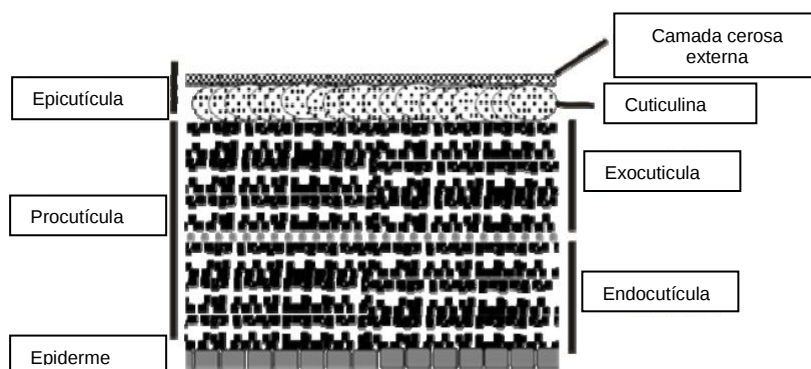


Figura 4: Constituição básica do tegumento de um artrópode.
Fonte: Beys-da-Silva et al. (2012).

A procutícula compreende a maior parte da cutícula, sendo sua composição basicamente de natureza proteica 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 (SILVA, 2009; BEYS-DA-SILVA et al. 2010; SOUZA et al., 2012; KORDI, 2015). Nos fungos filamentosos, os conídios aderidos à superfície do inseto se diferenciam para formar o apressório, estrutura que exerce pressão mecânica sobre a cutícula. É neste local que inicia a secreção de enzimas hidrolíticas que irão auxiliar na penetração (BEYS-DA-SILVA et al., 2012) (Figura 5).

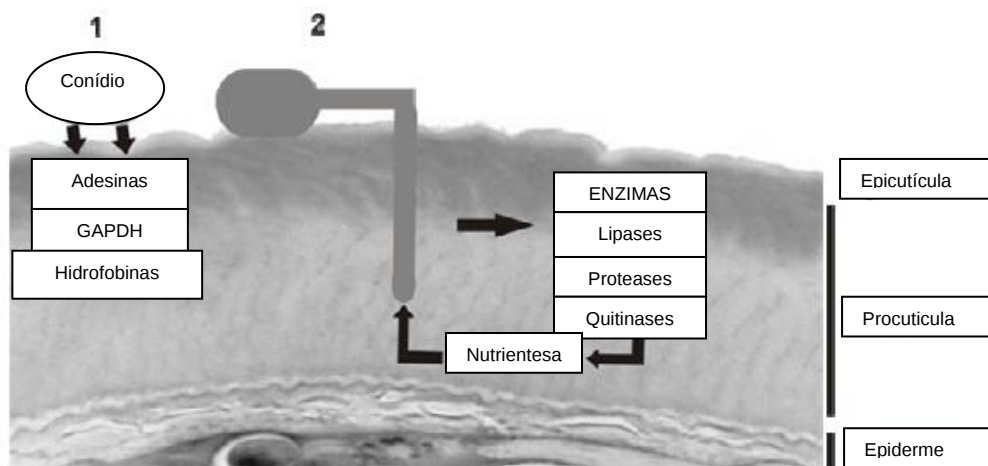


Figura 5: Processo inicial de infecção fúngica: adesão e penetração. Em (1): adesão do conídio mediada por diferentes enzimas. Em (2): secreção de enzimas hidrolíticas cujos papéis incluem a aquisição de nutrientes e a degradação dos componentes do tegumento hospedeiro. Uma secção microscópica da cutícula de *R. microplus* é mostrada. Fonte: Beys-da-Silva et al., 2012.

Tal como acontece com patógenos de plantas, a penetração no hospedeiro envolve tanto a degradação enzimática quanto pressão mecânica (CLARKSON & CHARNLEY, 1996), e esta combinação de mecanismos físicos e enzimáticos é usada para atravessar a cutícula do hospedeiro. Em *B. bassiana* e *M. anisopliae*, bem como em muitos fungos patogênicos, a formação do apressório é fundamental no estabelecimento inicial de uma relação patogênica com o hospedeiro (SOUZA et al., 2012). Posterior à penetração da cutícula do hospedeiro, ocorre a colonização do micélio nas partes internas (hemocel), com a produção de metabólitos secundários tóxicos e a consequente morte do organismo alvo (BEYS-DA-SILVA et al., 2012; SOUZA et al., 2012).

Em geral, a potencialidade do fungo em secretar diferentes proteínas e enzimas no processo de infecção em artrópodes é essencial, uma vez que proteínas específicas podem determinar a virulência em pragas diferentes. Proteases, quitinases, lipases e esterases já são conhecidas por estarem envolvidas no processo de infecção do fungo sobre o artrópode (KIM et al., 1999; SILVA et al., 2010; SANTI et al., 2010). Outras proteínas ainda podem atuar como cofatores do processo patogênico. Por isso, a identificação das

proteínas diferencialmente expressas e atividades enzimáticas que participem do processo de infecção, utilizando tecnologias adequadas é um passo importante no entendimento do processo como um todo (SANTI, 2009; BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

A compreensão dos mecanismos moleculares da interação fungo e hospedeiro durante a infecção são passos fundamentais para otimizar o biocontrole (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Considerando a aplicação de fungos no controle de artrópodes, a elucidação de seus determinantes de patogenicidade, fatores de virulência e mecanismos infectivos constitui um passo importante para melhorar sua eficiência (SILVA, 2009). Tudo isto contribuirá na produção de biopesticidas mais eficientes, seja pela seleção de fungos com determinantes de virulência e patogenicidade específicos ou através do desenvolvimento de formulações e estratégias de aplicação para potencializar estas características e aumentar a virulência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção e cultivo de *Beauveria bassiana*

As proteínas secretadas de *Beauveria bassiana*, isolado 986, cultivado em condição de infecção experimental artificial foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Vânia Bittencourt da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os extratos proteicos foram preparados como descrito a seguir: o fungo foi mantido em placas de meio BDA (extrato de batata 0,4%, glicose 2%, ágar 1,5%), 28 °C, 7 dias. Após este período, os esporos foram removidos por raspagem com adição de uma solução de Tween 80 0,01%. A solução foi centrifugada e os esporos lavados com água estéril. Após, os esporos foram ressuspensos em água e contados em câmaras de Neubauer para preparo da suspensão de conídios na concentração de 10^7 mL^{-1} . A suspensão (1mL) foi inoculada em 70 mL de meio basal (0,6% NaNO_3 , 0,2% glicose, 0,2% peptona, 0,05% extrato de levedura) contendo 0,05% estereato de colesteril do fabricante Sigma e 0,7% cutícula de *R. microplus* (RM) (como condição artificial de infecção) ou 1% glicose (G) (como condição controle). Os frascos foram incubados a 28 °C com agitação (150 rpm) por 48 h.

3.2 Preparação dos extratos proteicos de *Beauveria bassiana*

Após o cultivo do microrganismo, como descrito acima, 0,25% (v/v) Triton X-100 foi adicionado ao frasco e manualmente misturado para extração das proteínas (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). O sobrenadante foi separado por filtração e fervido por 15 min para inativação das proteases, seguido por congelamento a -80 °C e liofilização. As culturas foram realizadas em triplicata (3 réplicas biológicas).

3.3 Quantificação das proteínas

O sobrenadante liofilizado foi ressuspendido em um pequeno volume de água purificada (JTBaker, USA) e precipitado utilizando o método metanol/clorofórmio. Após a precipitação, as amostras foram secas a 37 °C e

ressuspendidas em água. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BCA (Pierce, Rockford, IL), com albumina bovina como padrão.

3.4 Preparação da amostra para espectrometria de massas

Aproximadamente 100 µg das proteínas secretadas de *B. bassiana* em meio RM ou G, tratadas como descrito acima, foram ressuspendidas em tampão de digestão (8 M ureia, 100 mM tris-HCl pH 8,5) conforme descrito previamente (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). As proteínas foram reduzidas com 5 mM tris-2-carboxietil-fosfina (TCEP) por 20 min a temperatura ambiente, e alquiladas com 10 mM iodoacetamida por 15 min a temperatura ambiente e abrigo da luz. Após a adição de 1 mM CaCl₂, as proteínas foram digeridas com 2 µg de tripsina (Promega, Madison, WI) e incubadas a 37 °C, 16 h. A proteólise foi parada adicionando-se ácido fórmico a uma concentração final de 5%. As amostras foram centrifugadas (14.000rpm, 20 min) e o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 °C. O experimento foi realizado em triplicata. Na preparação das amostras para proteômica, as triplicatas das culturas foram agrupadas em *pools* (cada triplicata foi agrupada e realizada duas corridas de espectrometria, totalizando 6 corridas/condição).

3.5 Espectrometria de massas

Os peptídeos trípticos foram carregados em colunas previamente empacotadas para MudPIT (contendo 2,5 cm de resina de troca iônica e 2 cm de resina para fase reversa), conforme descrito por Beys-da-Silva et al. (2014). Os peptídeos foram separados em uma coluna de 11 cm (fase reversa) e analisados em espectrômetro de massas do tipo LTQ-XL (Thermo Finnigan, Palo Alto, CA) com 12 passos de separação com diferentes concentrações de sal (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Os tampões utilizados foram os seguintes: tampão A (5% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico), tampão B (80% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico) e tampão C (500 mM acetato de amônio, 5% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico).

A identificação de proteínas e análises de quantificação foram feitas utilizando o software Integrated Proteomics Pipeline (IP2, www.integratedproteomics.com/). A busca para identificação das proteínas foi realizada contra o banco de dados contendo o genoma de *B. bassiana* disponível no NCBI.

3.6 Análises de bioinformática

O software PatternLab foi utilizado para identificar proteínas diferencialmente expressas (módulo TFold) ou exclusivas (módulo AAPV) das condições analisadas. Para as proteínas diferencialmente expressas foram utilizados os seguintes parâmetros: proteínas que não foram detectadas em, pelo menos, 4 das 6 corridas por condição foram desconsideradas; $p \leq 0,001$; e *fold change* maior ou igual a 2. (BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

O software Blast2GO (<http://www.blast2go.org>) foi usado para categorizar as proteínas de acordo com o Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>), nos níveis: atividade biológica e função molecular. Outras ferramentas de bioinformática também foram utilizadas para investigar características das proteínas identificadas por MudPIT: TargetP 1.0 e TMHMM 2.0 foram utilizados para predição da localização subcelular, e SignalP 4.1 para predição de secreção (disponíveis em <http://www.cbs.dtu.dk/services/>). OrthoMCL (<http://orthomcl.org/orthomcl/>) foi utilizado para buscar proteínas ortólogas em outras espécies fúngicas.

4 RESULTADOS

O fungo *B. bassiana*, assim como outros fungos filamentosos já estudados para controle biológico, possui como parte da estratégia de infecção a secreção de enzimas e outras proteínas. Neste estudo, utilizando o fungo artropodopatogênico *B. bassiana*, diversas proteínas foram identificadas: de um total de 256 proteínas, 50 foram identificadas exclusivamente quando o fungo foi cultivado em meio contendo cutícula de carrapato, mimetizando a condição de infecção, e 72 em meio contendo glicose como única fonte de carbono (Figura 6).

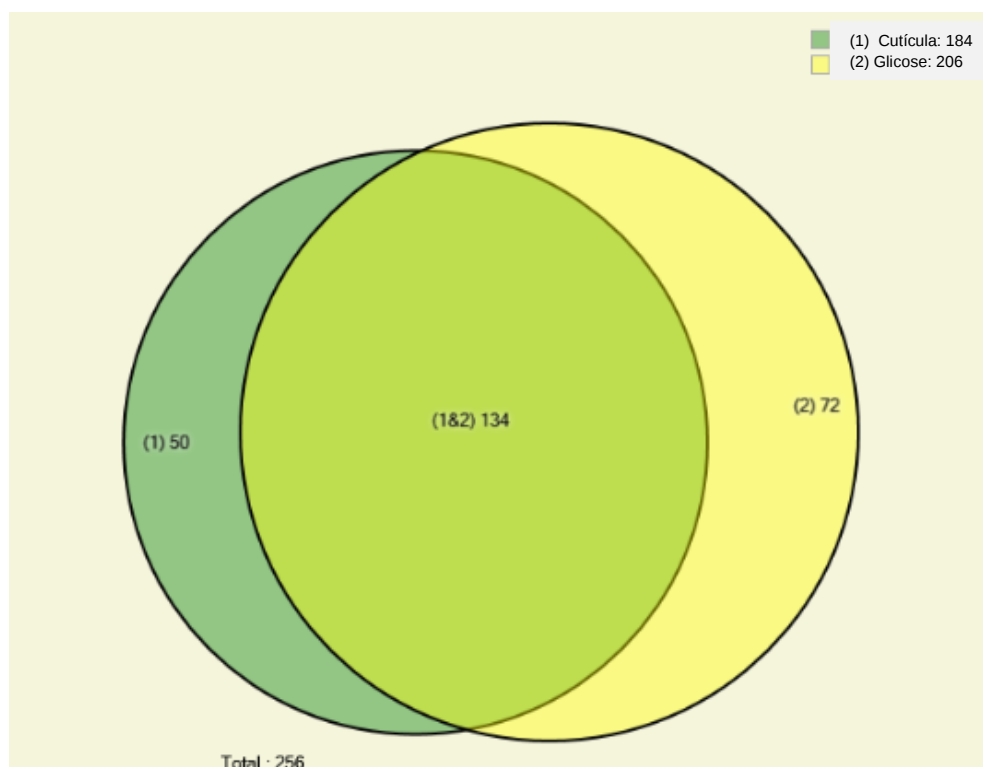


Figura 6: Distribuição das proteínas do secretoma de *B. bassiana* quando cultivado em meio contendo cutícula de *R. microplus* - condição de infecção (círculo verde escuro) e em glicose - condição controle (círculo amarelo). Dados foram gerados pelo módulo AAPV do programa PatternLab.

Entre estas 50 proteínas identificadas exclusivamente em meio com carapaça de carrapato, pode-se observar proteínas relacionadas com a

adesão, degradação da cutícula (proteases, lipases/ceramidasas), defesa e estresse (catalase e oxidoredutase), entre outras (Tabela 1).

Tabela 1: Perfil de proteínas identificadas exclusivamente no secretoma do fungo *B. bassiana* em condição artificial de infecção sobre o carrapato bovino *R. microplus*.

Número de acesso	Spec count	Descrição da proteína
gi 400597335 gb EJP65068.1	934	glycosyl hydrolase family 2
gi 400593017 gb EJP61028.1	395	dihydrolipoyl dehydrogenase
gi 400600426 gb EJP68100.1	217	antigenic cell wall galactomannoprotein, putative
gi 400595444 gb EJP63245.1	134	peptidase family M28
gi 400595333 gb EJP63138.1	85	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase
gi 400595035 gb EJP62860.1	37	carboxypeptidase-like protein
gi 400597723 gb EJP65453.1	33	chaperonin 10 kDa subunit
gi 400600704 gb EJP68372.1	30	metalloprotease-like protein
gi 400595803 gb EJP63593.1	28	glucose sorbosone dehydrogenase
gi 400597322 gb EJP65055.1	26	secreted glucosidase
gi 400597387 gb EJP65120.1	25	branched-chain amino acid aminotransferase
gi 400593914 gb EJP61804.1	25	hypothetical protein BBA_09224
gi 400603021 gb EJP70619.1	21	PA domain-containing protein
gi 400599275 gb EJP66979.1	20	single-strand binding protein family
gi 400597126 gb EJP64861.1	19	spermidine synthase
gi 400599905 gb EJP67596.1	18	glutaminase GtaA
gi 400597193 gb EJP64928.1	18	myo-inositol-1-phosphate synthase
gi 400593007 gb EJP61021.1	17	histone H4.1
gi 400597794 gb EJP65518.1	17	FAD binding domain-containing protein
gi 400598496 gb EJP66205.1	16	hypothetical protein BBA_04698
gi 400598313 gb EJP66030.1	15	carbonic anhydrase
gi 400599035 gb EJP66739.1	15	hydrolase, alpha/beta fold family protein
gi 400596531 gb EJP64302.1	14	WSC domain-containing protein
gi 400593888 gb EJP61782.1	13	amidohydrolase-like protein
gi 400597578 gb EJP65308.1	12	neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase
gi 400601343 gb EJP68986.1	11	nucleoside diphosphate kinase
gi 400603386 gb EJP70984.1	11	fasciclin domain-containing protein
gi 400600211 gb EJP67885.1	11	WSC domain-containing protein
gi 400593056 gb EJP61063.1	10	FAD binding domain-containing protein
gi 400594324 gb EJP62179.1	10	transcriptional regulator
gi 400592888 gb EJP60927.1	9	extensin-like protein

gi 400596103 gb EJP63887.1	8	hypothetical protein BBA_07211
gi 400600233 gb EJP67907.1	8	fumarylacetoacetase-like protein
gi 400598321 gb EJP66038.1	8	formamidase-like protein
gi 400597381 gb EJP65114.1	8	magnesium-translocating P-type ATPase family protein
gi 400603397 gb EJP70995.1	8	glycoside hydrolase, catalytic core
gi 400601462 gb EJP69105.1	7	hypothetical protein BBA_02140
gi 400602944 gb EJP70542.1	7	glycoside hydrolase family 38
gi 400601443 gb EJP69086.1	6	hypothetical protein BBA_02121
gi 400600446 gb EJP68120.1	6	peptidase family protein
gi 400598640 gb EJP66349.1	5	CIA30 family protein
gi 400601625 gb EJP69268.1	5	coproporphyrinogen III oxidase
gi 400600820 gb EJP68488.1	5	FAD dependent oxidoreductase
gi 400596996 gb EJP64740.1	5	putative glutamine synthetase
gi 400601859 gb EJP69484.1	4	aminotransferase class I and II
gi 400601204 gb EJP68847.1	4	AAA family ATPase
gi 400595632 gb EJP63424.1	3	hypothetical protein BBA_07600
gi 400601225 gb EJP68868.1	3	Adenosylhomocysteinase
gi 400597276 gb EJP65011.1	3	Catalase-like domain, heme-dependent
gi 400597473 gb EJP65206.1	3	Peptidase S33, tripeptidyl-peptidase

Quando analisadas as proteínas diferencialmente expressas, 26 foram detectadas (Tabela 2). Destas, 10 foram consideradas positivamente reguladas na condição de infecção, enquanto 16 proteínas foram reguladas negativamente. No primeiro grupo também pode-se observar proteínas relacionadas especialmente com a degradação de cutícula (bassiasina, lipase, quitinase), entre outras.

Tabela 2: Proteínas diferencialmente expressas, presentes nas duas condições, identificadas no secretoma de *B. bassiana* quando cultivado em condição artificial de infecção sobre o carrapato *R. microplus* (RM), comparado ao controle (glicose = G).

N. de acesso	Fold change*	Valor de p	Descrição da proteína
gi 400603215 gb EJP70813.1	196,00	0,0240	cuticle-degrading protease bassiasin I
gi 400595882 gb EJP63670.1	75,75	0,0434	extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4
gi 400594426 gb EJP62270.1	72,21	0,0347	secreted lipase 1 precursor
gi 400600932 gb EJP68600.1	17,90	0,0013	cell wall protein

gi 400597426 gb EJP65159.1	7,74	0,0117	WSC domain-containing protein
gi 400593788 gb EJP61698.1	7,33	0,0005	CFEM domain-containing protein
gi 400595691 gb EJP63483.1	6,93	0,0014	sulphydryl oxidase
gi 400597388 gb EJP65121.1	5,78	0,0015	hypothetical protein BBA_05891
gi 400594099 gb EJP61973.1	4,79	0,0206	glycoside hydrolase, family 47
gi 400596984 gb EJP64728.1	3,87	0,0447	chitinase-like protein
gi 400599543 gb EJP67240.1	-2,05	0,0266	chitinase-like protein
gi 400603297 gb EJP70895.1	-3,13	0,0046	GPI anchored cell wall protein
gi 400595554 gb EJP63349.1	-3,17	0,0129	serine peptidase, putative
gi 400601454 gb EJP69097.1	-3,45	0,0312	DUF985 domain protein
gi 400593850 gb EJP61747.1	-3,86	0,0135	ubiquitin family protein
gi 400603200 gb EJP70798.1	-4,86	0,0356	ribonuclease T2 family protein
gi 400595663 gb EJP63455.1	-5,23	0,0259	family S53 protease
gi 400593632 gb EJP61558.1	-9,77	0,0083	WSC domain-containing protein
gi 400598993 gb EJP66700.1	-10,29	0,0320	glucanotransferase-like protein
gi 400595644 gb EJP63436.1	-10,57	0,0011	FAD binding domain-containing protein
gi 400599266 gb EJP66970.1	-11,55	0,0045	Bys1 family protein
gi 400597260 gb EJP64995.1	-11,59	0,0006	Cry3Aa protein
gi 400594403 gb EJP62247.1	-14,20	0,0133	phosphorylcholine phosphatase
gi 400599627 gb EJP67324.1	-20,92	0,0007	small secreted protein
gi 400598912 gb EJP66619.1	-32,50	0,0005	hypothetical protein BBA_04559
gi 400595334 gb EJP63139.1	-42,00	0,0219	PAF acetylhydrolase

Proteínas foram classificadas como diferencialmente expressas utilizando o programa PatternLab, modulo TFold, com *fold change* maior ou igual a 2.

*baseado nos valores de *spectral counts*.

Para categorização das proteínas diferencialmente identificadas, o programa Blast2Go foi utilizado (Figura 7). De acordo com o processo biológico, proteínas relacionadas a metabolismo e processos celulares foram mais abundantes. Quando classificadas de acordo com a função molecular, a maior parte está relacionada com atividade de hidrolases (onde se incluem as enzimas degradadoras de cutícula) e ligação a compostos orgânicos cíclicos. Estes resultados eram esperados, visto o grande número de glicosil hidrolases encontradas. Dentro deste grupo encontram-se proteínas de ligação a açúcares, como glicose e N-acetil-glicosamina (monômero de quitina), por exemplo.

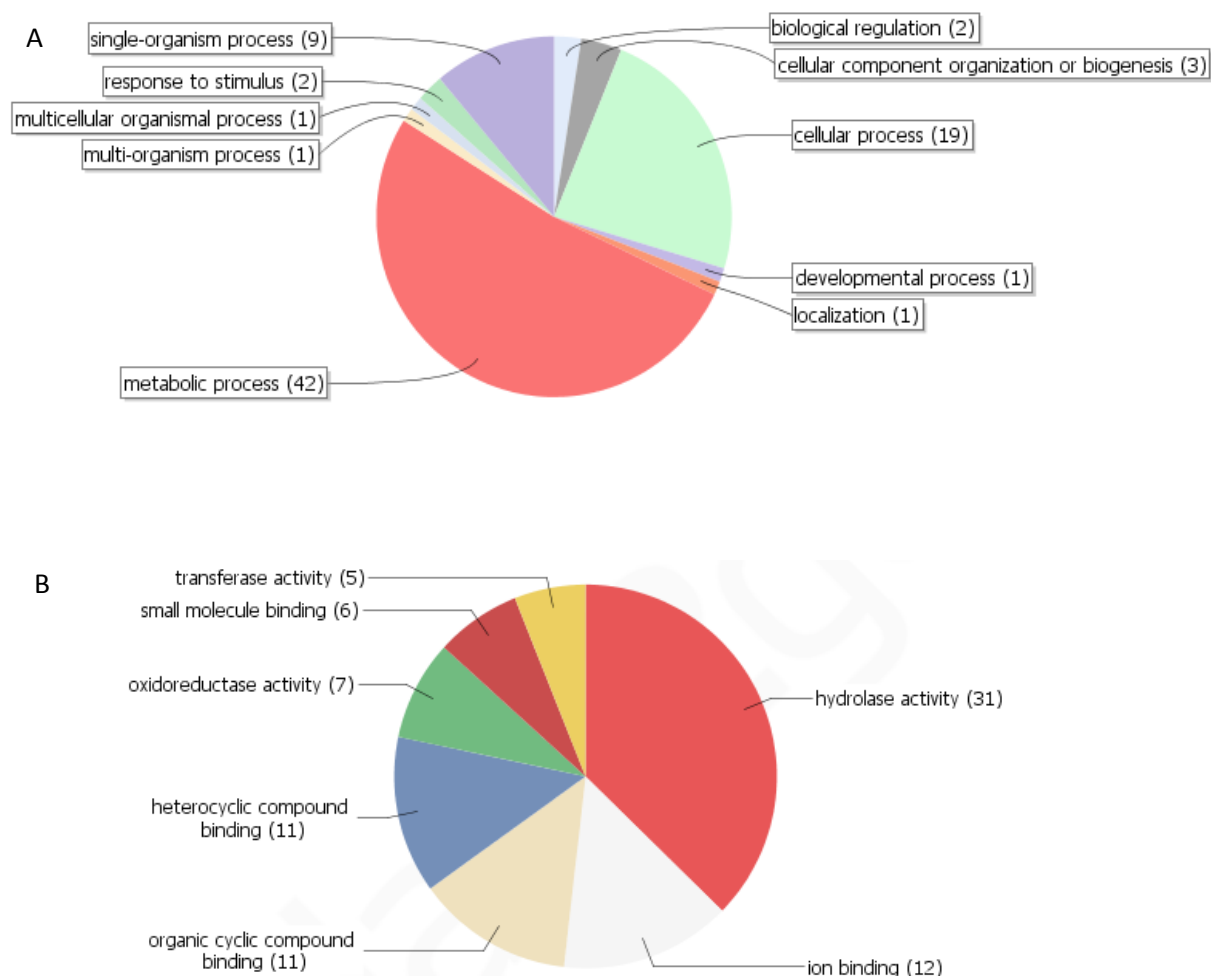


Figura 7: Categorização das proteínas diferencialmente reguladas no secretoma da infecção de *B. bassiana*, cultivado em meio contendo cutícula de carrapato (RM) de acordo com o Gene Ontology. (A) Classificação por processo biológico e (B) função molecular.

Utilizando múltiplas ferramentas de bioinformática (TargetP, SignalP e TMHMM), as proteínas identificadas e classificadas como diferencialmente reguladas foram avaliadas quanto a possíveis sinais de secreção e localização sub-celular, a fim de validar a amostra como secretoma. De acordo com os resultados, mais de 50% das proteínas foram sugeridas como secretadas ou contendo peptídeo sinal (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra a correspondência das proteínas identificadas com possíveis ortólogos. Das 76 proteínas diferencialmente reguladas (positiva e negativamente e exclusivas em meio RM), 68 obtiveram correspondência com sequências ortólogas em outros fungos. A grande maioria (84%) corresponde a

fungos patógenos de plantas (*Fusarium graminearum*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*). Outros fungos, incluindo patógenos de animais (*Coccidioides immitis* e *Cryptococcus neoformans*) e não patogênicos (*Laccaria bicolor*) apresentam ortólogos às proteínas do secretoma de *B. bassiana*.

Tabela 3: Predição da localização das proteínas diferencialmente expressas no secretoma de *B. bassiana* quando cultivado em meio contendo cutícula de carrapato.

Nº de acesso	Proteína	Signal P ^a	Target P ^b	TMHMM ^c
gi 400603297 gb EJP70895.1	GPI anchored cell wall protein	Y	S	S
gi 400603215 gb EJP70813.1	cuticle-degrading protease bassiasin I precursor	Y	S	S
gi 400603200 gb EJP70798.1	ribonuclease T2 family protein	Y	S	
gi 400601454 gb EJP69097.1	DUF985 domain protein	Y	S	
gi 400600932 gb EJP68600.1	cell wall protein	Y	S	
gi 400599627 gb EJP67324.1	small secreted protein	Y	S	
gi 400599543 gb EJP67240.1	chitinase-like protein	Y	S	
gi 400599266 gb EJP66970.1	Bys1 family protein	Y	S	
gi 400598993 gb EJP66700.1	glucanosyltransferase-like protein	N	*	
gi 400598912 gb EJP66619.1	hypothetical protein BBA_04559	N	*	
gi 400597426 gb EJP65159.1	WSC domain-containing protein	Y	S	S
gi 400597388 gb EJP65121.1	hypothetical protein BBA_05891	Y	S	
gi 400597260 gb EJP64995.1	Cry3Aa protein	Y	S	
gi 400596984 gb EJP64728.1	chitinase-like protein	Y	S	
gi 400595882 gb EJP63670.1	extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4	Y	S	
gi 400595691 gb EJP63483.1	sulphydryl oxidase	Y	S	
gi 400595663 gb EJP63455.1	family S53 protease	Y	S	
gi 400595644 gb EJP63436.1	FAD binding domain-containing protein	Y	S	
gi 400595554 gb EJP63349.1	serine peptidase, putative	Y	S	
gi 400595334 gb EJP63139.1	PAF acetylhydrolase	Y	S	

gi 400594426 gb EJP62270.1	secreted lipase 1 precursor	Y	S
gi 400594403 gb EJP62247.1	phosphorylcholine phosphatase	Y	
gi 400594099 gb EJP61973.1	Glycoside hydrolase, family 47	N	S
gi 400593850 gb EJP61747.1	ubiquitin family protein	N	—
gi 400593788 gb EJP61698.1	CFEM domain-containing protein	N	*
gi 400593632 gb EJP61558.1	WSC domain-containing protein	N	—
gi 400597578 gb EJP65308.1	neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase	Y	S
gi 400597473 gb EJP65206.1	Peptidase S33, tripeptidyl-peptidase	Y	S
gi 400597322 gb EJP65055.1	secreted glucosidase	Y	S
gi 400594324 gb EJP62179.1	transcriptional regulator	Y	S
gi 400603021 gb EJP70619.1	PA domain-containing protein	Y	S
gi 400601625 gb EJP69268.1	coproporphyrinogen III oxidase	Y	S
gi 400597794 gb EJP65518.1	FAD binding domain-containing protein	Y	S
gi 400597381 gb EJP65114.1	magnesium-translocating P-type ATPase family protein	Y	S
gi 400602944 gb EJP70542.1	glycoside hydrolase family 38	Y	S
gi 400601859 gb EJP69484.1	aminotransferase class I and II	Y	S
gi 400601343 gb EJP68986.1	nucleoside diphosphate kinase	Y	S
gi 400601225 gb EJP68868.1	Adenosylhomocysteinase	Y	S
gi 400601204 gb EJP68847.1	AAA family ATPase	Y	S
gi 400600820 gb EJP68488.1	FAD dependent oxidoreductase	Y	S
gi 400600233 gb EJP67907.1	fumarylacetoacetase-like protein	Y	S
gi 400599275 gb EJP66979.1	single-strand binding protein family	Y	S
gi 400598640 gb EJP66349.1	CIA30 family protein	Y	S
gi 400598496 gb EJP66205.1	hypothetical protein BBA_04698	Y	S

gi 400598321 gb EJP66038.1	formamidase-like protein	Y	—	
gi 400598313 gb EJP66030.1	carbonic anhydrase	N	S	S
gi 400597723 gb EJP65453.1	chaperonin 10 kDa subunit	N	S	
gi 400597387 gb EJP65120.1	branched-chain amino acid aminotransferase	N	S	
gi 400597276 gb EJP65011.1	catalase-like domain, heme-dependent	N	S	
gi 400597193 gb EJP64928.1	myo-inositol-1-phosphate synthase	N	*	S
gi 400597126 gb EJP64861.1	spermidine synthase	N	M	S
gi 400596996 gb EJP64740.1	putative glutamine synthetase	N	*	S
gi 400593914 gb EJP61804.1	hypothetical protein BBA_09224	N	*	S
gi 400593888 gb EJP61782.1	amidohydrolase-like protein	N	—	
gi 400593017 gb EJP61028.1	dihydrolipoyl dehydrogenase	N	*	
gi 400593007 gb EJP61021.1	histone H4.1	N	—	
gi 400592888 gb EJP60927.1	extensin-like protein	N	*	
gi 400603397 gb EJP70995.1	glycoside hydrolase, catalytic core	N	—	
gi 400603386 gb EJP70984.1	fasciclin domain-containing protein	N	—	
gi 400601462 gb EJP69105.1	hypothetical protein BBA_02140	N	—	
gi 400601443 gb EJP69086.1	hypothetical protein BBA_02121	N	M	
gi 400600704 gb EJP68372.1	metalloprotease-like protein	N	—	
gi 400600446 gb EJP68120.1	peptidase family protein	N	*	
gi 400600426 gb EJP68100.1	antigenic cell wall galactomannoprotein, putative	N	—	
gi 400600211 gb EJP67885.1	WSC domain-containing protein	N	M	
gi 400599905 gb EJP67596.1	glutaminase GtaA	N	*	
gi 400599035 gb EJP66739.1	hydrolase, alpha/beta fold family protein	N	—	
gi 400596531 gb EJP64302.1	WSC domain-containing protein	N	—	

gi 400596103 gb EJP63887.1	hypothetical protein BBA_07211	N	—
gi 400595803 gb EJP63593.1	glucose sorbosone dehydrogenase	N	—
gi 400595632 gb EJP63424.1	hypothetical protein BBA_07600	N	—
gi 400595444 gb EJP63245.1	peptidase family M28	N	*
gi 400595333 gb EJP63138.1	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	N	*
gi 400595035 gb EJP62860.1	carboxypeptidase-like protein	N	M
gi 400593056 gb EJP61063.1	FAD binding domain-containing protein	N	—
gi 400597335 gb EJP65068.1	glycosyl hydrolase family 2	N	—

^a (Y) rota de secreção; (N) não secretada

^b (S) rota de secreção; (M) mitocôndria; () outra localização; (*) não identificado

c (S) transmembrana

Tabela 4: Proteínas do secretoma de *B. bassiana* cultivado em meio contendo cutícula de carrapato e seus correspondentes ortólogos.

Proteína	Código OrthoMCL	Organismo	Proteína ortóloga	Valor de E
cell wall protein	OG5_135066	<i>Aspergillus fumigatus</i>	antigenic cell wall galactomannoprotein, putative	3,00E-08
Bys1 family protein	OG5_155858	<i>Aspergillus fumigatus</i>	BYS1 domain protein	5,00E-35
Peptidase S33, tripeptidyl-peptidase	OG5_137955	<i>Aspergillus nidulans</i>	uncharacterized	2,00E-75
secreted lipase 1 precursor	OG5_163503	<i>Aspergillus nidulans</i>	n/a	1,00E-114
Glycoside hydrolase, catalytic core	OG5_127620	<i>Aspergillus oryzae</i>	alpha-galactosidase	1,00E-136
GPI anchored cell wall protein	OG5_155257	<i>Aspergillus oryzae</i>	predicted protein	2,00E-61
glutaminase GtaA	OG5_163514	<i>Aspergillus oryzae</i>	predicted protein	1,00E-181
hypothetical protein BBA_09224	OG5_126619	<i>Bombyx mori</i>	n/a	1,00E-07
magnesium-translocating P-type ATPase family protein	OG5_127253	<i>Coccidioides immitis</i>	magnesium-translocating P-type ATPase	1,00E-181
histone H4.1	OG5_126573	<i>Coccidioides immitis</i>	histone H4	1,00E-52
WSC domain-containing protein	OG5_137956	<i>Cryptococcus neoformans</i>	WSC domain-containing protein	2,00E-57

fasciclin domain-containing protein	OG5_140192	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-74
cuticle-degrading protease bassiasin I	OG5_128249	<i>Fusarium graminearum</i>	proteinase R precursor	1,00E-103
PA domain-containing protein	OG5_128101	<i>Fusarium graminearum</i>	similar to prostate-specific membrane antigen	1,00E-181
glycoside hydrolase family 38	OG5_130172	<i>Fusarium graminearum</i>	similar to alpha-mannosidase	1,00E-181
aminotransferase class I and II	OG5_126737	<i>Fusarium graminearum</i>	similar to aspartate aminotransferase	1,00E-181
coproporphyrinogen III oxidase	OG5_128228	<i>Fusarium graminearum</i>	coproporphyrinogen III oxidase	1,00E-169
hypothetical protein BBA_02140	OG5_131653	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-108
DUF985 domain protein	OG5_131531	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	5,00E-37
nucleoside diphosphate kinase	OG5_126708	<i>Fusarium graminearum</i>	nucleoside diphosphate kinase	1,00E-76
AAA family ATPase	OG5_126926	<i>Fusarium graminearum</i>	cell division cycle protein 48	1,00E-181
FAD dependent oxidoreductase	OG5_144614	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-131
peptidase family protein	OG5_127974	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-128
antigenic cell wall galactomannoprotein, putative	OG5_176018	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-26
small secreted protein	OG5_169722	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	6,00E-28
single-strand binding protein family	OG5_127389	<i>Fusarium graminearum</i>	single-strand binding protein family domain	2,00E-47
hydrolase, alpha/beta fold family protein	OG5_169806	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-101
glucanotransferase-like protein	OG5_134260	<i>Fusarium graminearum</i>	1,3-beta-glucanotransferase gel1 precursor	1,00E-149
CIA30 family protein	OG5_159465	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	5,00E-51
formamidase-like protein	OG5_133542	<i>Fusarium graminearum</i>	formamidase	1,00E-181
FAD binding domain-containing protein	OG5_155912	<i>Fusarium graminearum</i>	3-ketosteroid-delta-1-dehydrogenase	1,00E-181
chaperonin 10 kDa subunit	OG5_126769	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	9,00E-51
hypothetical protein BBA_05891	OG5_195850	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	6,00E-87
branched-chain amino acid aminotransferase	OG5_159247	<i>Fusarium graminearum</i>	branched-chain amino acid aminotransferase	1,00E-181
secreted glucosidase	OG5_130926	<i>Fusarium graminearum</i>	endo-1,3(4)-beta-glucanase	1,00E-109
Catalase-like domain, heme-dependent	OG5_127182	<i>Fusarium graminearum</i>	catalase A	1,00E-181
myo-inositol-1-phosphate synthase	OG5_128316	<i>Fusarium graminearum</i>	inositol-3-phosphate synthase isozyme 2	1,00E-181
putative glutamine synthetase	OG5_127086	<i>Fusarium graminearum</i>	glutamine synthetase	1,00E-181
extracellular dipeptidyl-peptidase Dpp4	OG5_128614	<i>Fusarium graminearum</i>	antigenic dipeptidyl-peptidase Dpp4	1,00E-181
glucose sorbosone dehydrogenase	OG5_140527	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-181
sulphydryl oxidase	OG5_136067	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-105
FAD binding domain-containing protein	OG5_140231	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-150

peptidase family M28	OG5_209004	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-149
glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	OG5_155948	<i>Fusarium graminearum</i>	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family	1,00E-155
phosphorylcholine phosphatase	OG5_165097	<i>Fusarium graminearum</i>	phosphorylcholine phosphatase	1,00E-139
transcriptional regulator	OG5_149849	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-181
amidohydrolase-like protein	OG5_138057	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-181
ubiquitin family protein	OG5_127221	<i>Fusarium graminearum</i>	ubiquitin/S27a fusion protein	2,00E-75
WSC domain-containing protein	OG5_187015	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-181
dihydrolipoyl dehydrogenase	OG5_126968	<i>Fusarium graminearum</i>	dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	1,00E-181
extensin-like protein	OG5_152770	<i>Fusarium graminearum</i>	conserved hypothetical protein	1,00E-62
WSC domain-containing protein	OG5_169099	<i>Laccaria bicolor</i>	n/a	2,00E-20
PAF acetylhydrolase	OG5_155742	<i>Magnaporthe grisea</i>	hypothetical protein	2,00E-61
Adenosylhomocysteinase	OG5_127233	<i>Neurospora crassa</i>	adenosylhomocysteinase	1,00E-181
metalloprotease-like protein	OG5_137925	<i>Neurospora crassa</i>	metalloprotease 1	3,00E-55
fumarylacetoacetase-like protein	OG5_130701	<i>Neurospora crassa</i>	fumarylacetoacetase	1,00E-146
hypothetical protein BBA_04698	NO_GROUP	<i>Neurospora crassa</i>	hypothetical protein	1,00E-07
carbonic anhydrase	OG5_127503	<i>Neurospora crassa</i>	carbonic anhydrase 2	1,00E-103
neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase	OG5_129670	<i>Neurospora crassa</i>	neutral ceramidase	1,00E-181
WSC domain-containing protein	OG5_190552	<i>Neurospora crassa</i>	hypothetical protein	1,00E-61
glycosyl hydrolase family 2	OG5_132459	<i>Neurospora crassa</i>	beta-galactosidase	1,00E-181
spermidine synthase	OG5_127074	<i>Neurospora crassa</i>	spermidine-3	1,00E-151
chitinase-like protein	OG5_130746	<i>Neurospora crassa</i>	chitinase	1,00E-105
serine peptidase, putative	OG5_127207	<i>Neurospora crassa</i>	serine peptidase	3,00E-97
carboxypeptidase-like protein	OG5_132369	<i>Neurospora crassa</i>	carboxypeptidase A1	1,00E-141
Glycoside hydrolase, family 47	OG5_149768	<i>Neurospora crassa</i>	mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase	1,00E-149
CFEM domain-containing protein	OG5_180741	<i>Neurospora crassa</i>	hypothetical protein	3,00E-12
family S53 protease	OG5_130135	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	n/a	1,00E-114

5 DISCUSSÃO

Os fungos artropodopatogênicos vêm recebendo grande atenção como agentes de controle para uma diversidade de pragas (FARIA & WRAIGHT, 2007; FERNANDES et al., 2008; STAFFORD & ALLAN, 2010; GRELL et al., 2011; BITTENCOURT et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016). A avaliação da secreção de proteínas mimetizando o processo de infecção pode revelar estratégias utilizadas e componentes secretados pelo fungo que possam ser responsáveis pelo sucesso da colonização do hospedeiro. O emprego de técnicas específicas que visem elucidar a interação patógeno-hospedeiro a nível molecular é de grande interesse, uma vez que ajudam na obtenção de isolados com maior eficiência no processo de patogenicidade contra pragas alvos.

Neste trabalho, mais de 200 proteínas secretadas durante a condição indutora do sistema de infecção do fungo filamentoso *B. bassiana* foram identificadas. A análise mais detalhada destas proteínas quanto à sua provável função no processo patogênico e de reconhecimento e manipulação do hospedeiro é descrita a seguir.

Os fungos patogênicos de artrópodes secretam enzimas hidrolíticas para que possam transpor a cutícula do hospedeiro, primeira barreira a ser vencida, iniciando o ciclo de infecção (GRELL et al., 2011; KORDI et al., 2015). Além de conter proteínas, a cutícula do hospedeiro contém quitina e uma camada lipídica, mais externa (CLARKSON & CHANRLEY, 1996; SILVA et al., 2010). Portanto, o sucesso da infecção depende da ação sinérgica de diversas enzimas, incluindo lipases, proteases e quitinases.

Dentre as proteínas identificadas como exclusivas e positivamente reguladas no secretoma da condição artificial de infecção, proteases com diferentes mecanismos de ação puderam ser identificadas, tais como: peptidases, carboxipeptidases e metaloproteases. As proteases são fundamentais para a infecção, uma vez que a cutícula apresenta uma camada espessa de proteínas. Assim, estas enzimas são responsáveis não só por auxiliar a transpor a carapaça, mas também pela absorção dos nutrientes na hemolinfa (KORDI et al., 2015). A protease bassiasina I foi identificada como

positivamente regulada na condição de infecção. Esta enzima pertence ao grupo das serino proteases, homóloga às proteases Pr1 de *M. anisopliae* e *B. bassiana* e à proteinase K de *Tritirachium*, todos fungos entomopatogênicos (KIM et al., 1999). Em outro trabalho de secretoma de *M. anisopliae*, Beys-da-Silva et al. (2014) identificou a protease Pr1 também como positivamente regulada em condição de infecção, corroborando os resultados apresentados aqui. Isto sugere que os padrões de expressão destas diferentes proteases identificadas aqui resultam como fortes indicativos do importante papel que estas enzimas têm em degradar a cutícula (GRELL et al., 2011; BEYS-DA-SILVA et al., 2014; KORDI et al., 2015).

Outras enzimas relacionadas com a degradação de constituintes da cutícula foram também identificadas: ceramidase e lipase, ambas exclusivas e positivamente regulada em meio contendo cutícula, respectivamente. Esta lipase, homóloga a Lip1 de *Stagonospora nodorum*, fungo fitopatogênico, parece não ser somente importante para a adesão de conídios à superfície do hospedeiro, mas também durante a germinação, aquisição nutrientes, sinalização e infecção (FENG et al., 2011). O fungo *M. anisopliae*, que também possui a capacidade de infectar carrapatos, secreta lipases diretamente sobre o hospedeiro (BEYS-DA-SILVA et al., 2010), comprovando o papel destas enzimas no processo de infecção. Já as quitinases foram encontradas tanto reguladas positivamente quanto negativamente. Estas enzimas têm um papel essencial no remodelamento da parede celular fúngica, bem como na patogênese, como uma estratégia de ataque, aquisição de nutrientes e de defesa contra artrópodes (XIAO et al., 2012; JUNGES et al., 2014). E, assim como *M. anisopliae*, *B. bassiana* produz diversas quitinases. Algumas podem ser importantes para morfogênese, enquanto outras são importantes para a patogênese, o que explica esta diferença de expressão.

Proteínas com possível relação com a adesão e patogênese também foram detectadas: a proteína contendo o domínio fasciclina e a proteína antigênica de parede celular. O domínio fasciclina é considerado muito antigo e está associado ao processo de adesão celular (XIAO et al. 2012), sendo comum a diversos organismos. Por exemplo, em *Magnaporthe oryzae*, fungo fitopatogênico de arroz, esta proteína estaria envolvida com conidiação e patogenicidade (LIU et al. 2009). Já a proteína antigênica é considerada

altamente hidrofóbica e possivelmente auxilia o fungo durante a adesão e interação do fungo com a cutícula (OHTAKI et al., 2006; XIAO et al., 2012). Outra proteína, que contém o domínio CFEM, rico em cisteína, parece ter função na patogênese fúngica e poderia atuar também como efetora ou sinalizadora (KULKARNI et al., 2003; VAKNIN et al., 2014). Proteínas de parede celular (CWP) estão presentes nos conídios e hifas e podem atuar na morfogênese e no aumento da hidrofobicidade, favorecendo a adesão e a patogenicidade fúngica (LI et al., 2010). Recentemente, uma CWP de conídio de *M. anisopliae* foi clonada em *B. bassiana*, o que levou ao aumento da hidrofobicidade e adesão, evidenciando o papel destas proteínas no início da infecção (LI et al., 2010).

Uma vez que os fungos iniciam o processo de infecção nos artrópodes, o sistema imune do hospedeiro é ativado, provocando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DOU et al., 2012). Em contrapartida, o fungo produz enzimas para proteção contra estas EROs. Uma vez a parede celular dos fungos faz o contato inicial com tecidos do hospedeiro, fatores de virulência e proteínas de resposta ao estresse são ativados (LIANG et al., 2013; QIN et al., 2014; TONG et al., 2016). Aqui, diversas proteínas com função de detoxificação e manipulação do estado redox foram identificadas no secretoma de *B. bassiana*. A proteína dihidrolipolil desidrogenase, exclusiva do secretoma de infecção, estaria envolvida no processo de proteção contra a radiação UV e atividade antioxidante (XIAO et al., 2012; MOON et al., 2015). Proteínas com domínio WSC podem estar associadas a sinais de estresse, bem como adaptação fúngica a diferentes hospedeiros artrópodes e nematoides (LIANG et al., 2013; SEN-MIAO et al., 2016; TONG et al., 2016). Proteínas com domínios conservados – WSC e CFEM – foram identificadas no fungo de nematoides, *Arthrobotrys oligospora*, onde foram relacionadas com a morfogênese e a virulência do fungo (LIANG et al., 2013). Proteínas clássicas relacionadas ao processo de detoxificação, como catalase e FAD-oxidoreduases, foram também identificadas exclusivamente no secretoma de infecção, assim como no secretoma de *M. anisopliae* (BEYS-DA-SILVA et al., 2014). Além de sua função como detoxificadoras e resposta a estresse, há evidências de que estas as enzimas sejam importantes em muitos aspectos da vida fúngica, incluindo infecção, formação de estruturas específicas, processos

ecológicos, comunicação celular e sinalização (TUDZYNSKI et al., 2012). Interessantemente, um mutante de *B. bassiana* superexpressando uma catalase apresentou aumento da germinação e virulência contra larvas de mariposa (CHANTASINGH et al., 2013), sugerindo que a resposta mediada por proteínas relacionadas à detoxificação ou estresse tem papel importante no processo de infecção e sua manipulação poderia aumentar a eficiência fúngica no controle biológico.

No trabalho de BEYS-DA-SILVA et al., (2014), foi sugerido que algumas proteínas sem função aparente no processo patogênico clássico poderiam atuar como efetores. Efetores extracelulares são definidos como pequenas moléculas e proteínas secretadas por patógenos que atuam diretamente no hospedeiro, alterando a estrutura, o metabolismo e a função no local da interação (WAWRA et al., 2012). Alguns efetores conhecidos foram identificados, tanto neste trabalho quanto no secretoma de *M. anisopliae* (BEYS-DA-SILVA et al., 2014): glicosil hidrolases (GHs), proteases, EROs, entre outras. Este resultado novamente mostra que o processo patogênico dos dois fungos é muito similar. Em relação às GHs, foi sugerido que o fungo patogênico de nematoides, *Arthrobotrys oligospora*, secreta estas enzimas para a formação do *trap*, estrutura em forma de anel que agarra o hospedeiro, sendo, portanto, consideradas efetoras, alterando a dinâmica da parede celular fúngica (LIANG et al., 2013).

Para validar as proteínas identificadas no secretoma como sendo realmente secretadas pelo fungo durante o cultivo em meio indutor, utilizamos diversas ferramentas de bioinformática. Aproximadamente 53% das proteínas diferencialmente reguladas no secretoma de infecção (*up/down* e exclusivas) parecem ser secretadas por pelo menos um dos 3 programas utilizados de predição. Segundo Beys-da-Silva et al. (2014), este valor está de acordo com a média da maioria secretomas fúngicos descritos até o momento. Além disso, algumas proteínas identificadas como não secretadas, como metaloprotease e carboxipeptidase, podem estar usando rotas não clássicas, tais como vesículas. As vesículas fúngicas são conhecidas por conter diversas proteínas que não possuem peptídeo-sinal e proteínas tipicamente consideradas como citoplasmáticas (McCOTTER et al., 2016). A função destas proteínas no processo patogênico ainda precisa ser investigada.

Como o secretoma de *B. bassiana* apresentou oito proteínas hipotéticas, foi realizada a busca por ortólogos, a fim de auxiliar na identificação destas. Diversas proteínas ortólogas foram encontradas com correspondências em fungos, especialmente com *Fusarium graminearum*, um fitopatógeno. O processo de infecção entre fungos fito- e artropodopatogênicos é muito similar, tanto no aspecto molecular como estrutural, comprovando que o sistema é conservado evolutivamente (BEYS-DA-SILVA et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

Como fungo artropodopatogênico, *B. bassiana* tem um amplo espectro de hospedeiros e, talvez, algumas proteínas únicas identificadas aqui, podem ter papel importante no reconhecimento por um inseto ou artrópode específico que possam ser requeridos para adaptação aos mais variáveis habitats dos hospedeiros (WANG et al., 2016). Neste trabalho, identificamos de maneira ampla e inédita, centenas de proteínas com potencial diferencial de participação em diferentes aspectos da infecção do carrapato bovino. Através destes resultados, o entendimento molecular da infecção de *B. bassiana*, ainda muito pouco caracterizado, foi ampliado de forma considerável, e isso contribuirá futuramente na otimização do biocontrole. Estes dados podem ser utilizados para seleção racional de isolados fúngicos mais eficientes e desenvolvimento de melhores formulações para o controle específico do carrapato bovino *R. microplus*.

REFERÊNCIAS

ALVES, S.B., **Controle microbiano de insetos**. ESALQ, Piracicaba, SP. p.1163, 1998.

ANAND, R.; PRASAD, B.; TIWARY, B.N. **Relative suscetibility of *Spodoptera litura* pupae to selected entomopathogenic fungi**. Journal Biocontrol, v.54, p.85-92, 2009.

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

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

BITTENCOURT, V.R.E.P., PINHEIRO, E., MASSARD, C.L., De LIMA, A.F., **Ação do Fungo *Metarhizium Anisopliae* em ovos e larvas do Carrapato *Boophilus Microplus***. Revista de Ciências da Vida, v.16, p. 41-47, 2015.

BEYS-DA-SILVA, W.O., SANTI, L., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, A. **Biocontrol of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* by the acaricidal fungus *Metarhizium anisopliae***. In Ticks: Disease, Management and Control; Woldemeskel, M., Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, p. 217-246, 2012.

BEYS-DA-SILVA, W.O, SANTI, L., BERGER, M., CALZOLARI, D., PASSOS, D.O., GUIMARÃES, J.A., MORESCO, J.J., YATES, J.R. **Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection**. Journal of Proteome Research, v.13(5), p.2282-2296, 2014.

BUENO, V.H.P. **Controle Biológico de Pragas: produção em massa e controle de qualidade**. Editora UFLN, 2º ed., p.429, 2009.

CHANDLER, D., BAILEY, A.S., TATCHELL, G.M., DAVIDSON, G., GREAVES, J.,GRANT, W.P. **The development, regulation and use of biopesticides for Integrated Pest Management**. Philosophical Transactions of the Royal Society B, v.366 1987-1998, 2011.

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

CLARKSON, J.M., CHARNLEY, A.K. **New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects.** Trends in Microbiology, v.4, p.197-204, 1996.

COUTINHO, R.C.J.B., PERINOTTO, W.M.D.S., BEYS DA SILVA, W.O., SANTI L., BERGER M., MARCIANO, A.F., DE SÁ F.A., NOGUEIRA, M.R.D.S., QUINELATO, S., BITTENCOURT V.R.E.P. **Virulence, proteolytic and lipolytic activities of Brazilian *Beauveria bassiana* s.l. isolates (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Rhipicephalus microplus* ticks (Acari: Ixodidae).** Biocontrol Science and Technology, v.26, P: 2, 2016.

DOU, D., ZHOU, J. M. **Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground.** Cell Host Microbe, v.12(4), p. 484–495. 2012

FARIA, M.R. de, WRIGHT, S.P. **Mycoinsecticides and Mycoacaricides: comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types.** Biological Control, v. 43(3), p. 237-256, 2007.

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

FERNANDES, É.K.K, BITTENCOURT, V.R.E.P. **Entomopathogenic fungi against South American tick species.** Experimental and Applied Acarology, v. 46(1-4), p.71-9, 2008.

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

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

FERNANDES, E.K.K., RANGEL, D.E.N., MORAES, A.M.L, MORAES, D.W., BITTENCOURT, V.R.E.P. **Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*.** Journal of Invertebrate pathology, v. 98, p. 69 – 78, 2008.

FERREIRA, J.F.; MARQUES, E.J.; MARQUES, I.M.R.; OLIVEIRA, J.V.; SANTOS JÚNIOR, H.J.G. **Efeito de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin sobre ovos de *Alabama argillacea* (Hüner) (Lepidoptera: Noctuidae).** Magistra, v.17, p.119-123, 2005.

FURLONG, J., MARTINS, J.R.S., PRATA, M.C.A. **Controle estratégico do carrapato dos bovinos.** A Hora Veterinária, v.23, p.53–56, 2004.

GINSBERG, H.S., LEBRUN, R.A., HEYER, K., ZHIOUA, E. **Potential nontarget effects of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) used for biological control of ticks (Acari: Ixodidae).** Environmental Entomology, v. 31, p.1191–1196, 2002.

GOETTEL, M.S., EILENBERG, J., GLARE, T. **Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations.** In: **Comprehensive Molecular Insect Science.** Elsevier, p. 361–405, 2005.

GONÇALVES, V. M, HUERTA, M.M., FREITAG, R.A. **Potencial de plantas acaricidas no controle de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** Revista. Ciência. Veterinária e Saúde Pública, v. 3, n. 1, p. 014-022, 2016.

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

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

JUNGES, A., BOLDO, J. T., SOUZA, B. K., GUEDES, R. L. M., SBARAINI, N., KMETZSCH, L., THOMPSON, C.E., STAATS, C.C., ALMEIDA, L. G. P., VASCONCELOS, A.T. R., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, A. **Genomic analyses and transcriptional profiles of the glycoside hydrolase family 18 genes of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** PLoS ONE, v.9 (9): e107864, 2014.

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

KIM, J.S., JE, Y.H., WOO, E. **Roles of adjuncts in aphicidal activity of enzymes from *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) SFB-205 supernatant.** Journal of Asia-Pacific Entomology, v. 13(4), p.345-350, 2010.

KIM, JJ, JEONG, G., HAN, J.H., Lee, S. **Biological Control of Aphid Using Fungal Culture and Culture Filtrates of *Beauveria bassiana*.** Mycobiology. V. 41(4), p.221-224, 2013.

KLAFKE, G., WEBSTER, A., DALL AGNOL, B., PRADEL, E., SILVA, J., DE LA CANAL, L.H., BECKER, M., OSÓRIO, M.F., MANSSON, M., BARRETO, R., SCHEFFER, R., SOUZA, U.A., CORASSINI, V.B., DOS SANTOS, J., RECK, J., MARTINS, J.R. **Multiple resistance to acaricides in field populations of**

***Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil.** Ticks Tick Borne Disease, 2016.

KOCACEVIK, S., SEVIM, A., EROGLU, M., DEMIRBAG, Z., DEMIR, I. **Molecular characterization, virulence and horizontal transmission of *Beauveria pseudobassiana* from *Dendroctonus micans* (Kug.) (Coleoptera: Curculionidae).** Journal of Applied Entomology, v.139 (5), p. 381(9), 2015.

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

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

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

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

LIU, T-B, CHEN, G-Q, MIN, H., LIN, F-C. **MoFLP1, encoding a novel fungal fasciclin-like protein, is involved in conidiation and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*.** Journal of Zhejiang University Science B, v. 10(6), p. 434–444, 2009.

MANALIL NS, JUNIOR TEO VS, BRAITHWAITE K, BRUMBLEY S, SAMSON P, HELENA NEVALAINEN KM. **Comparative analysis of the *Metarhizium anisopliae* secretome in response to exposure to the greyback cane grub and grub cuticles.** Fungal Biology, v.114 (8), p. 637-645, 2010.

MASCARIN, G.M, JACKSON, M.A, KOBORI, N., BEHLE, N., WARREN, R. JÚNIOR, I.D. **Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains.** Journal of Invertebrate Pathology, v.127,p.11–20, 2015.

MARTINS, I.C.F., SILVA, R. J., ALENCAR, J.R.D.C.C., SILVA, K. P., CIVIDANES, F. J., DUARTE, R. T., AGOSTINI, L. T., POLANCZYK, R. A. **interactions Between the entomopathogenic fungi (Ascomycota: Hypocreales) *Beauveria bassiana* and the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Braconidae) on *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae).** Journal of Economic Entomology, v.107 (3), p.933-938, 2014.

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

MELO, D.R., REIS, R.C.S, BITTENCOURT, V.R. **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, p.157-162, 2006.

MOON, E., HAN, N.Y PARK, H.M., LEE, C.H., DO, S.G., PARK, J.M., PARK, HAN., N.Y., DO, M.H., LEE, J.H., LEE, H., KIM, S.Y. **Dihydrolipoyl dehydrogenase as a potential UVB target in skin epidermis; using an integrated approach of label-free quantitative proteomics and targeted metabolite analysis**. Journal of Proteomics, v. 117, p.70 - 85, 2015.

MONTEIRO, C.M.O., ARAÚJO, L.X., GOMES, G.A., SENRA, T.O.S., CALMON, F. , DAEMON, E., CARVALHO, M. G., BITTENCOURT, V.R.E.P., FURLONG, J., PRATA, M. C. A. **Entomopathogenic nematodes associated with essential oil of *Lippia sidoides* for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. Parasitology Research, v.113, p.189–195, 2014.

OHTAKI, S., MAEDA, H., TAKAHASHI, T., YAMAGATA, Y., HASEGAWA, F., GOMI, K., NAKAJIMA, T., ABE, K. **Novel hydrophobic surface binding protein, HsbA, produced by *Aspergillus oryzae***. AppliaionEnvironmental Microbiology, v. 72, p. 2407-2413, 2006.

PERINOTTO, W.M.S., ANGELO, I.C., GÔLO, P. S., CAMARGO, M.G., SÁ, F.A., MONTEIRO, C.M.O., RODRIGUES, C.J.B.C., QUINELATO, S., MARCIANO A.F., BITTENCOURT, V.R.E.P. **Eficiência da formulação comercial de *Beauveria bassiana* no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições laboratoriais**. Revista Brasileira Medicina Veterinária, v.3, p.95-101, 2012.

PERINOTTO, W.M.S., ANGELO, I.C., GÔLO, P. S., CAMARGO, M.G., SÁ, F.A., BITTENCOURT, V.R.E.P. **Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi**. Experimental Parasitology.v. 130, p. 257-260, 2012.

POSADAS, J.B., LECUONA, R. E. **Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**. Journal Medical Entomology, v. 46(2), p. 284-291, 2009.

QIN, Y., URQUIZA, A.O., KEYHANI, N.O. **A putative methyltransferase, mtrA, contributes to development, spore viability, protein secretion and virulence in the fungus *Beauveria bassiana***. Microbiology, v.160, p: 2526–2537, 2014.

RYAN, R.P., GERMAINE, K., FRANKS, A., RYAN, D.J., DOWLING, D.N. **Bacterial endophytes: recent developments and applications**. FEMS Microbiology Letters. v.278, p.1-9, 2008.

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

RUSTIGUEL, C.B., ROSA, J.C., JORGE, J.A., DE OLIVEIRA, A.H., GUIMARÃES, L.H. **Secretome Analysis of *Metarhizium anisopliae* Under Submerged Conditions Using *Bombyx mori* Chrysalis to Induce Expression of Virulence-Related Proteins.** Current Microbiology, v. 72(2), p. 220-227, 2016.

SAFAVI, S.A. **Attenuation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* following serial in vitro transfers.** Biologica. v. 6, p. 1062-1068, 2012.

SAMISH, L.M., GINSBERG, H., GLAZER I. **Biological control of ticks.** Parasitology, v.129, p. S389–S403, 2004.

SANTI, L. **Relação patógeno-hospedeiro: análise bioquímica e proteômica da interação do fungo *Metarhizium anisopliae* e seus hospedeiros artrópodes.** Tese, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SANTI, L., SILVA, W.O.B, BERGER, M., GUIMARÃES, J.A., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. **Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection.** Research in Microbiology, v. 160, p. 824-828, 2009.

SANTI, L., SILVA, W. O. B., BERGERA, M., GUIMARÃESA, J. A., SCHRANK, A., VAINSTEIN M.H. **Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis.** Toxicon, v.55(4), p.874-80, 2010.

SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. ***Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins.** Toxicon, v. 56, p.1267-1274, 2011.

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

SHAH, P.A., PEEL, J.K. **Entomopathogenic fungi as biological control agents.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.61, p.413-423, 2003.

SHANG, Y.F, DUAN, Z.B, HUANG, W., GAO, Q., WANG, C.S. **Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene.** Journal Invertebrat Pathology, v.109, p.105–109, 2012.

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

SILVA, W.O.B. **O complexo lipolítico de *Metarhizium anisopliae* e sua relação com o processo de infecção de hospedeiros artrópodes**. Tese, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

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

SOUZA, D.A.L, DIAS, L.A., JÚNIOR, H.B.P., SOARES, S.F., FERRI, P.H. RIBAS, P., LIMA, E.M., FURLONG, J., BITTENCOURT, V.R.E.P., PERINOTTO, W.M.S., BORGES, L.M.F. **Potential synergistic effect of *Melia azedarach* fruit extract and *Beauveria bassiana* in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in cattle infestations**. Veterinary Parasitology, v. 320–324, 2011.

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

TONG, S-M., CHEN, Y., ZHU, J., YING, S-H., FENG, M-G. **Subcellular localization of five singular WSC domain-containing proteins and their roles in *Beauveria bassiana* responses to stress cues and metal ions**. Environmental Microbiology Reports, v. 8(2), p. 295–304, 2016.

TUDZYNSKI, P., HELLER, J., SIEGMUND, U. **Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis**. Current Opin Microbiology, v.15 (6), p. 653–659, 2012.

VAKNIN, Y., SHADKCHAN, Y., LEVDANSKY, E., MOROZOV, M., ROMANO, J., OSHEROV, N. **The three *Aspergillus fumigatus* CFEM-domain GPI-anchored proteins (CfmA-C) affect cell-wall stability but do not play a role in fungal Virulence**. Fungal Genetics and Biology, v. 63, p. 55–64, 2014.

WANG, Z-K, WANG, J., LIU, J., YING, S-H, PENG, X-J, FENG, M-G. **Proteomic and Phosphoproteomic Insights into a Signaling Hub Role for Cdc14 in Asexual Development and Multiple Stress Responses in *Beauveria bassiana***. PLoS ONE, v. 11(4), p. e0153007, 2016.

WAWRA, S., BELMONTE, R., LOBACH, L., SARAIVA, M., WILLEMS, A., VAN WEST, P. **Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins**. Curr. Opin Microbiology, v. 15 (6), p. 685–691, 2012.

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

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

XIE, X.-Q., LI, F., YING, S.-H., FENG, M.-G. **Additive Contributions of Two Manganese-Cored Superoxide Dismutases (MnSODs) to Antioxidation, UV Tolerance and Virulence of *Beauveria bassiana*.** PLoS ONE, v. 7(1), p. e30298, 2012.

ZHANG, S., XIA, Y., KEYHANI, N. O. **Contribution of the *gas1* Gene of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*, Encoding a Putative Glycosylphosphatidylinositol-Anchored β -1,3-Glucanosyltransferase, to Conidial Thermotolerance and Virulence.** Applied and Environmental Microbiology, V. 77, p. 2676–2684, 2011.