

WENDEO FERREIRA DA SILVEIRA

**ATIVIDADE NEMATICIDA DE PROTEASES EXTRACELULARES DO
FUNGO NEMATÓGAFO *Arthrobotrys cladodes***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S587a
2018 Silveira, Wendeo Ferreira da, 1987-
Atividade nematocida de proteases extracelulares do fungo
nematógafo *Arthrobotrys cladodes* : / Wendeo Ferreira da
Silveira. – Viçosa, MG, 2018.
xi, 52f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Atividade enzimática. 2. Nematoides gastrintestinais.
3. Controle biológico. 4. Serina protease. 5. Caracterização
bioquímica. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

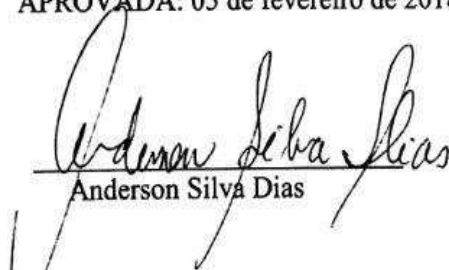
CDD 22 ed. 572.7

WENDEO FERREIRA DA SILVEIRA

**ATIVIDADE NEMATICIDA DE PROTEASES EXTRACELULARES DO
FUNGO NEMATÓGAFO *Arthrobotrys cladodes***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 05 de fevereiro de 2018.


Anderson Silva Dias


Artur Kanadani Campos


José Cola Zanuncio


Sílvia Almeida Cardoso


Leandro Licursi de Oliveira
(Orientador)

“Sei o que devo ser e ainda não sou, mas rendo graças a Deus por estar trabalhando, embora lentamente, por dentro de mim próprio, para chegar, um dia, a ser o que devo ser.”

Chico Xavier

À minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos, por sempre me guiar pelo melhor caminho e fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia.

À Universidade Federal de Viçosa, por me proporcionar a vivência acadêmica e possibilitar meu crescimento pessoal e profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou a realização do projeto e aperfeiçoamento profissional.

Ao professor, amigo e orientador Leandro Licursi de Oliveira pelo acolhimento no LIG, amizade, ótima convivência, incentivo e boa vontade em ensinar.

Ao professor Jackson Victor de Araújo, pela coorientação, amizade e boa vontade de ceder os fungos e os parasitos para realização deste trabalho.

Ao professor Jose Cola Zanuncio pelo auxílio e boa vontade de corrigir e ensinar a escrever artigos científicos.

Ao professor Sérgio Oliveira de Paula pela gentileza se ceder espaço no seu laboratório. Ao professor Artur Kanadani Campos pela amizade, ensinamentos e boa vontade em colaborar com minha formação.

Ao professor Eduardo de Almeida Marques da Silva pelos ensinamentos, amizade e momentos de descontração.

À professora Silvia de Almeida Cardoso pela amizade e boa vontade em ajudar.

Ao pesquisador Anderson Silva Dias pela amizade, momentos de descontração ensinamentos e por aceitar o convite para participar da defesa de tese.

A todos professores, servidores e amigos do Departamento de Medicina Veterinária.

A todos os professores, servidores e amigos do Departamento de Biologia Geral. Em especial a Elizabeth Alves Pena e Jorge Luis dos Santos pelo carinho, amizade, atenção e imensa boa vontade em resolver todos os problemas.

Aos meus amigos da pós-graduação Patrick Fernandes, Daniel Bastos, Christiane Duarte, Jerusa Oliveira, Thais Fialho, Sabrina Emerick, Adriana Carneiro, Patrícia Coelho, Maria Clara Nunes, Lucas Raony, Claudia Montoya, Gustavo Marin, Natasha Lagos, Marcelo Barcellos, Isabela Berbert, Ana Claudia Souza, Micaela Queiroz, Juliana Milani, Alessandra Teixeira, Lorendane Carvalho, Marisa Caixeta, Tiago Ayupe, Samuel Galvão, Josi Crispin, Victor Ferraz, Emilia Marques, Mariana Xisto e Livia Fidélis pela amizade, companheirismo e por dividirem experiências que possibilitaram meu crescimento pessoal e profissional.

À Fernanda Alves de Sousa pelo carinho e ajuda nos momentos finais.

À minha mãe Maria Helena Ferreira Silveira pelo amor incondicional, modelo e por sempre acreditar e apoiar minhas decisões.

Aos Meus irmãos Alirio, Aguinaldo, Aldair, Alan, Wallace e Weyller pelo carinho, amor e incentivo.

Em especial à Maria Lucia Cardoso e José Roberto Russo (Beto) pelo carinho, acolhimento e lições de vida.

Aos meus amigos da república Matadouro (Esteferson Duarte, Alison Freitas, Gustavo Faria, Gabriel Santos, Josias Paoli, Adam Widmer, Bruno Alves e Diego Magalhães) pela amizade, ótima convivência e companheirismo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1- Introdução geral	1
1.1- Fungos nematófagos	1
2. Mecanismos de infecção de fungos predadores de larvas	2
2.1 Atração.....	3
2.2 Adesão	3
2.3 Penetração	6
2.4 Degradação	7
3. Nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes	8
4. Ciclo biológico dos nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes.....	8
5. Controle biológico de formas de vida livre de nematoides parasitos gastrintestinais	10
6. Referências	11
7. Objetivos.....	17
7.1 Objetivo geral.....	17
7.2 Objetivos específicos	17
8. Capítulo 1	18
Nematicidal activity of extracellular proteases of the nematode-trapping fungi <i>Arthrobotrys cladodes</i>	18
ABSTRACT	18
INTRODUCTION	19
MATERIAL AND METHODS	19
Microorganisms and culture conditions	19
Predator activity of <i>Arthrobotrys cladodes in vitro</i>	20
Protease Purification	20

Enzymatic assay	21
Estimation of molecular mass of purified proteases.....	21
Zymogram and plate diffusion assay	21
Protein quantification.....	21
Effects of pH and temperature on enzymatic activity	22
Effect of inhibitors of proteases and metal ions on proteases.....	22
<i>In vitro</i> larvicidal activity	22
Statistical analysis.....	23
RESULTS	24
Predatory activity of <i>A. cladodes in vitro</i>	24
Kinetics of protease production from crude extract filtrate of <i>A. cladodes</i>.....	25
Protease purification.....	25
Zymogram and plate diffusion assay	27
Effects of pH and temperature on enzymatic activity	28
Effect of protease inhibitors and metal ions on AcPI and AcPII	29
Larvicidal activity of AcPI and AcPII	30
DISCUSSION.....	32
REFERENCES	34
9. Capítulo 2	38
Atividade de protease extracelular do fungo nematófago <i>Arthrobotrys cladodes</i> sobre a cutícula de larvas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes.....	38
Resumo	38
Introdução	39
Material e métodos	40
Purificação de protease extracelular de <i>A. cladodes</i>.....	40
Obtenção de larvas infectantes (L₃)	41
Atividade nematicida	41

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET)	41
Resultados.....	42
Purificação da protease	42
Atividade nematocida	43
Análise da cutícula das larvas infectantes por MEV	44
Análise da cutícula das larvas infectantes por MET	45
Discussão.....	47
Referências	49
10. Conclusões gerais.....	52

RESUMO

SILVEIRA, Wendeo Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Atividade nematocida de proteases extracelulares do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes***. Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Fungos nematófagos são controladores naturais de nematoides parasitos de plantas e animais. São amplamente usados no controle biológico de nematoides parasitos gastrintestinais (NPG) de ruminantes por reduzir formas de vida livre nas pastagens. O processo de captura de nematoides segue uma ordem de eventos que envolve atração, adesão, penetração e degradação da cutícula do nematoide. As fases de penetração e degradação, envolvem a produção e secreção de enzimas extracelulares capazes de hidrolisar a cutícula dos nematoides, causando sua morte. Proteases de *Arthrobotrys cladodes* (CG719) foram purificadas por cromatografia de troca aniônica (Mono Q) e gel filtração em coluna Protein-Pak em sistema HPLC. A atividade nematocida das proteases foi testada em larvas infectantes (L₃) de nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes. O efeito sobre a bainha e cutícula das larvas foi observado por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. As proteases purificadas chamadas de proteases de *Arthrobotrys cladodes* I (AcPI) e proteases de *Arthrobotrys cladodes* II (AcPII), têm massa molecular estimada de 56 e 39 kDa, respectivamente. A atividade enzimática dessas proteases foi maior em pH neutro a alcalino (7-8) e em temperaturas de 55 a 60°C. Ambas foram inativadas pelo inibidor fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) sugerindo pertencerem ao grupo das serina proteases. As proteases apresentaram maior atividade enzimática na presença do íon metálico Ca⁺². A fração de protease, purificada por cromatografia de troca aniônica, apresentou atividade larvicida provocando a morte de 53% das L₃ de NPG após 24 h de exposição. As AcPI e AcPII causaram mortalidade de 31 e 27% das L₃, respectivamente, após 24 h, sugerindo ação aditiva na degradação da cutícula dos nematoides. Na microscopia eletrônica de varredura e transmissão, foram observadas alterações morfológicas, descamações, danos na camada basal, epicutícula, “annulis”, “furrows”, “alae”, hipoderme, e musculatura. Em algumas regiões, a camada cortical foi inteiramente destruída. Lesões provocaram extravasamento de líquido intracelular e perda de tecido. Proteases extracelulares secretadas por *A. cladodes* foram eficientes na penetração e degradação da cutícula de nematoides. Estas enzimas romperam a integridade física e fisiológica da dupla cutícula

de L₃ de NPG. Isto pode permitir o desenvolvimento de fármacos para agir, diretamente, sobre helmintos ou, de forma sinérgica, com medicamentos comerciais.

ABSTRACT

SILVEIRA, Wendee Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Nematicidal activity of extracellular proteases of the nematophagous fungi *Arthrobotrys cladodes***. Advisor: Leandro Licursi de Oliveira.

Nematophagous fungi are natural enemies of parasitic nematodes of plants and animals. They are widely used in biological control of gastrointestinal nematodes (GIN) of ruminants by reducing free-living forms in pastures. The nematode capture process follows an order of events that involves attraction, adhesion, penetration and degradation of nematode cuticle. The phases of penetration and degradation, involve the production and secretion of extracellular enzymes capable of hydrolyzing the cuticle of the nematodes, causing their death. Proteases from *Arthrobotrys cladodes* (CG719) were purified by anion exchange chromatography (Mono Q) and gel filtration on a Protein-Pak column by HPLC system. The nematicidal activity of the proteases was tested in infective larvae (L3) of gastrointestinal parasitic nematodes of ruminants. The effect on the sheath and cuticle of the larvae were observed by scanning and transmission electron microscopy. The purified proteases called Proteases from *Arthrobotrys cladodes* I (AcPI) and Proteases from *Arthrobotrys cladodes* II (AcPII), have an estimated molecular mass of 56 and 39 kDa, respectively. The enzymatic activity of these proteases was higher at neutral to alkaline (7-8) pH and at temperatures of 55 to 60°C. Both were inactivated by the phenylmethylsulfonyl fluoride inhibitor (PMSF) suggesting that they belong to the serine proteases group. The proteases showed higher enzymatic activity in the presence of the Ca⁺² metal ion. The protease fraction, purified by anion exchange chromatography, showed larvicidal activity causing the death of 53% of L₃ from GINs after 24 h of exposure. AcPI and AcPII caused mortality of 31 and 27% of L₃, respectively, after 24 h, suggesting additive action in the degradation of the nematode cuticle. In scanning and transmission electron microscopy morphological changes, peeling, basal layer, epicuticle, annulis, furrows, alae, hypodermis, and musculature were observed. In some regions the cortical layer was entirely destroyed. Lesions caused extravasation of intracellular fluid and loss of tissue. Extracellular proteases secreted by *A. cladodes* were efficient in penetration and degradation of the nematode cuticle. These enzymes disrupted the physical and

physiological integrity L₃ of GIN double cuticle. This may allow the development of drugs to act directly on helminths or, synergistically, with commercial drugs.

1- Introdução geral

1.1- Fungos nematófagos

Fungos nematófagos podem ser encontrados em solos ricos em matéria orgânica, em todas as regiões do mundo, dos trópicos à Antártida (Nordbring-Hertz et al., 2006). Existem mais de 700 espécies de fungos relatadas com atividade nematicida (Van Ooij, 2011). No entanto, a maior parte são saprófitos ou predadores facultativos de nematoides (Swe et al., 2009; Zhang et al., 2016). Os gêneros nematófagos mais importantes para o controle biológico são *Arthrobotrys*, *Dactylellina*, *Drechmeria*, *Duddingtonia*, *Hirsutella*, *Fusarium*, *Nematophthora*, *Pochonia* e *Purpureocillium* (Siddiqui & Mahmood, 1996).

Fungos nematófagos são classificados com base no mecanismos de ataque a seus hospedeiros da seguinte forma: (1) pela produção de hifas modificadas em armadilhas para capturar larvas em movimento (fungos predadores); (2) pela produção de esporos que servem de alimento para nematoides (fungos endoparasitos); (3) os que colonizam e perfuram cascas de ovos e cistos de nematoides (fungos oportunistas ou predadores de ovos) e (4) produzem toxinas que imobilizam o nematoide antes da penetração das hifas (fungos tóxicos) (Nordbring-Hertz et al., 2006; Jiang et al., 2017).

Os fungos predadores de larvas compreendem um grupo heterogêneo de organismos, distribuídos dentro dos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota, utilizam diferentes tipos de armadilhas para capturar formas de vida livre de nematoides no ambiente (Nordbring-Hertz et al., 2006; Ahrén et al., 2008; Hyde et al., 2014;). Cerca de 380 espécies predadoras foram relatadas em diferentes regiões do mundo, os principais gêneros são *Arthrobotrys*, *Cystopage*, *Dactylellina*, *Dactylella*, *Drechslerella*, *Duddingtonia*, *Hohenbuehelia*, *Hyphoderma*, *Monacrosporium*, *Nematoctonus*, *Orbilina*, *Stylopage*, *Tridentaria*, *Triposporina*, e *Zoophagus* (Zhang et al., 2011).

Fungos predadores de larvas podem produzir diferentes tipos de armadilhas, tais como: redes adesivas bi e tridimensionais, botões adesivos, hifas adesivas, anéis constritores e não constritores (Fig. 1) (Nordbring-Hertz et al., 2006).

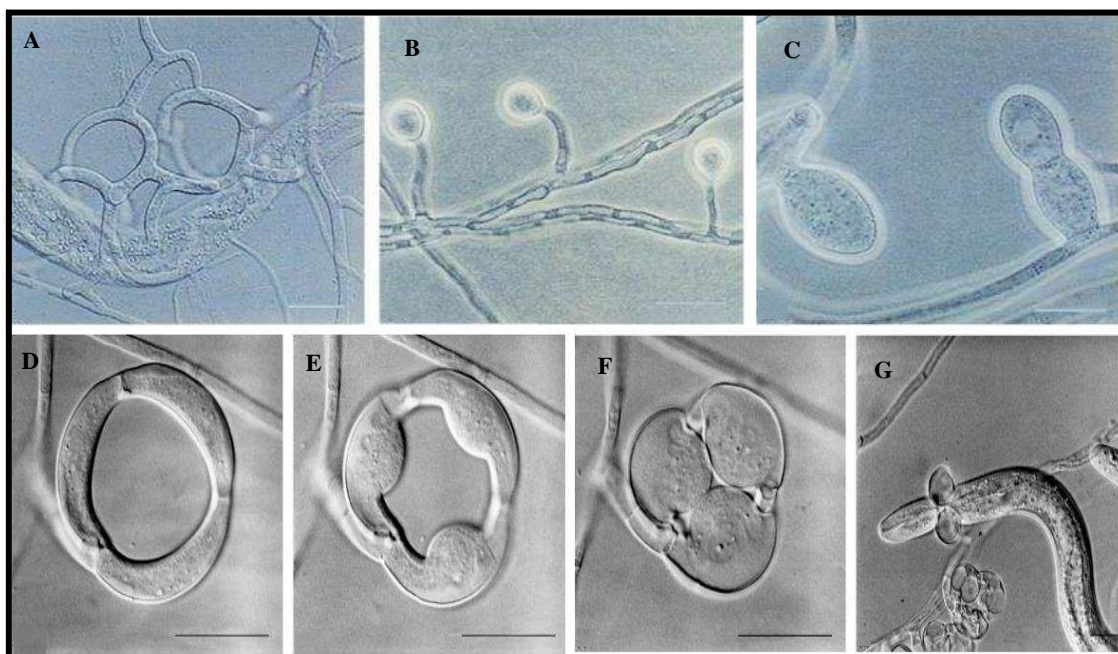


Figure 1. Diversidade de armadilhas de captura de nematoides. (A) Rede adesiva tridimensional de *A. oligospora*, digerindo nematoide; barra, 20µm. (B) Botões adesivos de *Monacrosporium haptotylum*; barra, 10µm. (C) Hifas adesivas de *Monacrosporium gephyropagum*; barra, 10µm. (D-F) Anel constritor de *Arthrobotrys brochopaga* formado por três hifas septadas que enchem de fluido quando estimuladas; barra 10µm. (G) Nematóide aprisionado de forma irreversível por anel constritor de *A. brochopaga*; barra 5 µm. Reproduzido e adaptado de Nordbring-Hertz et al., (2006).

Durante a transição entre a fase de vida saprófita e predadora, genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos, biogênese de parede celular e membrana são superexpressos (Yang et al., 2011). A ativação desses genes depende de fatores externos como a presença aminoácidos, CO₂, nematoides ou substâncias derivadas de suas culturas, como nemin (peptídeo de baixo peso molecular extraído da cultura de *Caenorhabditis elegans*), ascarosides (secretados constitutivamente pelos nematoides) e ácido abscísico (em vegetais) (Pramer & Kunyama 1963; Khan et al., 2008; Von Reuss et al., 2012, Su et al., 2017).

2. Mecanismos de infecção de fungos predadores de larvas

O processo de infecção dos nematoides por fungos predadores de larvas segue uma ordem de eventos que envolve atração, adesão, penetração e degradação do nematoide.

2.1 Atração

O mecanismo de infecção dos nematoides por fungos predadores é semelhante, apesar das diferenças morfológicas entre as espécies (Dijksterhuis et al., 1994). Diferente dos nematoides, os fungos não se movimentam ativamente, portanto, necessitam de mecanismos para atrair suas presas. Micélios e armadilhas de fungos predadores liberam compostos quimioatrativos no ambiente que podem ser percebidos pelos nematoides (Wu et al., 2013). Inicialmente a liberação de compostos voláteis por *Arthrobotrys oligospora* foi sugerido como responsável pela atração de *Panagrellus redivivus* para as armadilhas (Jansson e Nordbring-Hertz, 1980). Estudos bioquímicos de culturas de *Arthrobotrys entomopaga* produzindo botões adesivos, permitiram o isolamento e identificação de substâncias quimioatrativas chamadas paganin A e blumenol A (Fig. 2) (Wu et al., 2013; Degenkolb & Vilcinskas, 2016).

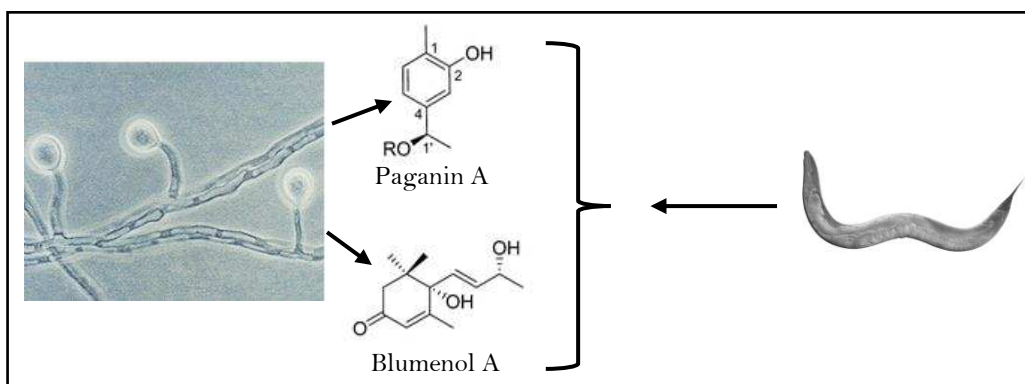


Figura 2. Mecanismos de atração de nematoides por fungos nematófagos. Adaptado de Nordbring-Hertz et al. (2006) e Wu et al. (2013).

2.2 Adesão

Proteínas presentes na membrana das hifas de fungos nematófagos são capazes de reconhecer e interagir com carboidratos da cutícula de nematoides, favorecendo a adesão ao hospedeiro. A primeira proteína estudada com essa propriedade foi uma lectina de baixo peso molecular encontrada em *A. oligospora* (AOL) (Nordbring-Hertz & Mattiasson, 1979; Rosén et al., 1992).

O interesse de estudar lectinas de fungos nematófagos surgiu a partir de observações da interação entre *A. oligospora* e *Panagrellus redivivus*. A ligação foi mediada por uma lectina fúngica, ligada especificamente a receptores de NAc-Gal (N-acetil-D-galactosamina) presentes na superfície dos nematoides (Nordbring-Hertz &

Mattiasson, 1979). A partir de então, vários experimentos foram realizados para identificar novas lectinas capazes de mediar a interação fungo-nematoide, encontrando lectinas com várias especificidades para diferentes carboidratos: glucose/manose (Glc/Man), N-acetilgalactosamina/galactose (NacGal/Gal), L-Fucose (L-Fuc) e ácido siálico (Tunlid et al., 1992).

Nas armadilhas formadas por fungos nematófagos do gênero *Arthrobotrys*, os autores relataram afinidade de ligação a N-acetil-D-galactosamina (Nordbring-Hertz & Mattiasson 1979), 2-Deoxy-D-glucose (Wharton & Murray 1990), D-Galactose/Manose (Rosenzweig & Ackroyd 1983, 1984).

Arthrobotrys spp. foram tratados com diferentes carboidratos e avaliados quanto à predação de larvas infectantes (L₃) de *Cooperia punctata*. Verificou-se inibição de captura das L₃, sugerindo envolvimento de lectinas que possuem no mínimo um domínio não catalítico capaz de estabelecer ligações hidrofóbicas altamente específicas de maneira reversível a um monossacarídeo ou oligossacarídeos, (D-Glicose, L-Sorbose, N-acetil-D- Galactosamina, N-acetil-D-Glicosamina, Sacarose, D-Arabinose e Maltose) Araújo, (2001).

Concomitante ao processo de adesão, há liberação de polímeros na superfície e uma camada fibrilar de substâncias adesivas que se orienta em posição perpendicular ao nematoide. Estes polímeros extracelulares são formados por carboidratos, ácido urônico e proteínas que recobrem a região de contato com o nematoide (Fig. 3) (Veenhuis et al., 1985; Tunlid et al., 1992).

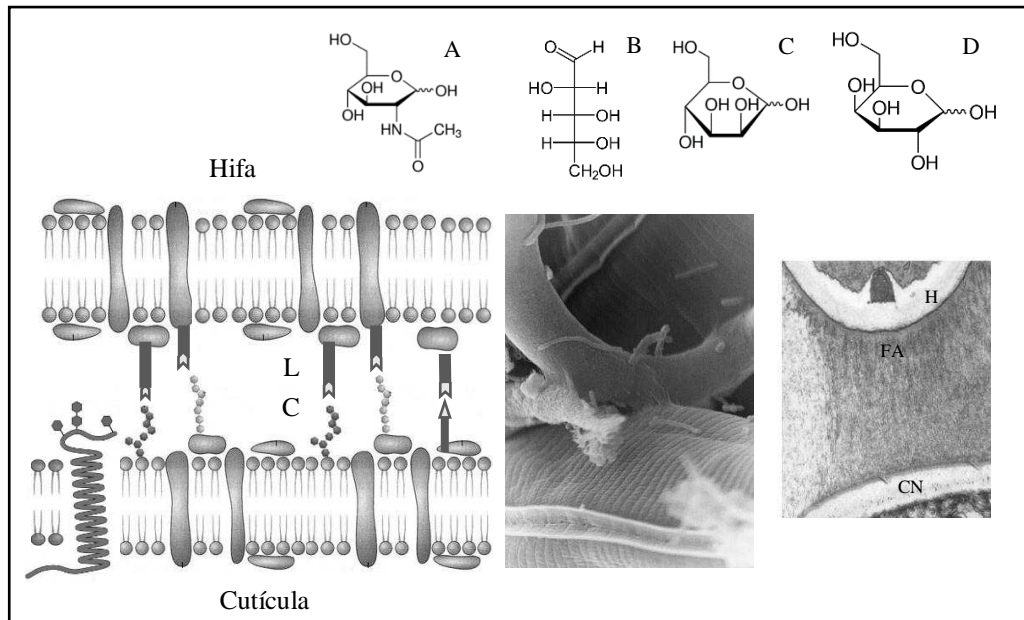


Figura 3. Modelo de interação fungo-nematoide. Proteínas na membrana das hifas de fungos nematófagos reconhecem e se ligam a carboidratos na cutícula de nematoides. (L) lectina, (C) carboidratos. Micrografia eletrônica de varredura de *A. oligospora* aderido a larva de *C. elegans*; magnificação: 475x.. Microscopia eletrônica de transmissão de *A. oligospora* depois de capturar nematoide, mostrando a substância fibrilar adesiva (FA) entre hifa (H) e a cutícula do nematoide (CN). A-D carboidratos identificados na cutícula de nematoides com capacidade de ligação a lectinas fúngicas. (A) N-Acetyl-D-glucosamina, (B) D-(-)-Arabinose, (C) D-(+)-Manose, (D) D-(+)-Galactose.

O fluxograma abaixo resume os principais eventos envolvendo a adesão de nematoides aos fungos predadores (Fig. 4).

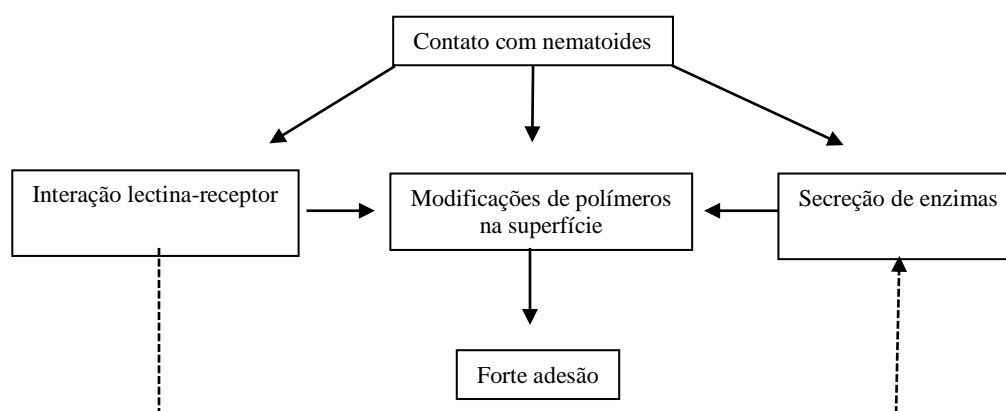


Figura 4: Principais alterações que levam a adesão de fungos nematófagos a nematoides. Modificado de Tunlid et al., 1992.

2.3 Penetração

Concomitante à adesão dos nematoides às armadilhas, os fungos iniciam alterações fisiológicas e morfológicas na estrutura do micélio formando um bulbo de infecção no qual são liberadas enzimas hidrolíticas (proteases, collagenases e quitinases) capazes de solubilizar macromoléculas da cutícula (Yang et al., 2013). Este evento é auxiliado por uma forte pressão mecânica gerada pelo crescimento micelial, terminando com a penetração do micélio no corpo do nematoide. O local de penetração é selado por substâncias adesivas mucilaginosas que evitam o extravasamento dos conteúdos dos nematoides para o ambiente (Veenhuis et al., 1985).

Uma característica do bulbo de infecção é a presença de corpos densos dentro da armadilha. Eles são rapidamente degradados após a penetração, sugerindo que contêm substâncias capazes de romper a integridade física e fisiológica da cutícula dos nematoides (Fig. 5) (Veenhuis et al., 1985; Dijksterhuis et al., 1994).

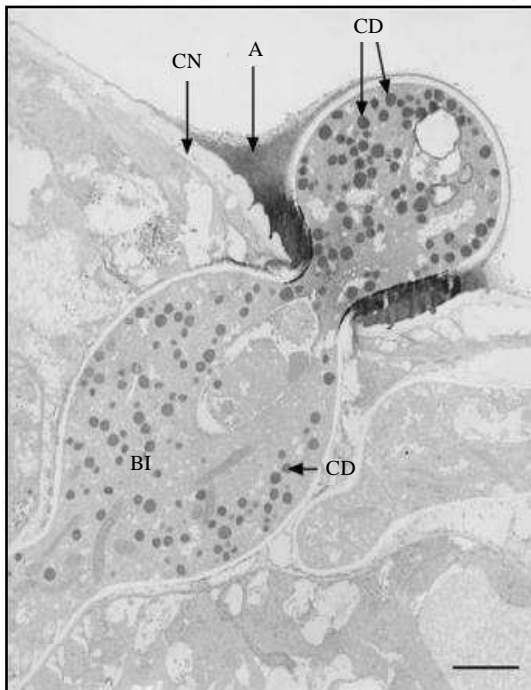


Figura 5: Microscopia eletrônica de transmissão da penetração da cutícula de nematoide pela hifa de *Arthrobotrys oligospora*. Corpos densos (CD) são visíveis na hifa trófica e no bulbo de infecção (BI). Substância adesiva mucilaginosa (A) entre o tubo de infecção e a cutícula do nematoide (CN), impede o extravasamento de conteúdo do nematoide. Adaptado de Nordbring-Hertz et al., (2006), barra 1 µm.

A cutícula dos nematoides é composta principalmente por colágeno, proteínas (cuticlínas), glicoproteínas e lipídios, (Page & Johnstone, 2007), isso sugere que as enzimas extracelulares liberadas durante a penetração sejam proteases. Muitas proteases capazes de hidrolisar proteínas da cutícula de nematoides foram isoladas, a grande maioria pertence à família de serina proteases. Após sequenciamento de *A. oligospora*, observou-se que elas têm uma alta homologia com o tipo de serina proteases de subtilisina. (Yang et al., 2011; Yang et al., 2013).

Existem mais de 20 serina proteases identificadas a partir de fungos predadores de larvas, *Arthrobotrys oligospora* (Tunlid et al., 1994; Zhao et al., 2004), *Arthrobotrys conoides* (Yang et al., 2007), *Monacrosporium sinense* (Soares et al., 2013), *Duddingtonia flagrans* (Braga et al., 2012); predadores de ovos/ovicidas, *Pochonia rubescens* (Lopez-Llorca, 1990) e *Pochonia chlamydosporia* (Serges et al., 1994) e endoparasitos, *Hirsutella rhossiliensis* (Wang et al., 2007, 2009). Todas apresentam alto grau de similaridade: são sensíveis ao inibidor fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), possuem maior atividade em pH neutro a alcalino, possuem massa molecular estimada entre 20 e 40 kDa, partilham atividade enzimática sobre vários substratos proteicos, incluindo caseína, gelatina, cutícula de nematoides, cascas de ovos de nematoides, albumina de soro bovino e colágeno (Tunlid et al., 1994; Yang et al., 2007; Soares et al., 2013).

2.4 Degradação

Após a penetração da hifa o nematoide é degradado e digerido completamente por enzimas hidrolíticas. Os corpos densos são degradados nas células da armadilha e no bulbo de infecção (Fig 5). Há armazenamento de gotículas lipídicas nas hifas tróficas, que provavelmente estão envolvidas na assimilação e armazenamento de nutrientes obtidos a partir da nematoide. Em *A. oligospora*, parte dos nutrientes derivados dos hospedeiros é armazenado no citoplasma para produção de lectinas (Nordbring-Hertz et al., 2006).

3. Nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes

O filo Nematelmintos possui seis classes, no entanto, apenas a classe nematoda contém vermes de importância parasitária. Os principais nematoides de importância veterinária pertencem às Superfamílias Trichostrongyloidea, Strongyloidea, Ancylostomoidea, Metastrongyloidea, Rhabditoidea, Ascaridoidea, Oxyuroidea, Spiruroidea, Filarioidea e Trichuroidea (Taylor, 2015). Os NPG mais prevalentes em ruminantes do Brasil pertencem às Superfamílias Trichostrongyloidea (*Haemonchus* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Ostertagia* spp.), Strongyloidea (*Chabertia* spp e *Oesophagostomum* spp.) e Ancylostomoidea (*Bunostomum* spp.).

Infecções concomitantes envolvendo múltiplas espécies de parasitos são comuns e afetam a saúde dos animais. Em ruminantes, podem causar letargia, perda de peso, diarreia, queda na produção de leite e lã. Além disso, espécies hematófagas são responsáveis por causar anemia, edema submandibular e ascite, devido à perda de sangue e/ou proteínas plasmáticas (Taylor, 2015).

O controle de NPG é feito com medicamentos anti-helmínticos, no entanto, há relatos de resistência parasitária às principais bases químicas comercializadas (Skrebsky et al., 2010). Deste modo, o controle biológico com fungos nematófagos e seus derivados tornam-se alternativa importante.

4. Ciclo biológico dos nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes

O ciclo biológico dos nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes é direto, dividido em fase parasitária e de vida livre (Fig. 6). As fêmeas dos parasitos realizam postura de ovos, que chegam ao ambiente através das fezes. No bolo fecal, em presença de umidade, aeração e temperatura adequada os ovos eclodem, liberando larvas de primeiro estágio (L₁), que posteriormente se desenvolvem em larvas de segundo estágio (L₂) (Amarante et al., 1996; Andersen et al., 1968). Durante este período, alimentam-se de microrganismos e armazenam reservas nutritivas. Posteriormente transformam-se em larvas infectantes (L₃) (Warton 1982; Amarante et al., 1996; Taylor et al., 2015).

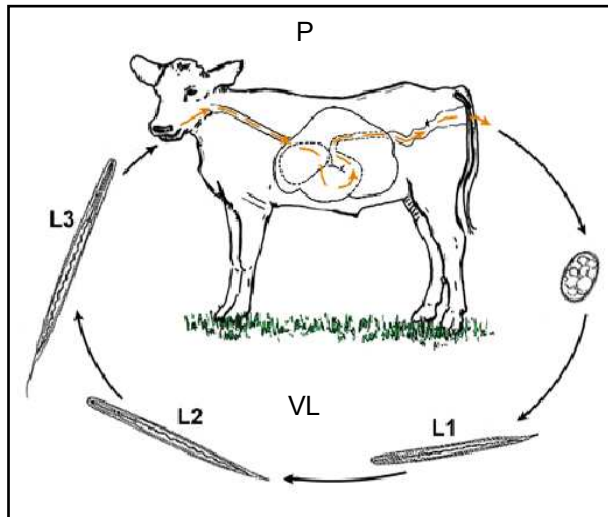


Figura 6: Ciclo biológico dos nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes. O ciclo é direto, dividido em fase parasitária (P), em que nematoides adultos habitam o sistema gastrintestinal do animal e fase de vida livre (VL) no ambiente, que vai desde a eclosão das larvas L₁ até se tornarem infectante L₃. Imagem disponível em: http://cal.vet.upenn.edu/projects/merialsp/Stongls/strong_6a1.htm. Acesso em 17/12/17.

O estágio infeccioso (L₃) é o resultado de uma muda incompleta, na qual uma nova cutícula é sintetizada a partir da lâmina basal, empurrando a cutícula velha para fora. No entanto, esta não se rompe, passa a ser chamada bainha, deste modo a ecdise não se completa. Líquido osmiofílico é secretado pelos poros na cutícula para preencher e hidratar as duas camadas. Em seguida todos os orifícios da larva são selados, com isso cessam processos de alimentação e excreção. A bainha da L₃ permite maior capacidade de resistência às condições ambientais (Bird & Bird, 1991; Lee, 2002).

Com o ressecamento do bolo fecal, as L₃ são forçadas a deixá-lo e migram para a pastagem próxima, movimentam-se em posição horizontal e vertical. Nos períodos de temperaturas amenas do dia alcançam a ponta das folhas da vegetação, podendo ser ingeridas pelos animais durante o pastoreio, dando início à fase parasitária do ciclo biológico (Andersen et al., 1968; Warton, 1982; Silveira et al., 2017a).

Após a ingestão, as L₃ alcançam o rúmen, passam para o abomaso e penetram na mucosa. Em resposta a estímulos do hospedeiro, como alta taxa de CO₂, ácido carbônico e pH, a larva libera fluido enzimático (leucina aminopeptidase), que dissolve a bainha permitindo a transformação para o estágio L₄. As L₄ retornam ao lúmen do abomaso e mudam para larvas de quinto estágio (L₅), o estágio adulto, diferenciado em macho e fêmea capazes de se reproduzir e liberar grande quantidade de ovos nas fezes (Rogers & Sommerville, 1968; Lee, 2002; Taylor, 2015).

5. Controle biológico de formas de vida livre de nematoides parasitos gastrintestinais

Fungos nematófagos são usados no controle biológico de nematoides dos animais domésticos para diminuir a disponibilidade de formas de vida livre (L₃) nas pastagens, além disso,

A técnica consiste em administrar estruturas fúngicas (micélio, conídios e clamidósporos) a alimentação dos animais. Isto pode ser feito pela incorporação dessas estruturas em grãos de cereais e blocos minerais (Waller et al., 2001), blocos energéticos (Sagüés et al., 2011) ou pélete de alginato de sódio (Silveira et al., 2017a).

Para ser considerado promissor no controle biológico de NG, as estruturas fúngicas devem suportar a passagem pelo TG dos animais, germinar no bolo fecal e capturar formas de vida livre (Silveira et al., 2017b). A captura e eliminação dos nematoides envolvem a produção de armadilhas, combinada com força mecânica e liberação de enzimas hidrolíticas extracelulares (serine proteases, collagenases e quitinases) que digerem a cutícula do nematoide (Nordbring-Hertz et al., 2006; Yang et al., 2013). Deste modo, os fungos realizam a higienização das pastagens e diminuem a recidiva de infecções (Silveira et al., 2017a)

6. Referências

- AMARANTE, A. F. T.; PADOVANI, C. R.; BARBOSA, M. A. Contaminação de pastagens por larvas de nematóides gastrintestinais parasitos de bovinos e ovinos em Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 5: 65-73, 1996
- ANDERSEN, F.L.; WANG, G.; LEVINE, N. D. Effect of desiccation on survival of the free-living stages of *Trichostrongylus colubriformis*. **Journal Nematology**, 54: 117-128, 1968.
- AHRÉN, D.; URSING, B. M.; TUNLID, A. Phylogeny of nematode trapping fungi based on 18S rDNA sequences. **FEMS Microbiology Letters**, 158:179–184, 1998
- ARAÚJO, J. V. Inibição de captura de larvas infectantes de *Cooperia punctata* por fungos do gênero *Arthrobotrys*, utilizando carboidratos e lectinas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 10: 1, 2001.
- BIRD, A. F.; BIRD, J. The structure of nematodes, 2^a, London: Academic Press, 1991
- BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; SOARES, F. E. F, GENIÊR, H. L. A.; QUEIROZ, J. H. An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. **Biocontrol Science and Technology**, 22:1131–1142, 2012.
- DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100: 9, 3799-3812, 2016.
- DIJKSTERHUIS, J.; VEENHUIS, M.; HARDER, W.; NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: physiological aspects and structure-function relationships. **Advances Microbiology and Physiology**, 36: 111-143, 1994
- HYDE, K. D.; SWE. A.; ZHANG, K. Q. Nematode-trapping fungi, p 1–12. In Zhang KQ, Hyde KD (ed), *Nematode-Trapping Fungi*. **Springer**, Dordrecht, The Netherlands. 2014.
- JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Interactions between nematophagous fungi and plantparasitic nematodes - Attraction, induction of trap formation and capture. **Nematologica**, 26:383- 389, 1980.

JIANG, X.; XIANG, M.; LIU, X. Nematode-Trapping Fungi. **Microbiology Spectrum**, 5: 1, 2017.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; SOON, J.; NEVALAINEN, H. K. M. Proteomic analysis of the knob-producing nematode-trapping fungus *Monacrosporium lysipagum*. **Mycological Research**, 112: 1447–1452, 2008.

LEE, D. L. The biology of nematodes. **Taylor & Francis**, 1^aed, 2002.

LOPEZ-LLORCA, L. V. Purification and properties of extracellular proteases produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. **Canadian Journal Microbiology**, 36: 530–537, 1990.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H. B.; TUNLID, A. Nematophagous Fungi. **Wiley Blackwell**, Hoboken, NJ. 2006

NORDBRING-HERTZ, B.; MATTIASSON, B. Action of a nematode-trapping fungus shows lectinmediated host-microorganism interaction. **Nature**, 281: 477-479, 1979.

PAGE, A. P.; JOHNSTONE, I. L. The cuticle WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, **WormBook**. 2007. Disponível em: <http://www.wormbook.org>.

PAZ-SILVA, A.; FRANCISCO, I.; VALERO-COSS, R. O.; CORTINASA, F. J.; SÁNCHEZ, J.A.; FRANCISCO, R.; ARIAS, M.; SUÁREZ, J. L.; LÓPEZ-ARELLANO, M. E.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MENDOZA-DE-GIVES, P. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. **Veterinary Parasitology**, 79: 277–282, 2011.

PRAMER, D.; KUYAMA, S. Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi - Nemin and nematode-trapping fungi. **Bacteriology Review**, 27: 282-292, 1963.

PRAMER, D. Nematode-trapping fungi: an intriguing group of carnivorous plants inhabit the microbial world. **Science**, 144: 382–388, 1964.

ROGERS, W. P.; SOMMERVILLE, R. I. The infectious process, and its relation to the development of early parasitic stages of nematodes. **Advances in Parasitology**, 6: 327–348, 1968

ROSÉN, S. E. K B.; RASK, L.; TUNLID, A. Purification and characterization of a surface lectin from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Journal of General Microbiology**, 138: 2663-2672, 1992.

ROSENZWEIG, W. D.; ACKROYD, D. Binding characteristics of lectins involved in the trapping of nematodes by fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, 46: 1093-1096, 1983.

ROSENZWEIG, W. D.; ACKROYD, D. Influence of soil microorganisms in the trapping of nematodes by nematophagous fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, 30, 1437-1439. 1984.

SAGÜÉS, M. F.; FUSÉ, L. A.; FERNÁNDEZ, A. S.; IGLESIAS, L. E.; MORENO, F. C.; SAUMELL, C. A. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. **Parasitology Research**, 109: 707-7013, 2011.

SEGERS, R.; BUTT, T. M.; KERRY, B R.; PEBERDY, J. F. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. **Microbiology**, 140: 2715–2723, 1994.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. **Bioresource Technology**, 58: 229–239, 1996.

SILVEIRA, W. F.; BRAGA, F. R.; TAVELA, A. O.; SANTOS, L. F.; DOMINGUES, R. R., AGUIAR, A. R.; ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi combinations reduce free-living stages of sheep gastrointestinal nematodes in the field. **Journal of Invertebrate Pathology**, 150: 1-5, 2017a.

SILVEIRA, W. F.; OLIVEIRA, G. D.; BRAGA, F R.; CARVALHO, L. M.; DOMINGUES, R. R.; SILVA, L. A.; ZANUNCIO, J. C.; ARAÚJO, J. V. Predation rate of nematophagous fungi after passing through the gastrointestinal tract of goats. **Small Ruminant Research**, 147: 101–105, 2017b.

SKREBSKY, A. C.; TOSCAN, G.; CAMILO, G.; SANGUIONI, L. A.; RIBAS, H. O.; VOGEL, F. S. F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 173: 157-160, 2010.

SOARES, F. E.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; GENIÈR HL, GOUVEIA AS, QUEIROZ, J. H. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. **Parasitology Research**, 112: 1557–1565, 2013.

SU, H.; ZHAO, Y.; ZHOU, J.; FENG, H.; JIANG, D.; ZHANG, K. Q.; YANG, J. Trapping devices of nematode-trapping fungi: formation, evolution, and genomic perspectives. **Biological Reviews**, 92: 1, 357-368, 2017.

SWE, A.; JEEWON, R.; POINTING, S. B.; HYDE, K. D. Diversity and abundance of nematode-trapping fungi from decaying litter in terrestrial, freshwater and mangrove habitats. **Biodiversity and Conservation**, 18:1695–1714, 2009.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. *Veterinary Parasitology*. **Wiley**, 4thed, 2015

TUNLID, A.; JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Fungal attachment to nematodes. **Mycological Research**, 96: 6 401-412, 1992.

TUNLID, A.; ROSEN, S. E. K. B.; RASK, L. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Microbiology**, 140:1687–1695, 1994.

VAN OOIJ, C. Fungal pathogenesis: Hungry fungus eats nematode. **Nature Reviews Microbiology**, 9: 766-767, 2011.

VEENHUIS, M.; NORDBRING-HERTZ, B.; HARDER, W. An electron-microscopic analysis of capture and initial-stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 51: 385-398, 1985.

VON REUSS, S. H.; BOSE, N.; SRINIVASAN, J.; YIM, J. J.; JUDKINS, J. C.; STERNBERG, P. W.; SCHROEDER, F. C. Comparative metabolomics reveals biogenesis of ascarosides, a modular library of small-molecule signals in *C. elegans*. **Journal of the American Chemical Society**, 134:1817-1824, 2012.

WALLER, P. J.; KNOX, M. R.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, 102:321–30, 2001.

WANG, B.; LIU, X.; WU, W. P.; LIU, X.; LI, S. Purification, characterization, and gene cloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode-endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis*. **Microbiology Research**, 164: 665–673, 2009.

WANG, B.; WU, W. P.; LIU, X. Z. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematicidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. **Mycopathologia**, 163:169–176, 2007.

WHARTON, D. A. The survival of desiccation by the free-living stages of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda: Trichostrongylidae). **Parasitology**, 84, 455–462, 1982

WHARTON, D. A.; MURRAY, D. S. Carbohydrate/laden interactions between the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* and the infective juveniles of *Trihostrongylus colubriformis* (Nematoda). **Parasitology**, 101: 101-106, 1990.

WU., D. K.; ZHANG, C. P.; ZHU, C. Y.; WANG, Y. L.; GUO, L. L.; ZHANG, K. Q.; NIU, X. M. Metabolites from carnivorous fungus *Arthrobotrys entomopaga* and their functional roles in fungal predatory ability. **Journal Agriculture Food and Chemistry**, 61: 4108-4113, 2013.

YANG, J. K.; LI, J.; LIANG, L. M.; TIAN, B. Y.; ZHANG, Y.; CHEN, C. M.; ZHANG, K. Q. Cloning and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys conoides*. **Archive Microbiology**, 188:167–174, 2007b.

YANG, J. K.; TIAN, B. Y.; LIANG, L. M.; ZHANG, K. Q. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 75: 21–31, 2007a.

YANG, J. K.; WANG, L.; JI, X. L.; FENG, Y.; LI, X. I. M.; ZOU, C. G.; XU, J. P.; REN, Y.; MI, Q. L.; WU, J. L.; LIU, S. Q.; LIU, Y.; HUANG, X. W.; WANG, H. Y.; NIU, X. M.; LI, J.; LIANG, L. M.; LUO, Y. L.; JI, K. F.; ZHOU, W.; YU, Z. F.; LI, G. H.; LIU, Y. J.; LI, L.; QIAO, M.; FENG, L.; ZHANG, K. Q. Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. **PLoS Pathogens**, 7:e1002179, 2011.

YANG, J.; LIANG, L.; LI, J.; ZHANG, K. Q. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 97: 7081–7095, 2013

ZHANG, L.; ZHOU, Z.; GUO, Q.; FOKKENS, L.; MISKEI, M.; PÓCSI, I.; ZHANG, W.; CHEN, M.; WANG, L.; SUN, Y.; DONZELLI, B. G.; GIBSON, D. M.; NELSON, D. R.; LUO, J. G.; REP. M.; LIU, H.; YANG, S.; WANG, J.; KRASNOFF, S. B.; XU, Y.; MOLNÁR, I.; LIN, M. Insights into adaptations to a near-obligate nematode endoparasitic lifestyle from the finished genome of *Drechmeria coniospora*. **Scientific Reports**, 6:23122, 2016.

ZHANG, Y.; LI, G.; ZHANG K. A review on the research of nematophagous fungal species. **Mycosystema**, 30:836–845, 2011

ZHANG, Y.; ZHANG, K. Q.; HYDE, K. D. The ecology of nematophagous fungi in natural environments, p 211–230. In Zhang KQ, Hyde KD (ed), *Nematode-Trapping Fungi*. **Springer**, Dordrecht, The Netherlands. 2014.

ZHAO, M. L.; MO, M. H.; ZHANG, K, Q. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Mycologia**, 96: 16–22, 2004.

7. Objetivos

7.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar proteases dos fungos *Arthrobotrys cladodes* isolado (CG719) com possíveis aplicabilidades nematicidas.

7.2 Objetivos específicos

- Purificar proteases extracelulares do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes*, isolado CG719;
- Identificar e caracterizar bioquimicamente proteases extracelulares do fungo nematófago *A. cladodes*, isolado CG719;
- Avaliar ação nematicida das frações purificadas do fungo sobre larvas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes;
- Analisar por microscopia eletrônica de varredura e transmissão os efeitos das proteases de *A. cladodes* sobre a cutícula de L₃ de ruminantes.

8. Capítulo 1

Nematicidal activity of extracellular proteases of the nematode-trapping fungi *Arthrobotrys cladodes*

ABSTRACT

Nematode-trapping fungi are natural enemies of plant and animal parasitic nematodes. These fungi produce traps to capture nematodes and release extracellular proteases degrading their cuticle allowing their hyphae to penetrating and causing host death. Proteases from *Arthrobotrys cladodes* (CG719) were purified in HPLC system. Purified proteases, named *Arthrobotrys cladodes* I (AcPI) and *Arthrobotrys cladodes* II (AcPII) proteases, have an estimated molecular mass of 56 and 39 kDa, respectively. These protease enzymatic activity were higher at neutral to alkaline pH and at temperatures from 55 to 60°C. Their inactivation by the phenylmethylsulfonyl fluoride inhibitor (PMSF) indicates that they belong to the serine protease group. Metal ions Ca^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} and Zn^{+2} did not inhibit protease activity. The protease fraction, purified by anion exchange chromatography, had larvicidal activity causing the death of 53% of infective larvae (L_3) of gastrointestinal nematodes after 24 h of exposure. The AcPI and AcPII killed 31 and 27% of the L_3 , respectively, after 24 h, suggesting an additive action on degrading the nematode cuticle. The biological activity of these two new *A. cladodes* proteases was characterized and confirmed. This may enable to developing drugs to act directly on helminths or, synergistically, with commercial ones.

Keywords: *Arthrobotrys cladodes*, enzymatic characterization, extracellular proteases, nematode-trapping fungi, serine proteases.

INTRODUCTION

Nematode-trapping fungi are biological control agents of nematodes in agricultural crops^{1,2,3} and those gastrointestinal (GIN) through the passage of fungal structures (conidia, chlamydospores and mycelium) by the gastrointestinal tract (GT) of domestic animals⁴. Fungi have been tested as drug-bearing nanoparticles against cancer⁵ and as secondary metabolites with antiviral activity⁶ and purification of chitinases and proteases with nematicidal activity^{2,7}.

Extracellular enzymes from nematophagous fungi degrade the nematode cuticle⁸. Serine proteases are the most studied and common in the large group of these microorganisms, including nematode-trapping fungi *Arthrobotrys oligospora*^{9,10}, *Arthrobotrys conoides*¹¹, *Monacrosporium sinense*¹², *Duddingtonia flagrans*¹³ nematode egg-parasitic (*Pochonia rubescens*¹⁴ and *Pochonia chlamydosporia*¹⁵) and endoparasites, *Hirsutella rhossiliensis*^{16,17}.

The nematode-trapping fungi *Arthrobotrys cladodes* uses three-dimensional adhesive networks to capture nematodes, but its action and production of extracellular enzymes need further studies.

The aim of this work was to identify and characterize extracellular proteases secreted by *Arthrobotrys cladodes* (isolate CG719) and to evaluate their biological activity to controlling infective larvae (L₃) of GIN *in vitro*.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms and culture conditions

The nematode-trapping fungi *Arthrobotrys cladodes* (isolate CG719), native to Brazilian soil, donated by Cenargen, was deposited in solid medium in test tubes with corn meal agar (2% CMA) at 4°C in the dark.

Culture discs (approximately 5 mm diameter) containing *A. cladodes* mycelium were transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks with culture medium¹⁸, modified. This medium was composed of casein (10 g/L), K₂HPO₄ (0.3 g/L), NaCl (0.3 g/L), MgSO₄ (0.3 g/L), ZnSO₄ (0.3 g/L) and yeast extract (0.2 g/L), pH 9.0. The flasks were shaken (120 rpm). Protease production was evaluated at two, five, 10, 15 and 20 days, the supernatant was collected, filtered on Whatman No. 1 filter paper and the enzymatic activity tested. The higher enzymatic activity period was standardized for crude extract

production which was stored at -80°C, lyophilized, and used in purification protocols, protease characterization and larvicidal activity.

Infective larvae (L₃) from GIN belong to the superfamilies Trichostrongyloidea (*Haemonchus* spp., *Cooperia* spp. and *Trichostrongylus* spp.) and Strongyloidea (*Oesophagostomum* spp.).

Predator activity of *Arthrobotrys cladodes* in vitro

The predatory activity of *A. cladodes* was evaluated⁴. Culture discs of approximately 5 mm diameter containing mycelium and conidia from *A. cladodes* were placed in the center of 9 cm Petri dishes containing 2% agar-water medium and the control group without fungus with three replications each. The plates were incubated in a BOD for 10 days at 25°C in the dark. At the end of this period, 1000 L₃ of GIN were added to the plates of the treated and control group and placed in a BOD under the same conditions for seven days. Afterwards, unpredated larvae were recovered by modified Baermann technique¹⁹ and the L₃ reduction percentage calculated²⁰.

Protease Purification

The crude extract lyophilized was resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 at a final concentration of 5 mg/ml, centrifuged at 10.000 x g/5 min and the supernatant collected and filtered on a 0.22 µm pore membrane (Millipore[®], Billerica, USA). The filtered crude extract was desalted on a Desalting Hitrap (GE Healthcare[®]) column, pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH: 7.5 flow 1 ml/min.

The desalted extract (10 ml) was supplemented with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 completing the volume to 60 ml and subjected to HiTrap Mono Q column 5/50 GL (GE, Healthcare[®]) equilibrated with buffer 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), flow 1 ml/min. The proteins, with enzymatic activity adsorbed to the column, were eluted in a linear gradient (0-1 M) in the same buffer containing 1M NaCl. Proteolytic activity fractions were concentrated in Amicon 10 kDa to the volume of 500 µl. The active fractions were subjected to exclusion chromatography in Protein-Pak column (7.8 mm x 300 mm, Waters) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.5 with 150 mM NaCl, flow 1 ml/min. Chromatographic step absorbance was monitored at 280 nm. The chromatographic steps were performed on HPLC System ÄKTA (GE Healthcare[®], Pharmacia).

Enzymatic assay

The enzymatic activity of the *A. cladodes* proteases was measured,¹⁸ modified. A total of 100 µl of enzyme (protease) and 300 µl of 1% casein (pH 8.0) were used. The reaction was incubated for one hour at 36°C and stopped by the addition of 50 µl of 20% trichloroacetic acid (TCA). After 10 minutes, the material was centrifuged at 10.000 x g for five minutes, the supernatant collected and the absorbance determined by spectrophotometry at 280 nm.

Estimation of molecular mass of purified proteases

Purified protease fractions were loaded on a Protein-Pak column equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer with 150 mM NaCl, pH7.5. Proteins with known molecular mass, bovine serum albumin (BSA, 67 kDa), ovalbumin (OVA, 45 kDa) and ribonuclease A (RNase, 13.7 kDa) were used for calibration.

Zymogram and plate diffusion assay

Fractions from the different purification steps were incubated with sample buffer (2.5% SDS sodium dodecyl sulfate, 50% glycerol and 0.5 M Tris-HCl, pH 6.5) and applied to 12% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin. After electrophoresis, the gel was washed with 2% Triton X-100 renaturing aqueous solution for 30 minutes and incubated in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0; 5 mM CaCl₂; 0.2 M NaCl; Brij 35 0.02% overnight at 37°C. The gel was stained with Gelcode® Blue Stain Reagent (Coomassie G-250, Pierce) for 30 min and bleached with 50% methanol²¹. Proteases with enzymatic activity were observed as non-stained bands in the gel.

Plate diffusion assay was done with medium containing 1% casein, 1% gelatin and 1.5% agar-water, pH 7.5. The medium was autoclaved (120°C for 15 min) and 20 ml of the solution deposited in 9 cm diameter Petri dishes²². After solidification, 3 µl of the different purification steps (crude extract, Mono Q, AcPI and AcPII) and control (PBS) were applied to wells. The plate was incubated at 36°C for 24 hours.

Protein quantification

The protein concentration was determined using the BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer instructions using bovine serum albumin (BSA) as standard.

Effects of pH and temperature on enzymatic activity

The effect of pH and temperature on the enzymatic activity was determined in assays with different buffers: glycine-HCl (pH 2.0 and 3.0), sodium acetate (pH 4.0 and 5.0), sodium phosphate 6.0 and 7.0), Tris-HCl (pH 8.0 and 9.0) and glycine-NaOH (pH 10.0, 11.0 and 12.0). The purified protease activity (AcPI and AcPII) was determined with sodium phosphate buffer pH: 7 at the temperatures of 30, 40, 50, 55, 60, 65 and 70°C for one hour.

The test characterization was performed in triplicate and the highest activity value considered 100% in relation to the others.

Effect of inhibitors of proteases and metal ions on proteases

A total of 100 µl of protease sample (AcPI and AcPII), 2 µl of phenylmethylsulfonyl fluoride PMSF (10 µM), 2 µl 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0, leupeptin (10 µM), aprotinin (2 µg/ml) and pepstatin A (1 µM) was added to microcentrifuge tubes and incubated for 15 minutes at room temperature. Then, 300 µl of 1% casein (pH 8.0) was added and the solution incubated at 36°C/1h.

The purified proteases (AcPI and AcPII) were incubated with the PMSF inhibitor (10 µM) for 15 min, followed by addition of 10 mM calcium chloride (CaCl₂), copper sulfate (CuSO₄), magnesium sulfate (MgSO₄), zinc sulfate (ZnSO₄), and iron sulfate (FeSO₄) for 15 min, then 300 µl casein (pH 8.0) was added, incubated at 36°C for one hour.

The enzymatic activity of the control sample (without protease inhibitors or metal ions) was taken as 100% and the characterization tests performed in triplicate.

***In vitro* larvicidal activity**

Approximately 50 L₃ (40 µl) of GIN were transferred to wells of Elisa plates and exposed to 200 µl of concentrated solution corresponding to the different purification stages: crude extract lyophilized filtered (CE) (T1); fraction containing proteolytic activity obtained by anion exchange chromatography (Mono Q) (T2); AcPI protease fraction (T3); AcPI combined with protease inhibitor PMSF (T4); fraction of AcPII protease (T5); AcPII combined with protease inhibitor PMSF (T6) and PBS pH 7.5 (control). The plate was incubated at 26°C, the number of viable and killed L₃ counts

after 24 hours of incubation and the mortality rate calculated²⁰. Rigid, immobile larvae in the presence of light and heat were considered dead. The tests were performed in triplicate.

Other L₃ were subjected to the same treatments and after 24 h stained with 100 ng/ml of 4', 6'-diamidine-2-phenylindole hydrochloride (DAPI, Invitrogen) marker in PBS (pH 7.5)²³. The L₃ plate was shaken for 15 minutes in a horizontal shaker without light, the volume collected, washed three times with PBS and fixed with formalin. DAPI-labeled larvae were photographed on a fluorescence microscope EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA).

Statistical analysis

Tests and graphs were run with Graphpad Prism 5.0 software. The larvicidal activity data between groups were compared by One-way ANOVA and submitted to the Tukey test. P values equal to or lower than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Predatory activity of *A. cladodes* in vitro

Arthrobotrys cladodes grown on 2% agar-water solid medium (25°C), produced differentiated mycelia in three-dimensional adhesive networks and captured GIN L₃ (Fig. 1A). These fungi reduced the L₃ GIN numbers by 62.3% in relation to the control (Fig. 1B).

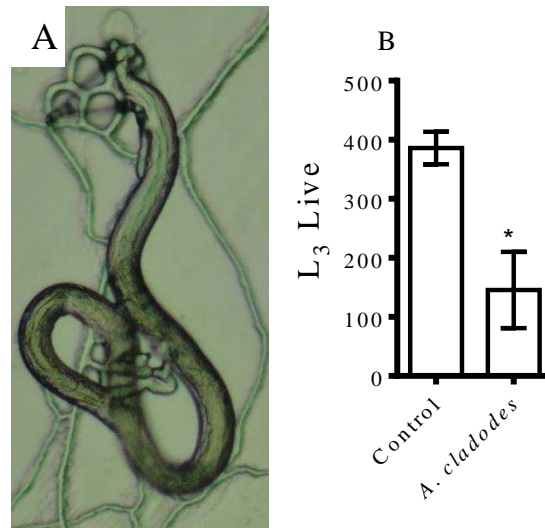


Fig. 1. Predatory activity of *Arthrobotrys cladodes* in vitro. A, L₃ of GIN trapped by three-dimensional adhesive networks. B, reduction number L₃ of GIN by *A. cladodes*. *Differences between means and the control ($P < 0.05$) according to the Tukey test. Magnification: (A) 40x objective lens.

Kinetics of protease production from crude extract filtrate of *A. cladodes*

The enzymatic activity of *Arthrobotrys cladodes* was higher on the tenth day after inoculation (Fig. 2).

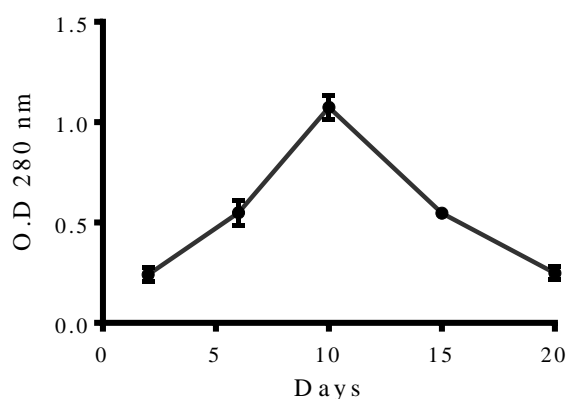


Fig. 2. Kinetics of protease production by *Arthrobotrys cladodes*. The period of 10 days was standardized for the proteases production with higher enzymatic activity. Each point represents trials in triplicate, and the bars the values of standard deviation.

Protease purification

The desalted crude extract, used in Mono Q anion exchange chromatography, revealed the presence of an adsorbed fraction with enzymatic activity, designated P1. The tubes corresponding to the P1 peak were pooled to 16 ml and concentrated in the Amicon System to the final volume of 500 μ l (465 μ g/ml protein). This concentrated fraction was applied on gel filtration in Protein-Pak column forming a large adsorbed protease peak. The enzymatic activity of the adsorbed fraction revealed the presence of two large protease peaks, P2 and P3 with apparent molecular mass of 56 and 39 kDa, respectively in Protein-Pak column. These proteases were named *Arthrobotrys cladodes* Protease I (AcPI) and *Arthrobotrys cladodes* Protease II (AcPII) (Fig. 3).

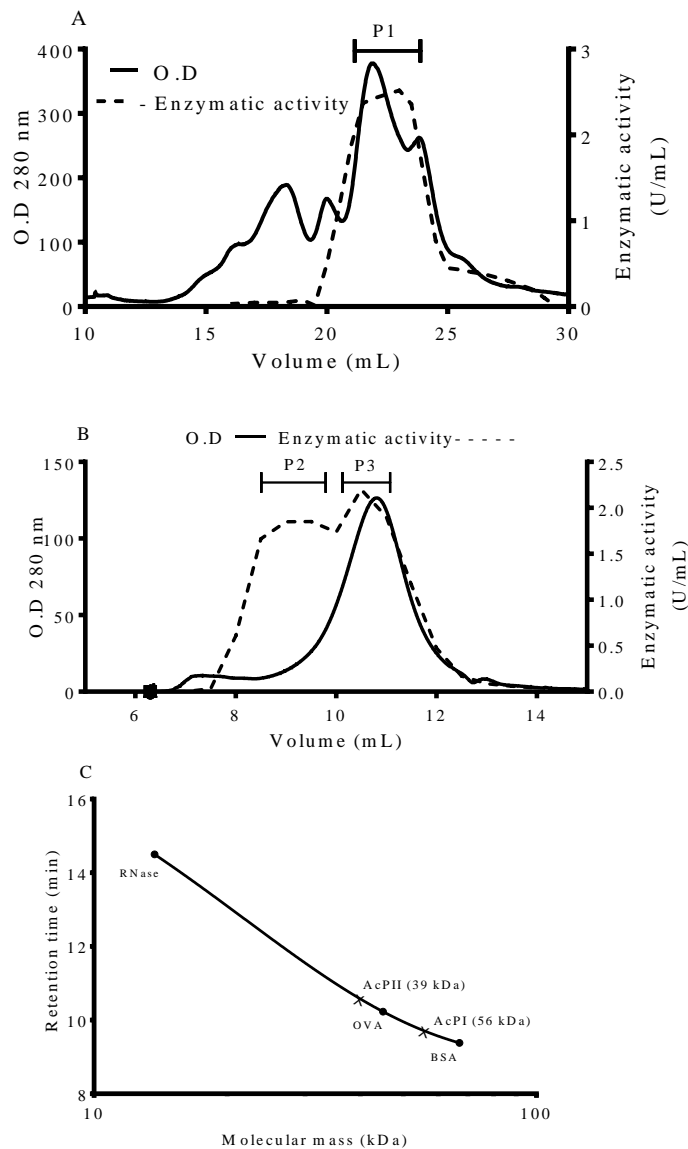


Fig. 3. Purification of proteases of *Arthrobotrys cladodes*. Anion exchange chromatography of the crude extract with the P1 peak exhibiting enzymatic activity (A). P1 in Protein-Pak column with two peaks exhibiting enzymatic activity (P2 and P3) and named *Arthrobotrys cladodes* I (AcPI) and *Arthrobotrys cladodes* II (AcPII) Proteases (B). Estimating molecular mass (C) by gel filtration using bovine serum albumin (BSA, 67 kDa), ovalbumin (OVA 45 kDa) and ribonuclease A (RNase A, 13.7 kDa) as the calibration curve. The molecular masses of AcPI and AcPII were estimated at 56 and 39 kDa, respectively. Elutions were monitored at 280 nm.

Zymogram and plate diffusion assay

Fractions corresponding to the different steps of the purification of AcPI and AcPII showed gelatinolytic activity in the zymogram. These fractions, in the plate diffusion assay, showed substrate degradation (casein-gelatin) halos after 24 h indicating proteolytic activity (**Fig. 4**).

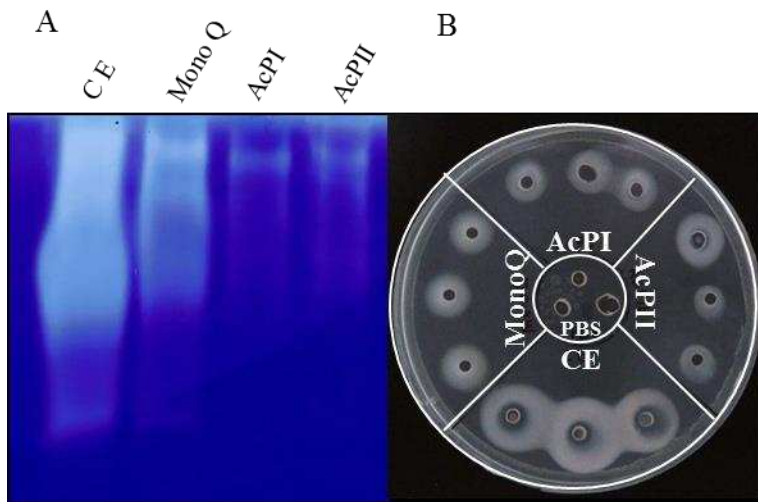


Fig. 4. Enzymatic tests activity. Purification steps from crude extract (CE), anion exchange chromatography (Mono Q) and gel filtration purified proteases (AcPI and AcPII) showing proteolytic activity upon substrate degradation, gelatin on the zymogram (A) and gelatin + casein on the plate protease diffusion assay (B), PBS used as a control, did not show substrate degradation halos.

Effects of pH and temperature on enzymatic activity

The optimum activity of AcPI was between pH 6.0-8.0 with higher value at pH 7.0 and decrease at pH below 6.0 and above 8.0 (**Fig. 5A**). The AcPII activity was higher between pH 7.0-9.0 and lower below pH 5.0 and above 9.0 (**Fig. 5B**).

AcPI and AcPII protease activity was higher than 50% at temperatures of 40-65°C, with optimum values between 55 and 60°C and marked reduction above 65°C (**Fig. 5C and D**).

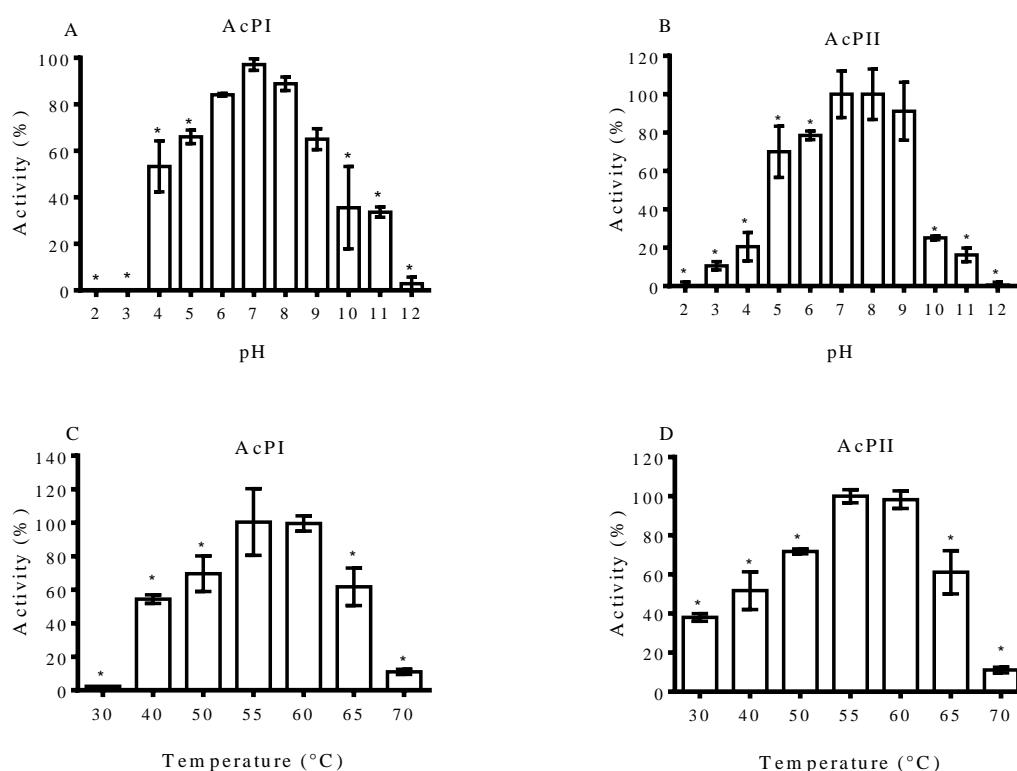


Fig 5. Enzymatic activity of AcPI and AcPII of *Arthrobothrys cladodes* at different pH and temperatures. The AcPI activity was higher at neutral pH (A) and that of AcPII was similar at pH 7 and 8 (B). AcPI and AcPII proteases showed higher activity at temperatures between 55 and 60°C (C and D). The highest activity value was considered 100%. Bars indicate the standard deviation of the mean (n= 3). *Differences between means and the control (P <0.05), according to the Tukey test.

Effect of protease inhibitors and metal ions on AcPI and AcPII

The activity of the AcPI and AcPII proteases were similar in the presence of protease inhibitors. These proteases were completely inhibited by PMSF. EDTA, Pepsstatin A and Aprotinin increased enzyme activity (**Fig. 6 A and B**).

Metal ions $MgSO_4$, $CuSO_4$ and $FeSO_4$ had no effect on ACPI or ACPII activity. Zinc sulfate partially increased the proteases activity and calcium chloride increased activity above the control group (AcPI or AcPII) (**Fig. 6 C and D**).

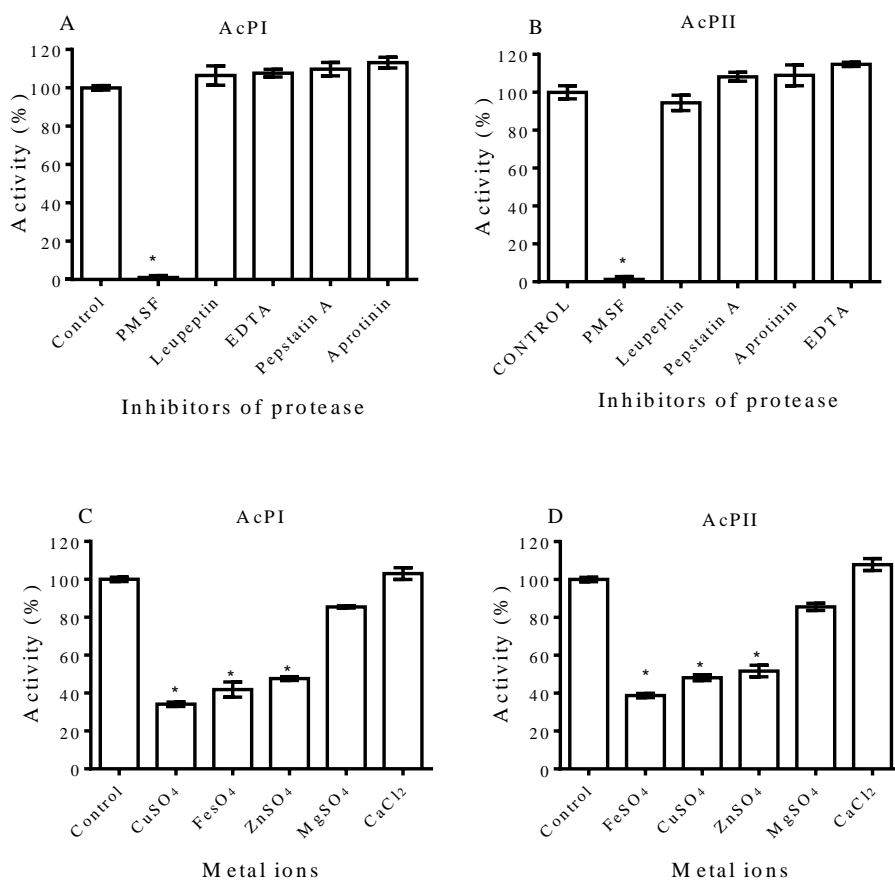


Fig. 6. Effects of protease inhibitors and metal ions on the enzymatic activity of AcPI and AcPII of *Arthrobotrys cladodes*. Bars indicate the standard deviation of the mean (n= 3). *Differences between means and control (P <0.05), according to the Tukey test.

Larvicidal activity of AcPI and AcPII

Infective larvae (L_3) exposed to the PBS (control) medium, remained viable with intense and vigorous movement during the period analyzed. Most larvae exposed to the filtered crude extract also remained viable, but with a mortality rate of 20% in 24h. On the other hand, the L_3 mortality exposed to fraction with proteolytic activity eluted from anion exchange chromatography (Mono Q) was higher, 55% in 24 h. The L_3 mortality exposed for 24 h to the purified proteases (AcPI and AcPII) were 26 and 24%, respectively, and drastically reduced with the presence of PMSF (**Table 1**).

Table 1. Proteases (Prot.), protein (P), specific activity (SA), mortality (Mort.) of infective larvae (L_3) of gastrointestinal nematodes by different stage fraction of *Arthrobotrys cladodes* purification.

Samples	Pa. (Uml ⁻¹)	Prot. (µg/ml)	SA (units mg ⁻¹)	Mort. (%) 24h
Control	0	0	0	7 ± 3 ^A
C E	0.134	815.3	0.164	20 ± 4 ^B
Mono Q	1.390	709.2	0.195	55 ± 5 ^C
AcPI	0.280	324.3	0.863	26 ± 3 ^B
AcPI+PMSF	0.020	91.41	0.218	10 ± 2 ^A
AcPII	0.248	250.78	0.988	24 ± 4 ^B
AcPII+PMSF	0.020	79.19	0.252	9 ± 3 ^A

Control (PBS pH 7.5); CE (crude extract of the culture filtrate of lyophilized *A. cladodes*). Mono Q (anion exchange chromatography); AcPI and AcPII (proteases purified by gel filtration in Protein-Pak column); AcPI + PMSF (AcPI + 2µl PMSF, 10µM); AcPII + PMSF (AcPII + 2µl PMSF, 10µM). Mortality of L_3 followed by the same capital letter per column does not differ at 5% by the Tukey test

Infective larvae killed after 24 h of exposure to the products of the different purification steps of *A. cladodes* lost the ability to expel the DNA intercalative complexes, DAPI, from their cells and emitted fluorescence (**Fig. 7**).

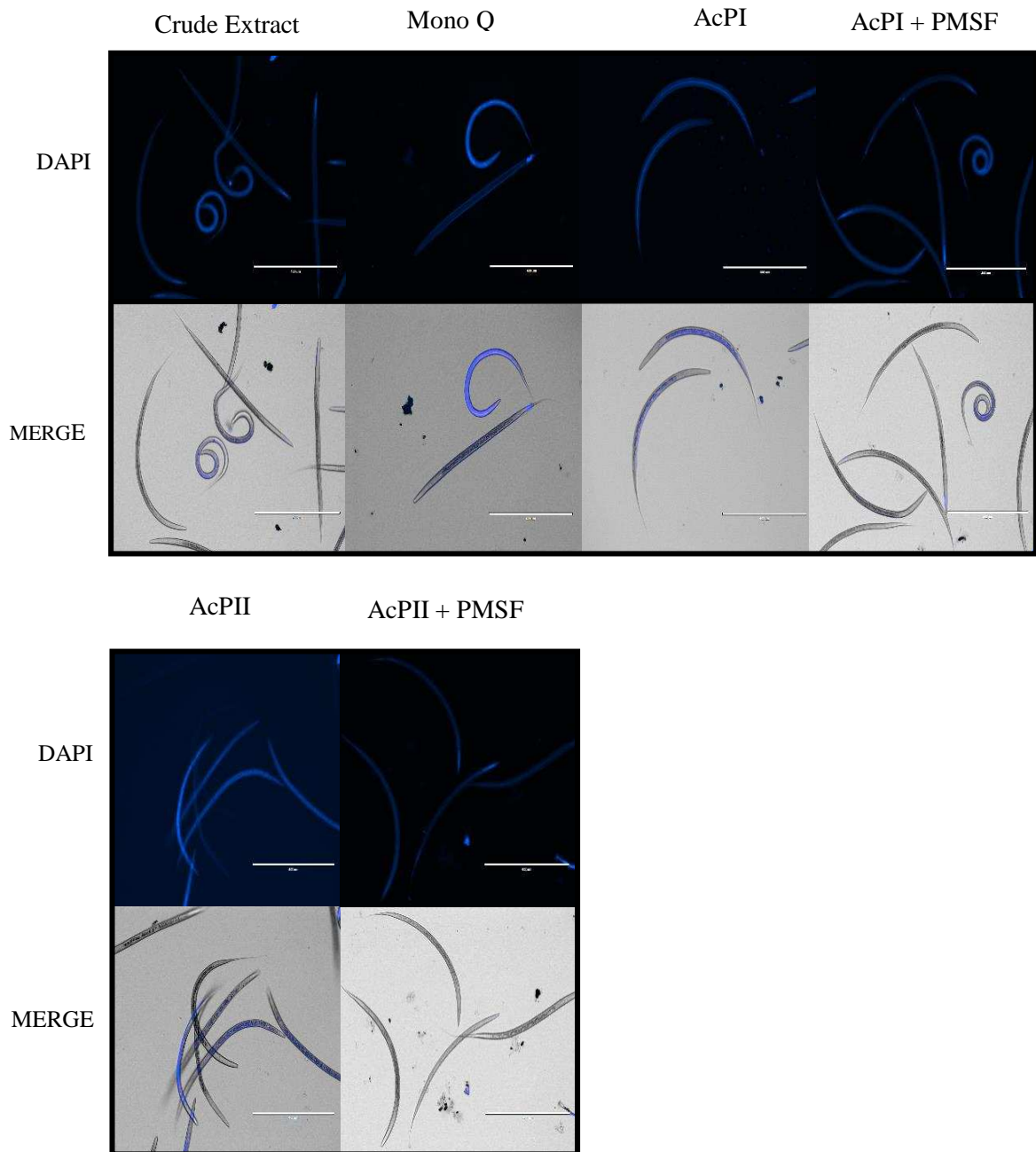


Fig. 7. Mortality of infective larvae (L₃) of gastrointestinal nematodes by fractions of different stages of purification of *Arthrobotrys cladodes*. Control (PBS pH 7.5); CE (crude extract of the culture filtrate of lyophilized *A. cladodes*). Mono Q (anion exchange chromatography); AcPI and AcPII (proteases purified by gel filtration in Protein-Pak column); AcPI + PMSF (AcPI + 2 μ l PMSF, 10 μ M); AcPII + PMSF (AcPII + 2 μ l PMSF, 10 μ M). Mortality of L₃ followed by the same capital letter per column does not differ to 5% by the Tukey test.

DISCUSSION

Nematode-trapping fungi are used in the biological control of nematodes in agricultural crops^{2,3} and GIN of domestic animals⁴. *Arthrotrys cladodes* showed a good percentage of GIN L₃ reduction *in vitro* with action mechanisms including attraction, adhesion, penetration and degradation steps^{24,25}. The adhesion step was done by forming three-dimensional adhesive nets attaching the nematodes and facilitating penetration, one of the most important, which includes mechanical pressure and enzymatic activity to break the cuticle of the nematodes²⁴.

The AcPII protease (39 kDa) conforms to PMSF-sensitive serine protease parameters with molecular mass between 20 and 45 kDa and known to degrade the nematode cuticle²⁶. However, the apparent molecular mass of the AcPI protease (56 kDa) is higher than that of the 35 and 38 kDa extracellular PII and Aoz1 proteases respectively of the nematophagous fungus *Artrobotrys oligospora*,^{9,10} and Ac1, 35 kDa of *Artrobotrys conoides*¹¹. The sensitivity of AcPI and AcPII to the PMSF inhibitor suggests that they are from the serine protease family²⁷. The Ca²⁺ ion appears to be important for enzyme activity and, although not necessary for the heterodimers formation, may increase the stability of the complex formed by the decrease in the dissociation rate²⁸. In addition, Ca²⁺ is important in the modulation of protein action, stabilization of proteins against thermal denaturation or proteolytic degradation and on enzymatic catalysis²⁹. Serine proteases are important to degrading the helminthic cuticle by nematode-trapping fungi^{10,18,30}, eggs^{14,15} and endoparasite fungi^{16,17}.

The increase in the biological activity of AcPI and AcPII proteases with temperature and maximum values between 55 and 60°C agrees with that reported for *Clonostachys rosea* PrC serine proteases³¹, Mt1 of *Monacrosporium thaumasium*³² and Df1 from *Duddingtonia flagrans*¹⁸.

The highest enzymatic activity of AcPI and AcPII at pH 7 and 8 is similar to that of serine proteases of the nematophagous fungi *Dactylella varietas* and *Monacrosporium thaumasium*^{33,32}. Serine proteases of nematode-trapping fungi have maximal activity at neutral to alkaline pH of 7 and 10²⁶, but PrD1, *Dactylella cionopaga* protease, was active at pH 5³⁴.

The degradation of gelatin and gelatin/casein in the zymogram and in the plate activity assay, respectively, demonstrates success in the purification of AcPI and AcPII and the biological activity of these enzymes, confirmed by the GIN L₃ mortality test.

Proteins capable of breaking the double cuticle of L₃ should be prioritized to control GIN because these organisms have extra cuticle that gives them greater protection and resistance to environmental conditions and, therefore, more difficult to have their physical integrity broken, unlike *Pangrellus redivivus* and *Caenorhabditis elegans* that possess a single cuticle^{35,36,37}. The highest larvae mortality percentage by the fraction collected from anion exchange chromatography (MonoQ) agrees with that reported for L₃ of *Haemonchus contortus* by *Arthrobotrys musiformis*³⁰. The lower percentage of nematicidal activity of the purified proteases AcPI and AcPII suggests that they have additive activity, acting together in the nematode cuticle degradation. Mortality caused by the AcPI and AcPII proteases alone was lower than the 58% reported for cyathostomes by the Df1 serine protease *Duddingtonia flagrans*¹⁸ and 76.8, 68.1 and 92.1% of reduction of larvae of *Pangrellus* spp. by the serine proteases of *Monacrosporium sinense* MS1, MS2 and MS3, respectively¹². However, reduction above 30% is important for the biological control of GIN and adequate to initiate the development of drugs to act directly on helminths or synergistically to commercial drugs⁴. The reduction of larvicidal activity of AcPI and AcPII by PMSF indicates that these proteases are important in the nematode toxicity process.

Serine proteases and AcPI AcPII, purified from *Arthrobotrys cladodes*, were characterized and caused die of L₃ GIN *in vitro*. These results increase the knowledge about the biology of *A. cladodes* and should be considered for the biological control of nematodes of agricultural crops and GIN in a synergistic way to chemical control.

Acknowledgements

We thank to the “Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)”, “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” and the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)” for the financial support. We thank too Professor Jackson Victor de Araujo for donated Infective larvae (L₃) from GIN.

REFERENCES

1. Ciancio, A., Colagiero, M., Pentimone, I. & Rosso, L. Soil microbial communities and their potential for root-knot nematodes management: a review. *Environ. Eng. Manag. J.* **15**, 1833–1839 (2016).
2. Escudero, N. *et al.* Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Biol-Uk.* **120**, 572–585 (2016).
3. Podestá, G. S. *et al.* Effect of time between soil infestation with *Pochonia chlamydosporia* and planting on the efficacy of the fungus in managing *Meloidogyne javanica*. *Crop. Prot.* **90**, 77–83 (2016).
4. Silveira, W. F. *et al.* Predation rate of nematophagous fungi after passing through the gastrointestinal tract of goats. *Small Rumin. Res* **147**, 101–105 (2017).
5. Wang, Y., Yi, S., Sun, L., Huang, Y. & Zhang, M. Charge-selective fractions of naturally occurring nanoparticles as bioactive nanocarriers for cancer therapy. *Acta Biomater.* **10**, 4269–4284 (2014).
6. Ibragimova, Z. B., Anan'ko, G. G., Kostina, N. E., Teplyakova, T. V. & Mazurkova, N. A. Toxicity and antiviral activity of the extracts of submerged mycelium of nematophagous *Duddingtonia flagrans* fungus in Vero cell culture. *B. Exp. Biol. Med* **160**, 246–248 (2015).
7. Tikhonov, V. E., Lopez-Llorca, L. V., Salinas, J. & Jansson, H. B. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *Verticillium suchlasporium*. *Fungal Genet. Biol.* **35**, 67–78 (2002).
8. Huang, X. W., Zhao, N. H. & Zhang, K. Q. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Res. Microbiol.* **155**, 811–816 (2004).
9. Tunlid, A., Rosen, S., Ek, B. & Rask, L. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology* **140**, 1687–1695 (1994).

10. Zhao, M. L., Mo, M. H. & Zhang, K. Q. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycologia* **96**, 16–22 (2004).
11. Yang, J. K. *et al.* Cloning and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys conoides*. *Arch. Microbiol* **188**, 167–174 (2007).
12. Soares, F. E. F. *et al.* Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. *Parasitol Res* **112**, 1557–1565 (2013).
13. Braga, F. R. *et al.* Production and partial characterization of *Duddingtonia flagrans* (AC001) crude extract and its in vitro larvicidal action against trichostrongylid infective larvae. *Biocontrol Sci. Techn* **2**, 1313–1320 (2012).
14. Lopez-Llorca, L. V. Purification and properties of extracellular proteases produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. *Can. J. Microbiol.* **36**, 530–537 (1990).
15. Segers, R., Butt, T. M., Kerry, B. R. & Peberdy, J. F. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. *Microbiology* **140**, 2715–2723 (1994).
16. Wang, B., Wu, W. P. & Liu, X. Z. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematicidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. *Mycopathologia* **163**, 169–176 (2007).
17. Wang, B., Liu, X., Wu, W. P., Liu, X. & Li, S. Purification, characterization, and gene cloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode-endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Microbiol. Res* **164**, 665–673 (2009).
18. Braga, F. R., Araújo, J. V., Soares, F. E. F., Geniêr, H. L. & Queiroz, J. H. An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. *Biocontrol Sci. Techn* **22**, 1131–1142 (2012).

19. Staniland, L. N. A modification of the Baermann funnel technique for the collection of nematodes from plant material. *J. Helminthol.* **23**, 115–117 (1954).
20. Mendoza-De-Gives, P., Davies, K. G., Clarck, S. J. & Behnk, J. M. Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology* **119**, 95–104 (1999).
21. Liota, L.A., S. *Cancer Biology*. (1990).
22. Montville, T. J. Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 200–204 (1983).
23. Shaham, S. *WormBook: Methods in Cell Biology*. (2006). doi:10.1895/wormbook.1.49.1,
24. Veenhuis, M., Nordbring-Hertz, B. & Harder, W. An electron-microscopic analysis of capture and initial-stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **51**, 385–398 (1985).
25. Nordbring-Hertz, B., Jansson, H. B. & Tunlid, A. S. *Nematophagous fungi*. *Encyclopedia of Life Science. Macmillan Publishers, Ltd. Nature Publishing* (2006). doi:10.1002/9780470015902.a0000374.pub3
26. Yang, J., Liang, L., Li, J., Ke-Qin & Zhang. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 7081–7095 (2013).
27. Siezen, R. J. & Leunissen, J. A. M. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine protease. *Protein Sci.* **6**, 501–523 (1997).
28. Vallar, L. *et al.* NoDivalent cations differentially regulate integrin alphaIIIb cytoplasmic tail binding to beta3 and to calcium- and integrin-binding protein. *J Biol Chem.* **24**, 17257–66 (1999).
29. McPhalen, C. A., Strynadka, N. C. & James, M. N. Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. *Adv. Protein Chem* **42**, 77–144 (1991).
30. Acevedo-Ramírez, C. P. M. *et al.* Proteolytic activity of extracellular products

- from *Arthrobotrys musiformis* and their effect in vitro against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Vet. Rec. Open* **2**, 103 (2015).
31. Li, J., Yang, J. K., Huang, X. W. & Zhang, K. Q. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process. Biochem.* **41**, 925–929 (2006).
 32. Soares, F. E. F. *et al.* In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol Res* **110**, 2423–243 (2012).
 33. Yang, J. K. *et al.* Purification and cloning of a novel serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylellina varietas* and its potential roles in infection against nematodes. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 557–565 (2007).
 34. Yu, H. Y., Xue, W. & Duan, J. . Expression of PrD1 of *Dactylellina cionopaga* in *Aspergillus niger*. *Biotechnol.* **22**, 38–43 (2012).
 35. Yang, J. K. *et al.* Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematicidal activity. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1123–1128 (2005).
 36. Wang, M., Yang, J. & Zhang, K. Q. Characterization of an extracellular protease and its cDNA from the nematode-trapping fungus *Monacrosporium microscaphoides*. *Can. J. Microbiol.* **52**, 130–139 (2006).
 37. Junwei, W. *et al.* The recombinant serine protease XAoz1 of *Arthrobotrys oligospora* exhibits potent nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **344**, 53–59 (2013).

9. Capítulo 2

Atividade de protease extracelular do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* sobre a cutícula de larvas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes

Resumo

Enzimas microbianas são biocatalizadoras de reações químicas e utilizadas na indústria farmacêutica. Podem ser extraídas de diversos microrganismos, incluindo fungos nematófagos. Enzimas de fungos nematófagos são responsáveis pela digestão da cutícula de nematoides, favorecendo a penetração das hifas. O objetivo deste trabalho foi avaliar efeitos da serina protease AcPII, sobre a bainha e cutícula de larvas infectantes (L₃) de nematoides parasitos gastrintestinais (NPG) de ruminantes. A protease extracelular AcPII de *Arthrobotrys cladodes* foi purificada por cromatografia de troca iônica e exclusão por tamanho molecular em sistema HPLC. A atividade nematicida foi testada em L₃ de NG. Alterações morfológicas na bainha e cutícula das larvas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. AcPII apresentou atividade nematicida, reduzindo em 42% o número de L₃ de NPG de ruminantes. A microscopia eletrônica de varredura e transmissão mostrou alterações morfológicas na bainha e cutícula das larvas, como lise na epicutícula, “annulis”, “furrows”, “alae”. Larvas apresentaram danos na camada cortical, medial e basal. A hipoderme e musculatura responsável pela movimentação foi comprometida. Estas lesões provocaram extravasamento de líquido intracelular e perda de tecido. A protease extracelular AcPII, de *A. cladodes*, lesionou a cutícula de L₃ de NPG e ocasionou a morte dos nematoides. Este estudo melhorou a compreensão dos mecanismos de degradação e penetração da cutícula, importantes para infecção do hospedeiro e alimentação do fungo. Esta protease tem potencial de uso no controle de NPG de ruminantes.

Introdução

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas em peptídeos e aminoácidos. Podem ser extraídas de diversas fontes como animais, plantas, fungos, leveduras e bactérias. Elas representam quase 60% do mercado total de enzimas com aplicabilidades biotecnológicas, distribuídas em diversos seguimentos da indústria de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, indústrias de tecidos, e detergentes (Singh et al., 2016, Sharna et al., 2017). Devido à grande diversidade genética e facilidade de manipulação e produção em grande escala, proteases fúngicas estão entre as mais comercializadas (Su et al., 2017).

Fungos nematófagos são um grupo heterogêneo de organismos, bastante dinâmicos na forma com que capturam e se alimentam de seus hospedeiros. São saprófitos em grande parte da vida, porém, na presença de nematoides sofrem uma transição para um modo de vida predador. Nesta fase produzem diversos tipos de armadilhas para capturar nematoides. Este processo envolve mecanismos de atração, adesão, penetração e degradação. Durante a penetração da cutícula do nematoide há uma forte pressão mecânica das hifas concomitante a liberação de enzimas extracelulares para romper a cutícula e promover o crescimento micelial (Nordbring-Hertz et al., 2006, Su et al., 2017).

Enzimas/proteases extracelulares secretadas por fungos nematófagos têm sido o foco de estudos de muitos pesquisadores (Tunlid et al., 1994; Wang et al., 2006; Yang et al., 2013; Acevedo-Ramírez et al., 2015). Estas proteases são importantes fatores de virulência durante a fase de degradação da cutícula de nematoides (Huang et al., 2004; Herrera-Estrella et al., 2016).

Há uma grande variedade de proteases extracelulares identificadas de diferentes fungos nematófagos (predadores de ovos, larvas e endoparasitos). Estas proteases podem ser collagenases (Schenck et al., 1980; Tosi et al., 2002) quitinases (Tikhnov et al., 2002; Nguyen et al., 2009) e proteases de serina, semelhantes a família das subtilisinas (Tunlid et al., 1994; Acevedo-Ramírez et al., 2015).

Serina proteases apresentam características comuns, são sensíveis ao inibidor PMSF, atuam em pH neutro a alcalino, apresentam massa molecular entre 20 e 45 kDa.

Além disso, possuem tríade catalítica composta por histidina, serina e ácido aspártico no sítio ativo (Siezen & Leunissen 1997).

Conhecer a composição química da superfície do hospedeiro é importante para selecionar e/ou induzir a produção de enzimas específicas. Larvas infectantes (L₃) de nematoides parasitos gastrintestinais (NG) apresentam características distintas de outros estádios, como bainha externa como predominância de colágenos reticulados insolúveis, proteínas adicionais (cuticlina), glicoproteínas associadas e lipídeos. (Cox et al., 1981; Lee, 2002; Page & Johnstone, 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar efeitos da serina protease AcP_{II}, purificada do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes*, sobre a cutícula de larvas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais de ruminantes.

Material e métodos

Purificação de protease extracelular de *A. cladodes*

O extrato bruto liofilizado da cultura de *A. cladodes* foi ressuscitado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 para concentração final de 10 mg/ml, centrifugado a 10.000 x g/5 min, o sobrenadante coletado e filtrado em membrana de 0,22 µm de poro (Millipore[®], Billerica, EUA). O extrato bruto filtrado foi dessalinizado em coluna Desalting Hitrap (GE Healthcare[®]), pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH: 7,5 fluxo de 1 ml/min.

O extrato dessalinizado foi submetido a cromatografia de troca aniônica em coluna HiTrap Mono Q 5/50 GL (GE, Healthcare[®], Pharmacia) equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), fluxo de 1 ml/min. As proteínas com atividade enzimática adsorvidas a coluna foram eluídas em um gradiente linear (0-1 M) no mesmo tampão mencionado acima, contendo NaCl 1M. As frações com atividade proteolítica foram concentradas em Amicon 10 kDa para o volume de 700 µl. As frações ativas foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular em coluna Protein-Pak (7,8 mm x 300 mm, Waters[®]) equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com 150 mM de NaCl, fluxo de 1 ml/min. A absorvância em todos os passos cromatográficos foi monitorada a 280 nm. As etapas cromatográficas foram realizadas em Sistema HPLC ÄKTA (GE Healthcare[®], Pharmacia).

Obtenção de larvas infectantes (L₃)

Coproculturas de fezes contaminadas por NPG foram mantidas em câmara de demanda de oxigênio (BOD) por 12 dias a 26°C. Após esse período, as L₃ foram recuperadas pela técnica do funil de Baermann e identificadas a nível de gênero (*Haemonchus* spp., 72% *Cooperia* spp., 19%, *Oesophagostomum* spp., 7%, *Trichostrongylus* spp., 2%) (Ueno e Gonçalves, 1998). Larvas infectantes foram submetidas a gradiente de densidade de sacarose (50%) e centrifugadas a 1150 x g, 4°C por 10 min. O anel de larvas foi coletado e estas foram lavadas 5x com PBS para retirada da sacarose, tratadas com 100 µg/ml de ampicilina e armazenadas a 4°C.

Atividade nematicida

Aproximadamente 10000 L₃ de NPG foram transferidas para microtubos e adicionados 500 µl de solução concentrada da protease AcPII com 10mM de CaCl₂ incubada a por 48h a 38°C. O grupo controle foi incubado com tampão fosfato de sódio, pH 7,4 com 10mM de CaCl₂. Cinco alíquotas com aproximadamente 100 L₃ foram retiradas dos microtubos do grupo tratado e controle e contadas. Larvas rígidas e sem movimento na presença de luz e calor foram consideradas mortas, o percentual de mortalidade foi calculado (Mendoza-de-Gives et al., 1999). As L₃ restantes foram fixadas e preparadas para microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET)

Larvas do grupo tratado com protease AcPII e controle foram prefixados com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, seguido de glutaraldeído 2,5%. O material foi pós fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 2h e então desidratados em séries graduadas de álcool e acetona. A metade de cada tratamento foi separada para microscopia de varredura e transmissão.

Para microscopia de varredura (MEV) as larvas do grupo tratado e controle foram desidratadas em secador de ponto crítico em CPD 030 de Baltec e, em seguida, revestidos por pulverização com cerca de 20 nm de metal dourado (Quorum Q150RS). As amostras foram observadas em MEV Zeiss LEO VP1430 operando a tensão de aceleração de elétrons de 15 kV.

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), larvas desidratadas dos grupo tratado e controle foram incorporadas em resina epóxi (Epon 812). As seções

ultrafinas (~70 nm) foram contrastadas com soluções de 3% de acetato de urânio e 0,2% de citrato de chumbo. Todas as amostras foram observadas em MET Zeiss EM109, operando a 80 kV (Barcellos et al., 2017).

Resultados

Purificação da protease

O extrato bruto livre de meio de cultura, após passar por cromatografia de troca aniônica Mono Q, revelou a presença de fração adsorvida com atividade enzimática, designada P1 (Fig. 1 A). Os tubos correspondentes ao pico P1 foram agrupados e concentrados em Sistema Amicon (10kDa) para o volume final de 500 μ L (519 μ g/ml proteína). Esta fração concentrada foi submetida a gel filtração em coluna Protein-Pak. A atividade enzimática do fracionamento revelou a presença de um único pico de protease, P2 (Fig. 1 B), com massa molecular de aproximadamente 40 kDa, característica da protease de *Arthrobotrys cladodes* II (AcPII).

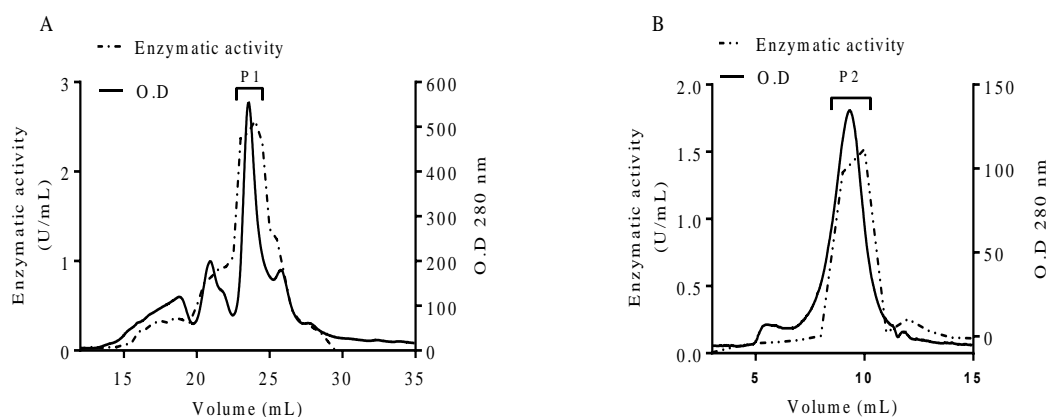


Fig. 1. Purificação de AcPII de *Arthrobotrys cladodes*. (A) Cromatografia de troca aniônica do extrato bruto, exibindo um pico de atividade enzimática (P1). (B) Cromatografia de exclusão por tamanho molecular de P1 em Protein-Pak column mostrando pico atividade enzimática (P2).

Atividade nematicida

A protease AcPII apresentou atividade nematicida reduzindo em 42% ($\pm 5,6$) o número de L₃ de NPG no período de 48h. Foram examinadas a média de 25 e 30 micrografias de MEV e MET, respectivamente, das L₃ de NPG tratadas com AcPII e controle (PBS). A avaliação semiquantitativa das observações das frequências das alterações morfológicas entre os grupos tratados e controle está descrito na tabela 1.

Table 1: Observação da frequência de alterações morfológicas provocadas em larvas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais após 48h de exposição a AcPII e PBS (controle).

Alterações Morfológicas	Tratamentos			
	MEV		MET	
	AcPII	PBS	AcPII	PBS
Lise da epicutícula	++	-	+++	-
Lise dos “annulis”	++	-	++	-
Lise dos “furrows”	++	-	+++	-
Lise da camada cortical	+	-	+	-
Lise da camada medial	+	-	+	-
Lise da camada basal	+	-	+	-
Alterações na hipoderme	+	-	-	-
Alterações na lamina basal	+	-	-	-
Alterações na camada de células musculares	+	-	-	-

Legenda de frequência: -: 0%; +: de 10% a 25%; ++: de 25% a 75%; +++: de 75% a 100%.

Análise da cutícula das larvas infectantes por MEV

Larvas do grupo controle (sem tratamento), mostraram a cutícula com aspecto normal e característico. Morfologia externa e preservada, “annulis” e “furrows” evidentes, sem descamação ou danos, “cervical Alae” evidente e sem alterações, percorre toda região dorsal, desde a porção anterior até extremidade da cauda (Fig. 2 a-c; Fig. 3 a-d)

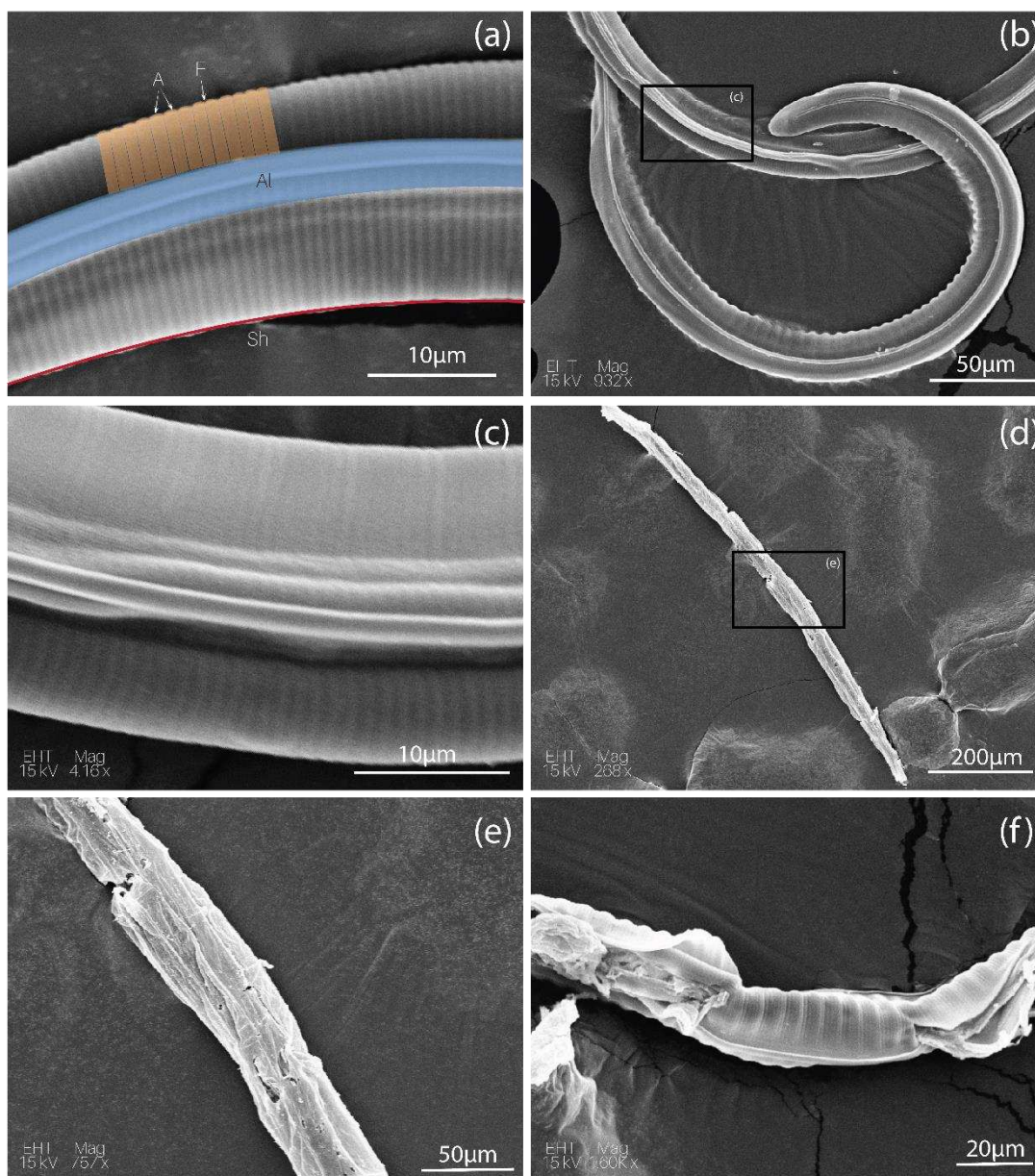


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura de larvas infectantes expostas a AcPII de *Arthrobotrys cladodes* e controle (PBS). A: annuli; F: furrow; Al: alae; Sh: bainha. Larvas do grupo controle (a-c) apresentam aspecto normal, sem alterações enquanto as que foram expostas a AcPII (d-f) sofreram alterações morfológicas na cutícula e bainha.

A protease AcPII de *A. cladodes* lesionou a cutícula das L₃ de NPG ocasionando a morte dos nematoides. Alterações morfológicas, descamações, lesões nos “furrows” e “alae” foram observadas na bainha das larvas. Em algumas regiões a bainha foi totalmente removida. Larvas apresentaram danos na camada basal e hipoderme. A musculatura responsável pela movimentação também foi comprometida. A camada cortical foi inteiramente destruída em algumas regiões. Lesões provocaram extravasamento de líquido intracelular e perda de tecido (Fig. 2 d-f; tabela 1).

Análise da cutícula das larvas infectantes por MET

Diferenças morfológicas entre a bainha externa e a cutícula foram evidenciadas por MET. No grupo controle, das camadas mais externas para internas, foi possível evidenciar a bainha íntegra e preservada, com múltiplas camadas diferenciadas: epicutícula, camada cortical, camada mediana e camada basal (Fig. 3 a e c). “Cervical Alae” com duas cristas em lados opostos da larva sem danos (Fig. 3 b e d). Separando a bainha da cutícula há o espaço intercuticular (Fig. 3 a e c). Logo abaixo fica a cutícula, com múltiplas camadas inseridas na hipoderme seguida da lâmina basal. Logo abaixo da lâmina basal está uma extensa camada de células musculares orientadas longitudinalmente, que percorre todo o corpo do nematoide (Fig. 3 a e c). Alterações no espaço intermembrana entre a bainha e a cutícula ocorreram devido ao processamento da amostra.

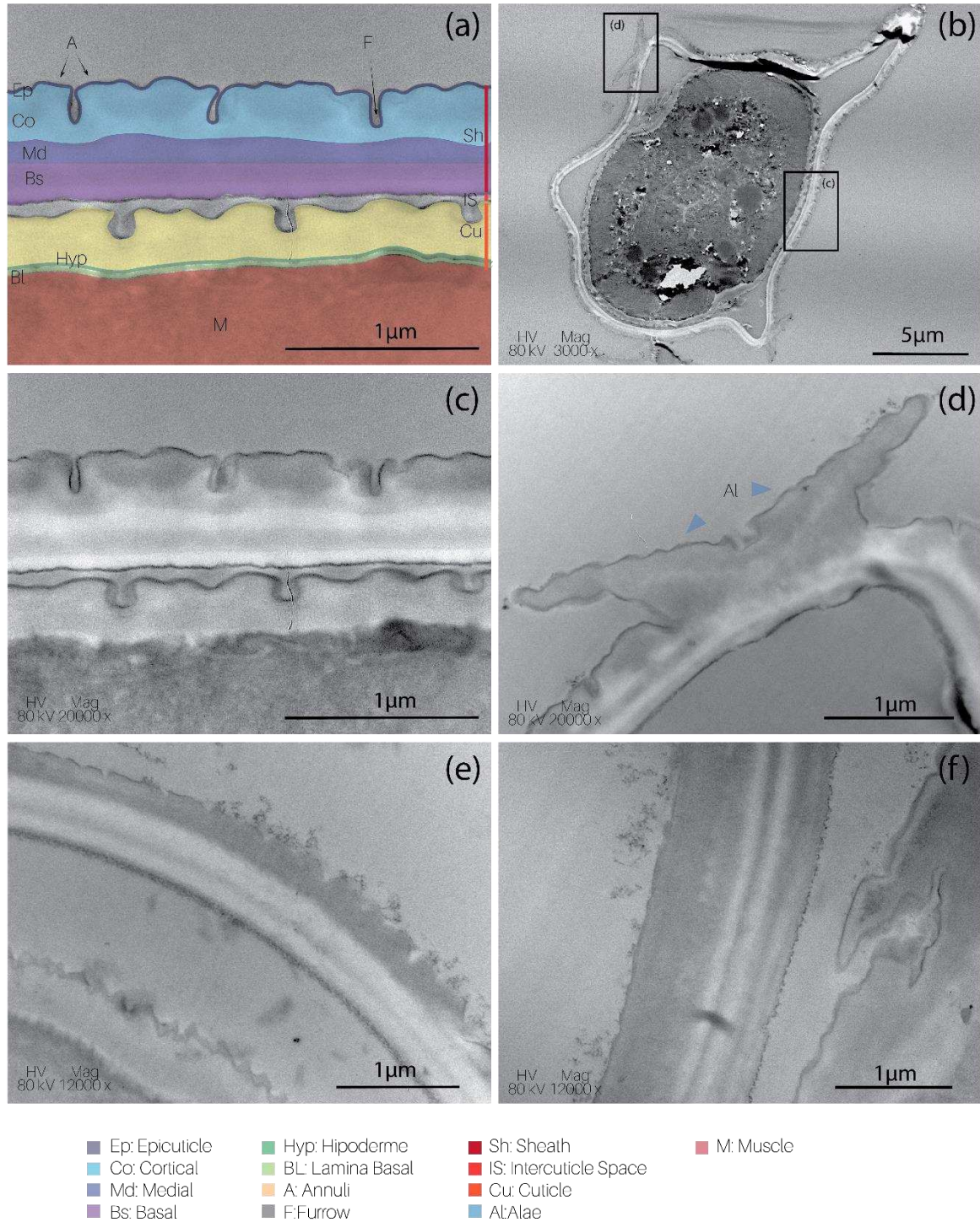


Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão de larvas infectantes expostas a AcP2II de *Arthrobotrys cladodes* e controle (PBS). Larvas do grupo controle (a-d) apresentam aspecto normal, sem alterações enquanto as que foram expostas a AcP2II (d-f) sofreram alterações morfológicas na bainha e cutícula.

A espessura da bainha foi reduzida nas L₃ tratadas com AcPII, epicutícula, “annulis”, “anular furrows” apresentaram descamações (Fig 3 e e f). Diversas regiões apresentaram rompimento da camada cortical. A camada basal também apresentou alterações morfológicas e descamações. A cutícula sofreu alterações na epicutícula, “annulis”, “anular furrows”, sugerindo contato com AcPII. Estruturas abaixo da cutícula, hipoderme, lâmina basal e camada de células musculares apresentaram aspecto normal (Fig. 3 e e f, tabela 1).

Discussão

A cutícula de nematoides é uma barreira semipermeável, composta de colágenos reticulados e proteínas que oferecem resistência às condições ambientais, proteção mecânica contra agentes patogênicos e manutenção da morfologia (Cox et al., 1981; Page & Johnstone, 2007). No entanto, enzimas secretadas por fungos nematófagos, podem romper o exoesqueleto das larvas.

As serina proteases são as enzimas hidrolíticas mais prevalentes e mais estudadas. (Niu & Zhang, 2011; Souza et al., 2015; Herrera-Estrella et al., 2016). Elas são secretadas sobre a cutícula dos nematoides logo após seu aprisionamento e consideradas importantes fatores de virulência na infecção do hospedeiro (Huang et al., 2004).

A massa molecular de AcPII, concorda com outras serina proteases de *Arthrobotrys oligospora*, Aoz1 (Zhao et al., 2004), de *Arthrobotrys conoides*, Ac1 (Yang et al., 2007), de *Monacrosporium microscaphoides*, M1x (Whang et al., 2006) e Mt1 de *Monacrosporium thaumasium* (Soares et al., 2012).

Nematoides como *Meloydogene javanica*, *Panagrellus redivivus* e *Caenorhabditis elegans*, frequentemente usados em testes de atividade nematocida, possuem uma única cutícula, diferente dos tricostrongilídeos que possuem uma bainha externa, resultado de ecdise incompleta. Esta estrutura (Lee, 2002).

A bainha dos tricostrongilídeos tem a função de proteger a larva das condições ambientais e agentes físicos, por isso foi a primeira a ser afetada pela protease AcPII. Nematoides parasitos de plantas (*Meloydogene javanica*) e de vida livre (*Panagrellus redivivus* e *Caenorhabditis elegans*) são mais susceptíveis às condições ambientais e agentes químicos por possuírem apenas uma cutícula (Lee, 2002).

Atividade nematicida de proteases de fungos nematófagos realizados em *P. redivivus* mostram altas taxas de mortalidade, como Ver112 de *Lecanicillium psalliotae*, PII de *A. oligospora* e Ac1 de *A. conoides* que apresentaram mortalidade de *P. redivivus* de 81, 77 e 100%, respectivamente (Tunlid et al. 1994; Yang et al., 2005; Yang et al., 2017). Estudo recente demonstrou importante passo no estudo da atividade enzimática dessas proteases sobre L₃ de tricostrongilídeos. Protease de *Arthrobotrys musiformis* reduziu em 77% o número de L₃ de *Hamemonchus contortus* no período de 48h (Acevedo-Ramírez et al., 2015), diferente de nosso estudo que alcançou 42%.

Alterações morfológicas na bainha e cutícula das L₃ ocorreram de maneira desigual de uma larva para outra, com algumas mais afetadas. Isso pode ser devido a diferença de concentração entre enzima e substrato. A concentração de enzima-substrato, pH, temperatura e presença íons pode interferir na atividade enzimática (Siezen & Leunissen 1997; Sharma, 2017).

Detalhes ultraestruturais das camadas externas e internas das larvas foram revelados pelas micrografias de microscopia eletrônica de varredura e transmissão. As lesões provocadas por AcPII, na bainha e cutícula, levaram as larvas a morte. As serina proteases são conhecidas pela ação sobre a cutícula de larvas de nematoides. São endopeptidases que hidrolisam ligações peptídicas internas na cadeia polipeptídica (Siezen & Leunissen 1997). Na cutícula de nematoides provocam lesões que podem afetar prejudicialmente os mecanismos de defesa, permeabilidade e locomoção da larva (Page et al., 2014).

As lesões provocadas nas larvas pela protease durante os ensaios *in vitro* permitem sugerir que AcPII pode ser importante na fase de penetração da hifa e degradação do nematoide, devido a sua ação enzimática sobre a bainha e cutícula das L₃, permitindo o crescimento micelial.

Este estudo foi importante por revelar aspectos ultraestruturais do exoesqueleto de L₃ de NG, após contato com protease de *A. cladodes*, permitindo observar lesões nas diferentes camadas da bainha e cutícula, além de melhorar a compreensão dos mecanismos de degradação e penetração da cutícula, que são extremamente importantes para infecção do hospedeiro e alimentação do fungo.

Referências

- Acevedo-Ramírez, C.P.M., Figueroa-Castillo, J.A., Ulloa-Arvizú, R., Martínez-García, L. G., Guevara-Flores, A., Rendón, J. L., Mendoza-de-Gives, P., Quiroz-Romero, H., 2015. Proteolytic activity of extracellular products from *Arthrobotrys musiformis* and their effect in vitro against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Vet. Rec.* 2, 000103.
- Barcellos, M.S., Cossolin, J.F.S., Dias, G., Lino-Neto, J., 2017. Sperm morphology of the leafhopper *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Sternorrhyncha: Psylloidea: Liviidae). *Micron*, 99, 49-55.
- Cox, G.N., Kusch, M., Edgar, R.S., 1981. Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterisation. *J. Cell Biol.* 90, 7–17.
- Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S., Kubicek, C.P., 2016 *The Mycota IV "Environmental and Microbial Relationships"*, 3^a ed, Chapter: 13 Nematophagous Fungi, Springer, Heidelberg, Germany.
- Huang, X.W., Zhao, N.H., Zhang, K.Q., 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Res. Microbiol.* 155,811–816.
- Lee, D. L., 2002. *The biology of nematodes*. 1^aed, Taylor & Francis. United Kingdom.
- Mendoza-De-Gives, P., Davies, K.G., Clarck, S.J., Behnke, J.M., 1999. Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitol.* 119, 95–104.
- Niu, X.M., Zhang, K. Q., 2011. *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology.* 2, 59-78.
- Nguyen, V.N., Oh, I.J., Kim, Y.J., Kim, K.Y., Kim, Y.C., Park, R.D., 2009. Purification and characterization of chitinases from *Paecilomyces variotii* DG-3 parasitizing on *Meloidogyne incognita* eggs. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 195–203

Nordbring-Hertz, B., Jansson, H.B., Tunlid, A., 2006. Nematophagous fungi. In encyclopedia of life sciences. Wiley, Chichester

Page, A.P., Johnstone, I.L., 2007. The cuticle. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.138.1, <http://www.wormbook.org>.

Page, A.P., Stepek, G., Winter, A.D., Pertab, D., 2014. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 4, 133-141.

Schenck, S., Chase, T.J., Rosenzweig, W.D., Pramer, D., 1980. Collagenase production by nematode-trapping fungi. Appl. Environ. Microbiol. 40, 567–570.

Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S., Kumar, A., 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. J. Genet Eng. Biot. 15, 115–126

Siezen, R.J., Leunissen, J.A.M., 1997. Subtilases: the superfamily of subtilisin like serine protease. Protein. Sci. 6, 501–523.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P.K., 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. Biotech. 6, 174.

Soares, F.E.F., Braga, F.R., Araújo, J.V., Santos, L.W., Mozer, L.R., Queiróz, J.H., 2012. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. Parasitol. Res. 110, 2423–2437.

Souza, P.M.D., Bittencourt, M.L.D.A., Caprara, C.C., Freitas, M.D., Almeida, R.P.C. D., Silveira, D., Magalhães, P.O., 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. Braz. J. Microbiol. 46, 337-346.

Su, H., Zhao, Y., Zhou, J., Feng, H., Jiang, D., Zhang, K. Q., Yang, J., 2017. Trapping devices of nematode-trapping fungi: formation, evolution, and genomic perspectives. Biol. Rev. 92, 357-368.

- Tikhonov, V.E., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J., Jansson, H.B., 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *Verticillium suchlasporium*. *Fungal Genet. Biol.* 35, 67–78.
- Tosi, S., Annovazzi, L., Tosi, I., Iadarola, P., Caretta, G., 2002. Collagenase production in an antarctic strain of *Arthrobotrys tortor* Jarowaja. *Mycopathologia.* 153,157–162
- Tunlid, A., Rosen, S., Ek, B., Rask, L., 1994. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiol.* 140, 1687–1695.
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency.
- Wang, M., Yang, J.K., Zhang, K.Q., 2006 Characterization of an extracellular protease and its cDNA from the nematode-trapping fungus *Monacrosporium microscaphoides*. *Can. J. Microbiol.* 52, 130–139.
- Yang, J., Liang, L., Li, Yang J.K, Li J, Liang L.M, Tian, B.Y., Zhang, Y., Chen, C.M., Zhang, K.Q., 2007. Cloning and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys conoides*. *Arch. Microbiol.* 188, 167–174.
- Yang, J.K., Huang, X.W., Tian, B.Y., Wang, M., Niu, Q.H., Zhang, K.Q., 2005. Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity. *Biotechnol. Lett.* 27,1123–1128.
- Yang, J., Liang, L., Li, J., Zhang, K. Q., 2013. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7081–7095.
- Zhao, M.L., Mo, M.H., Zhang, K.Q., 2004. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycologia* 96:16–22

10. Conclusões gerais

Foram identificadas duas proteases extracelulares do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* isolado (CG719), chamadas de protease de *Arthrobotrys cladodes* I (AcPI) e protease de *Arthrobotrys cladodes* II (AcPII).

AcPI e AcPII apresentam massa molecular estimada de 56 e 39 kDa, respectivamente. Possuem maior atividade em pH neutro a alcalino (7-8) e em temperaturas entre 55 e 60°C.

AcPI e AcPII são sensíveis ao inibidor phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) sugerindo pertencerem ao grupo das serina proteases, além de terem atividade enzimática aumentada na presença de Ca^{2+} .

Ambas proteases apresentaram atividade nematicida contra larvas infectantes (L₃) de nematoides parasitos gastrintestinais (NPG) de ruminantes.

Imagens de MEV e MET permitiram melhor compressão do mecanismo de penetração e degradação do nematoide pela ação enzimática das proteases secretadas pelas hifas de *A. cladodes*.